

Univerzitet u Beogradu
BIOLOŠKI FAKULTET

Nemanja LJ. Vučić

Povezanost strukturnih varijanti u
hromozomu Y i genu *NOS3* i tačkastih
varijanti u hromozomima 1 i 12 sa rizikom
za pojavu idiopatskog steriliteta kod
muškaraca u Srbiji

-doktorska disertacija-

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Nemanja LJ. Vučić

Association of structural variants within Y
chromosome and *NOS3* gene and single
nucleotide variants in chromosomes 1 and
12 with idiopathic male infertility risk in
Serbian population

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2022

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

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

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Gorana Brajuškovića, a u saradnji sa Klinikom za urologiju Kliničkog centra Srbije, Odeljenjem za neurobiologiju, Univerzitet u Beogradu-Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i Centra za vantelesnu oplodnju „Akademik Vojin Šulović“ Opšte bolnice u Valjevu.

Na prvom mestu, zahvalio bih se svom mentoru prof. dr Goranu Brajuškoviću, na pruženoj prilici da posle osnovnih akademskih studija svoje usavršavanje nastavim u Centru za humanu molekularnu genetiku, gde sam uz Profesora imao priliku da radim na sticanju naučne pismenosti i kritičkog razmišljanja. Profesoru Brajuškoviću bih se zahvalio na korisnim savetima, sugestijama i pomoći oko pisanja radova i disertacije, ali pre svega na strpljenju, razumevanju i podršci u periodima kada je bilo najpotrebnije.

Izuzetna mi je čast što sam imao priliku da upoznam prof. dr Dušanku Savić-Pavićević kojoj bih se zahvalio na inspirativnim predavanjima koja sam slušao kao student, kao i na sugestijama i savetima koje su se ticale mog kasnijeg rada i usavršavanja. Nivo posvećenosti poslu i naučnom radu profesorke Duške predstavlja ideal kojem i danas težim u svojoj profesiji.

Želeo bih da se zahvalim starijim kolegama iz Centra za humanu molekularnu genetiku, Zoki i Milošu koji su me od starta prihvatili kao jedno od svoje „dece“, nesebično su mi pomagali i do detalja objašnjavali šta god mi nije bilo jasno, častili ručkove, zasmijavali do suza i pokrivali moje brljotine. Zahvalio bih se i Jovanu od kojeg sam upijao sve detalje, od toga kako funkcionišu molekularno-biološke metode do mehanizama nastanka retkih bolesti, Jeleni sa kojom sam odlično sarađivao u radu sa strankama i zbog koje nisam bio u obavezi da dolazim rano na posao, Stefanu i Vladi na druženju u laboratoriji, ali i van nje.

Veliku zahvalnost dugujem Neveni i Suzani, bez njih dve, pitanje je kada bi i da li bi uopšte ova disertacija ugledala svetlost dana. Hvala na svim satima i danima posvećenim „sterilcima“!

Na kraju, zahvalio bih se porodici i prijateljima koji su neretko postavljali jedno te isto pitanje: „Kada ćeš više da doktoriraš?“, i time me dodatno motivisali da ovu tezu privedem kraju.

Za mene lično, ovaj doktorat predstavlja uspomenu na lepe trenutke provedene na Biološkom fakultetu i na ljude iz Centra za humanu molekularnu genetiku koji pored toga što ostaju u lepom sećanju, predstavljaju i jedan od bitnih faktora uticaja na moje kako lično, tako i na profesionalno sazrevanje, i na tome ću im uvek biti zahvalan.

Povezanost strukturnih varijanti u hromozomu Y i genu *NOS3* i tačkastih varijanti u hromozomima 1 i 12 sa rizikom za pojavu idiopatskog steriliteta kod muškaraca u Srbiji

Sažetak:

Muški sterilitet predstavlja medicinsko stanje složene etiologije koje nastaje usled delovanja kako genetičkih tako i sredinskih faktora. Hromozomske aberacije i delecije u okviru lokusa koji se označavaju kao faktori azoospermije (*AZF*), predstavljaju najčešće genetičke uzročnike steriliteta kod muškaraca. Rezultati velikog broja studija nisu saglasni kada je u pitanju asocijacija varijacija u broju kopija (CNVs) u okviru regiona *AZF* hromozoma Y sa rizikom za pojavu idiopatskog steriliteta. Naša studija imala je za cilj da identifikuje prisustvo i analizira moguću asocijaciju između CNVs u okviru regiona *AZF* sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u populaciji Srbije. Koristeći tehniku hibridizacije višestruko ligiranih proba, bili smo u mogućnosti da detektujemo CNVs kod 24 od ukupno 105 (22.86%) sterilnih i kod 11 od ukupno 112 (9.82%) fertilnih muškaraca. Rezultati Fišerovog egzaktnog testa pokazali su statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova slučajeva i kontrola kada se uzmu u obzir sve delecije identifikovane u okviru *AZFc* regiona ($p = 0.024$). Takođe, bio je prisutan i trend statističke značajnosti kada je u pitanju delecija koja nastaje između gr/gr amplikona ($p = 0.053$). Pored toga, identifikovali smo jedan tip kompleksnog CNVs koji do sada nije bio prijavljen u literaturi, a koji nastaje usled inverzije r2/r3 amplikona, nakon čega dolazi do duplikacije b2/b3 i delecije b3/b4. Rezultati ranijih studija ukazuju da oksidativni stres može negativno uticati na pokretljivost spermatozoida i da može uzrokovati oštećenja na molekulima DNK spermatozoida. Produkovan od strane nitrit oksid sintetaze 3 (*NOS3*), azot-monoksid predstavlja jedan od medijatora oksidativnog stresa u testisima. Jedan od ciljeva ove studije bio je da analizira moguću asocijaciju dve tačkaste genetičke varijante, rs2070744 i rs1799983, i intronske varijante 4a/4b u genu *NOS3*, sa rizikom za pojavu idiopatskog steriliteta u ispitivanoj grupi muškaraca. Takođe je sprovedena i nezavisna studija asocijacije tri genetičke varijante, rs12097821, rs2477686 i rs10842262, selektovane na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu, sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u populaciji Srbije. Naši rezultati ukazuju da je intronska varijanta 4a/4b gena *NOS3* asocirana sa povećanim rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca sa smanjenim brojem i smanjenom pokretljivošću spermatozoida. Takođe, pokazano je da su varijante rs2477686 i rs10842262 asocirane sa muškim sterilitetom u populaciji Srbije.

Ključne reči: studija asocijacije, genetičke varijante, varijacije u broju kopija, muški sterilitet, oksidativni stres, studija asocijacije na čitavom genomu, meta-analiza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Association of structural variants within Y chromosome and *NOS3* gene and single nucleotide variants in chromosomes 1 and 12 with idiopathic male infertility risk in Serbian population

Abstract:

Male infertility is a health condition with complex aetiology that includes both genetic and environmental factors. Among the known genetic causes of male infertility, the most prominent factors are karyotype abnormalities and microdeletions in the azoospermia factor (*AZF*) locus of the human Y chromosome, such as deletions of *AZF_a*, *AZF_b* or *AZF_c* subregions. Results of numerous studies gave contradictory conclusions when analyzing associations between copy number variants (CNVs) within the *AZF* locus of the Y chromosome and idiopathic male infertility. One of the aims of this study was to identify the presence and possible association of CNVs in the *AZF* region of Y chromosome with idiopathic male infertility in the Serbian population. Using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique, we were able to detect CNVs in 24 of 105 (22.86%) infertile men and in 11 of 112 (9.82%) fertile controls. The results of Fisher's exact test showed a statistically significant difference between cases and controls after merging gr/gr and b2/b3 partial deletions identified in the *AZF_c* region ($p = 0.024$). At the same time, we observed a trend towards statistical significance for a deletion among gr/gr amplicons ($p = 0.053$). In addition to these, we identified a novel complex CNV involving inversion of r2/r3 amplicons, followed by b2/b3 duplication and b3/b4 deletion, respectively. Results of previous studies confirmed that oxidative stress negatively affects sperm motility and causes sperm DNA damage. Produced by nitric oxide synthase 3 (*NOS3*), nitric oxide is considered to be one of the important mediators of oxidative stress in testis tissue. Additional aim of this study was to analyze the possible association of two single nucleotide variants rs2070744, rs1799983 and intron variant 4a/4b in the *NOS3* gene with the risk of idiopathic male infertility in our study group. In the independent study, we analyzed the association of the three single nucleotide variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 selected based on the results of genome-wide association study conducted in the Han Chinese population, with the risk of idiopathic male infertility. Our findings suggest that tandem repeat variant within intron 4 of the *NOS3* gene is associated with an increased risk of infertility in men diagnosed with oligoasthenozoospermia. Also, variants rs2477686 and rs10842262 are shown to be significantly associated with male infertility in the Serbian population.

Key words: association study, genetic variants, copy number variants, male infertility, oxidative stress, genome-wide association study, meta-analysis.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and Molecular Biology

Skraćenice

A – Adenin (azotna baza)

AIC - Akaike informacijski kriterijum

AZF - Azoospermija faktor (eng. *Azoospermia Factor*, AZF)

bp - bazni par

BPY2 - Protein Y hromozoma 2 (eng. *Basic protein Y chromosome 2*, BPY2),

C – Citozin (azotna baza)

CDY1 - Hromodomen povezan sa Y 1 (eng. *Chromodomain Y-linked 1*, CDY1)

CI - interval poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI)

CNVs - varijacije u broju kopija (eng. *Copy number variations*, CNVs)

DAZ - Deletiran kod azoosperije (eng. *Deleted in Azoospermia*, DAZ)

DBY - Protein sa DEAD/H domenom (eng. *DEAD/H box polypeptide*, DBY)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DQ - koeficijent doze (eng. *Dosage Quotient*, DQ)

EAU - Evropsko udruženje urologa (eng. *European Association of Urology*, EAU)

EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina

eNOS – endotelna azot-monoksid sintetaza

Et-Br - etidijum-bromid

G – Guanin (azotna baza)

GWAS - Studija genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*, GWAS)

HGP - Projekat „Genom čoveka” (eng. *Human Genome Project*, HGP)

HSFY- transkripcioni faktor toplotnog stresa povezan sa Y hromozomom (eng. *Heat-shock transcription factor Y-linked*, HSFY)

I² - indeks nedoslednosti (eng. *inconsistency index*)

IM - nepokretni spermatozoidi

iNOS - citokinima izazvana azot-monooksid sintetaza

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

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

NAHR - nealelska homologna rekombinacija (eng. *Non-Allelic Homologous Recombination*, NAHR)

nNOS - nuralna azot-monoksid sintetaza

NO - azot-monoksid

NOA - azoospermija bez opstrukcije (eng. *Non-Obstructive Azoospermia*, NOA)

NOS - azot-monoksid sintetaza (eng. *Nitric-oxide synthase*, NOS)

NP - normalno pokretni spermatozoidi

OMIM - On line katalog gena čoveka i genetičkih bolesti (eng. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM)

OR - odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR)

OS - oksidativni stres

P - palindromi

PCR - lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

PEX10 - Peroksizom izgrađujući faktor 10 (eng. *Peroxisome biogenesis factor 10*, PEX10)

POLB - DNK polimeraza β

PR - progresivno pokretni spermatozoidi

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

PRY2 - PTPBL- povezan gen na Y 2 (eng. *PTPBL-related gene on Y2*, PRY2),

RBMY - protein hromozoma Y sa RNK-vezujućim motivom (eng. *RNA-binding motif protein Y chromosome*, RBMY)

RFLP - polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP)

ROS - reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS)

SCOS - sindrom Sertolijevih ćelija (eng. *Sertoli Cell-Only Syndrome*, SCOS)

SNV - tačkasta nukletidna varijanta (eng. *Single Nucleotide Variation*, SNV)

SOX5 – Gen SRY-povezan HMG-boks 5 (eng. *SRY-related HMG-box gene 5*, SOX5)

T – Timin (azotna baza)

USP9Y - Ubikvitin specifična proteaza 9 hromozoma Y (eng. *Ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome*, USP9Y)

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

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Sterilitet kod muškaraca	1
1.1.1. Definicija steriliteta	1
1.1.2. Etiologija muškog steriliteta.....	1
1.1.3. Dijagnostika muškog steriliteta	1
1.1.4. Lečenje muškog steriliteta.....	3
1.2. Molekularna osnova steriliteta kod muškaraca.....	4
1.2.1 Hromozomske aberacije kao uzročnici muškog steriliteta	4
1.2.2. Uloga hromozoma Y u nastanku muškog steriliteta	5
1.3. Uloga alela niske penetrabilnosti u razvoju steriliteta kod muškaraca.....	8
1.4. Uloga oksidativnog stresa u razvoju steriliteta kod muškaraca	10
2. Ciljevi rada	12
3. Materijal i metode	13
3.1. Materijal.....	13
3.2. Metode	13
3.2.1. Stratifikacija uzoraka sterilnih muškaraca na osnovu kliničke dijagnoze	13
3.2.2. Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i briseva bukalne sluznice ..	14
3.2.3. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu <i>NOS3</i>	15
3.2.4. Genotipizacija genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu <i>NOS3</i>	16
3.2.5. Provera validnosti RFLP metode za genotipizaciju genetičke varijante rs10842262 korišćenjem metode bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja	20
3.2.6. Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca.....	21
3.2.7. Meta-analiza analiziranih genetičkih varijanti selektovanih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca i rezultata prethodnih studija vezanih za muški sterilitet.....	22
3.2.8. Identifikacija varijacija u broju kopija regiona <i>AZF</i> hromozoma Y kod sterilnih muškaraca primenom metode višestrukog umnožavanja ligiranih proba (MLPA)	24
4. Rezultati	28
4.1. Rezultati stratifikacije uzoraka sterilnih muškaraca na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta	28
4.2. Rezultati provere količine i kvaliteta izolovane DNK elektroforezom u agaroznom gelu..	28
4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu <i>NOS3</i>	29
4.4. Rezultati genotipizacije odabranih genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u promotoru i egzonu gena <i>NOS3</i>	29
4.5. Rezultati genotipizacije genetičkih varijante 4a/4b u okviru introna gena <i>NOS3</i>	33

4.6. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu	34
4.7. Rezultati provere validnosti RFLP metode za genotipizaciju genetičke varijante rs10842262 korišćenjem metode bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja.....	38
4.8. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genu NOS3	38
4.9. Rezultati meta-analize genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i rezultata prethodnih studija	43
4.10. Analiza asocijacije varijacija u broju kopija regiona AZF hromozoma Y sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca	50
5. Diskusija	54
6. Zaključci.....	61
7. Literatura	62
8. Prilozi.....	68

1. Uvod

1.1. Sterilitet kod muškaraca

1.1.1. Definicija steriliteta

Sterilitet je veoma složeno medicinsko stanje koje se definiše kao nemogućnost začeća nakon najmanje godinu dana seksualnih odnosa bez primene kontracepcije. Približno 15% parova širom sveta suočeno je problemom steriliteta, od čega je muški faktor neplodnosti samostalno odgovoran za 20-30% slučajeva, dok se u polovini slučajeva kombinuje sa ženskom neplodnošću (1).

1.1.2. Etiologija muškog steriliteta

Termin „muški sterilitet“ ne predstavlja jasno definisan klinički sindrom, već obuhvata skup različitih stanja heterogene etiologije. Sterilitet može nastati kao posledica kongenitalnih ili stečenih faktora koji utiču na proizvodnju spermatozoida ili dovode do opstrukcije puteva kojima se kreću spermatozoidi. Uzrok steriliteta može biti lokalizovan u delovima centralnog nervnog sistema, kao što su hipotalamus i hipofiza, ali i u ciljnim organima koji su pod dejstvom androgenih hormona. Smatra se da ovo složeno patološko stanje može nastati kao posledica urogenitalnih poremećaja, malignih bolesti, infekcija urogenitalnog sistema, varikocеле, endokrinoloških ili imunoloških poremećaja, pojedinih karakterističnih genetičkih izmena, kao i usled štetnih uticaja faktora spoljašnje sredine (2). Rezultati epidemioloških studija pružaju dokaze da životna sredina i stil života evidentno utiču na kvalitet semene tečnosti i plodnost muškaraca. Loše životne navike, poput konzumiranja alkohola i cigareta, određeni načini ishrane, kao i hemijski i fizički zagađivači okoline bitno utiču na razvoj steriliteta (3).

U 30 do 50% slučajeva, etiologija steriliteta kod muškaraca ostaje nepoznata i takvi oblici svrstavaju se u kategoriju idiopatskog steriliteta (2). Idiopatski sterilitet konstatuje se nakon eliminisanja svih drugih poznatih uzročnika i odlikuje vrlo heterogenu grupu muškaraca. Smatra se da idiopatski oblik neplodnosti najčešće nastaje kao posledica interakcije između genetičkih i sredinskih faktora (4).

1.1.3. Dijagnostika muškog steriliteta

Dijagnostika muškog steriliteta podrazumeva klinički pregled, analizu ejakulata spermogramom i, ako postoji medicinska indikacija, biopsiju testisa (2).

Klinički pregled uključuje analizu opšteg stanja muškarca, izgled i oblik maljavosti, utvrđivanje prisustva ginekomastije i poremećaja u razvoju koštanog sistema. Pregled obuhvata i analizu testisa i prostate u cilju dijagnostifikovanja kongenitalnih malformacija ili drugih patoloških stanja koje mogu imati negativan efekat na plodnost muškarca. Endokrinološka etiologija muškog steriliteta potvrđuje se utvrđivanjem hormonskog statusa muškarca, dok se infekcije urogenitalnog trakta dijagnostifikuju mikrobiološkim ispitivanjima brisa uretre i spermokulturom (5).

Spermogram obuhvata analizu broja, pokretljivosti i morfoloških karakteristika spermatozoida. Biološki uzorak za analizu potrebno je obezbediti nakon perioda seksualne apstinencije u trajanju od najmanje 4 dana, jer se gustina proizvedenog ejakulata povećava 25% dnevno tokom početnog perioda apstinencije. Referentne vrednosti parametara semene tečnosti analiziranih metodom spermograma date su preporukama Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) 2010. godine i prikazane su u tabeli 1.1, a koriste se i tokom postavljanja dijagnoze steriliteta (5,6).

Tabela 1.1. Referentne vrednosti spermograma.

Parametar	Referentne vrednosti
Volumen ejakulata (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Ukupan broj spermatozoida (10^6 po ejakulatu)	39 (33-46)
Koncentracija (10^6 po ml)	15 (12-16)
Ukupno pokretnih (%)	40 (38-42)
Progresivno pokretnih (%)	32 (31-34)
Vitalnost (% živih spermatozoida)	58 (55-63)
Morfološki neizmenjeni oblici (%)	4 (3.0-4.0)
Granične vrednosti ostalih parametara	
pH	≥ 7.2
Peroksidaza-pozitivni leukociti (10^6 /ml)	< 1.0
MAR test (pokretni spermatozoidi sa vezanim česticama, %)	< 50
<i>Immunobead</i> test (pokretni spermatozoidi sa vezanim kuglicama, %)	< 50
Semeni cink (μmol /ejakulatu)	≥ 2.4
Semena fruktoza (μmol /ejakulatu)	≥ 13
Semena neutralna glukozidaza (mU/ejakulatu)	≥ 20

Broj spermatozoida određuje se analizom nativnog uzorka ejakulata pomoću komore za brojanje ćelija i svetlosnog mikroskopa na uveličanju od 400x. Pored broja, analizira se i pokretljivost spermatozoida analizom ćelijskog razmaza ejakulata korišćenjem svetlosnog mikroskopa na uveličanju od 100x do 200x. Analiza obuhvata najmanje 200 spermatozoida koji se na osnovu svoje pokretljivosti svrstavaju u tri kategorije: progresivno pokretni (PR), normalno pokretni (NP) i nepokretni (IM). Isti ćelijski razmaz koristi se i za analizu morfologije spermatozoida, s tim da se morfologija analizira svetlosnim mikroskopom na uveličanju 1000x uz pomoć imerzije. Ukoliko rezultati spermograma odstupaju od referentnih vrednosti, test je neophodno ponoviti u periodu od 7 do 21 dan (7).

Na osnovu rezultata spermograma postavlja se klinička dijagnoza muškog steriliteta. Razlikuje se nekoliko tipova muškog steriliteta (tabela 1.2.), od kojih su najučestaliji:

- **azoospermija** - tip muškog steriliteta kojeg karakteriše potpuno odsustvo spermatozoida u ejakulatu.
- **oligozoospermija** - tip muškog steriliteta kojeg karakteriše prisustvo manje od 15 miliona spermatozoida/ml zapremine ejakulata.
- **astenozoospermija** - tip muškog steriliteta kojeg karakteriše prisustvo manje od 32% pokretnih spermatozoida.
- **teratozoospermija** - tip muškog steriliteta kojeg karakteriše prisustvo manje od 4% spermatozoida neizmenjene morfologije.

Nakon urađenog spermograma moguće je uočiti izmene koje predstavljaju kombinaciju najučestalijih tipova muškog steriliteta, te se tako tip steriliteta koji predstavlja kombinaciju oligozoospermije i astenozoospermije označava kao oligoastenozoospermija (tabela 1.2.) (7).

Tabela 1.2. Tipovi steriliteta.

Tip steriliteta	Glavne odlike
Aspermija	Odsustvo ejakulata (bez ili sa retrogradnom ejakulacijom)
Astenozoospermija	% PR spermatozoida ispod referentne vrednosti
Asteneratozoospermija	% PR i NP spermatozoida ispod referentnih vrednosti
Azoospermija	Bez spermatozoida u ejakulatu
Kriptoospermija	Spermatozodi 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, Oligoospermija i Teratoospermija
Oligoteratoospermija	Broj i % spermatozoida neizmenjenog oblika ispod referentnih vrednosti
Oligoospermija	Ukupan broj spermatozoida ispod referentne vrednosti
Teratoospermija	% spermatozoida neizmenjenog oblika ispod referentne vrednosti

Azoospermija kod muškaraca sa normalnom veličinom testisa i referentnim vrednostima polnih hormona predstavlja medicinsku indicaciju za biopsiju testisa. Histo-patološkom analizom bioptiranog tkiva testisa moguće je utvrditi da li je uzrok azoospermije opstrukcija ekstratestikularnih semenih puteva (opstruktivna azoospermija). Ukoliko nije došlo do opstrukcije ekstratestikularnih semenih puteva, postavlja se dijagnoza azoospermije bez opstrukcije (eng. *Non-Obstructive Azoospermia*, NOA). Pato-histološka analiza biopsije može ukazati i na potpuni izostanak germinativnih ćelija (eng. *Sertoli Cell-Only Syndrome*, SCOS), hipospermatogenezu ili poremećaje u sazrevanja spermatozoida (7).

1.1.4. Lečenje muškog steriliteta

Lečenje muškog steriliteta zavisi od etiologije bolesti. Ukoliko je uzrok steriliteta varikocela (proširenje venskog spleta u testisu), opstrukcija semenovoda, kriptorhizam (nespuštanje testisa) ili neki drugi tip kongenitalne malformacije urogenitalnog trakta, lečenje se vrši hirurškim putem, dok se stanja poput atrofije testisa ili potpunog izostanka spermatozoida ne mogu lečiti. Hormonska terapija je efikasna kod steriliteta uzrokovanog hormonskim poremećajima (8), dok se sterilitet izazvan bakterijskom infekcijom urogenitalnog trakta leči antibiotskom terapijom. Najčešći uzročnici infekcija koje se dovode u vezu sa muškim sterilitetom su infekcije izazvane *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* i *Ureaplasma urealyticum* (9). Takođe, biopsija testisa koja se pre svega sprovodi kao procedura za utvrđivanje dijagnoze muškog steriliteta, može predstavljati i terapijsku proceduru kojom se prikupljaju spermatozoidi direktno iz testisa neposredno pre sprovođenja postupka vantelesne oplodnje (10).

1.2. Molekularna osnova steriliteta kod muškaraca

Među brojnim faktorima koji utiču na razvoj steriliteta kod muškaraca, promene na genetičkom i epigenetičkom nivou imaju značajan udeo, posebno u slučajevima idiopatskog steriliteta. Tome svedoči i porast broja naučnih studija usmerenih na ispitivanje molekularne osnove muškog steriliteta pri čemu je, zahvaljujući razvoju genomike i novih metodoloških pristupa, postignut veliki napredak u raumevanju etiologije muškog steriliteta. Rezultati ovih istraživanja ukazuju da genetički poremećaji, mutacije u genima za protine, izmene u epigenetičkim oznakama, retke varijacije u broju kopija i genetičke varijante u određenom procentu slučajeva, mogu biti direktan uzrok ili značajan doprinosilac u razvoju muškog steriliteta (11).

1.2.1 Hromozomske aberacije kao uzročnici muškog steriliteta

Strukturne i numeričke aberacije hromozoma mogu dovesti do poremećaja procesa spermatogeneze usled nemogućnosti sparivanja homolognih hromozoma tokom mejoze. Na to ukazuju rezultati studije sprovedene na eksperimentalnim miševima u kojima je pokazano da u okviru nesparenih regiona homolognih hromozoma dolazi do aktivacije regulatornih mehanizama koji imaju za posledicu programirano ćelijsko umiranje spermatocita, ćelija prekursora spermatozoida (12). Pored toga, aberacije hromozoma mogu obuhvatiti regione promotora ili kodirajućih regiona gena za proteine uključenih u proces spermatogeneze i na taj način posredovati u nastanku steriliteta (13).

Učestalost hromozomskih aberacija u opštoj populaciji iznosi približno 0,6%, dok ovaj procenat kod muškaraca sa sterilitetom varira između 2% i 8%, u zavisnosti od geografskog područja i etničke pripadnosti. Kada se posmatra samo grupa muškaraca sa dijagnostifikovanom azoospermijom bez opstrukcije, procenat zastupljenosti hromozomskih aberacija raste do 15%, a povećanoj učestalosti najviše doprinose muškarci sa Klinefelterovim sindromom (47,XXY) i njegovim varijantama (mozaicizam 46,XY/47XXY) (14).

Kod sterilnih muškaraca predominantne su aberacije polnih hromozoma, ali je dijagnostifikovan i veliki broj strukturnih aberacija autozoma (Tabela 1.3). Strukturne aberacije autozoma po tipu translokacija i inverzija češće se javljaju kod muškaraca sa oligozoospermijom (14).

Tabela 1.3. Najčešće hromozomske aberacije povezane sa muškim sterilitetom.

Hromozomske aberacije (homogene ili mozaicizmi)	
Numeričke aberacije polnih hromozoma	47,XXY (Klinefelterov sindrom) 47,XYY i ostale YY-aneuploidije
Numeričke aberacije autozomnih hromozoma	47,XY(21+) (Daunov sindrom)
Strukturne aberacije hromozoma Y	Delecije, Ring hromozom, Izohromozom Inverzije Translokacije koje uključuju hromozom Y
Strukturne aberacije autozomnih hromozoma	Parcijalne duplikacije i delecije Inverzije Translokacije (Robertsonove, recipročne)

Zbog povećane učestalosti hromozomskih aberacija, nakon postavljanja kliničke dijagnoze, muškarcima se uglavnom preporučuje citogenetička analiza kariotipa. Kod muškaraca nakon radio-terapije ili kod onih sa primarnim poremećajima testisa, hromozomske aberacije mogu se dijagnostifikovati samo u molekulima DNK izolovanih iz spermatozoida (World Health Organization, 2010).

1.2.2. Uloga hromozoma Y u nastanku muškog sterilieta

Sedamdesetih godina prošlog veka, analizom gameta muškaraca sa izraženom oligozoospermijom i azoospermijom, utvrđeno je prisustvo submikroskopskih delecija (mikrodelecija) u okviru dugog kraka hromozoma Y (Yq11). Obzirom da su uočene delecije bile prisutne kod sterilnih, ali ne i kod fertilnih muškaraca sa referentnim rezultatima spermograma, zaključeno je da se u okviru hromozoma Y nalazi region koji sadrži gene odgovorne za sazrevanje muških polnih ćelija (15).

Geni čija se biološka uloga dovodi u vezu sa spermatogenezom locirani su u okviru tri lokusa dugog kraka hromozoma Y, koji se nazivaju „faktori azoospermije“ (eng. *Azoospermia Factor*, AZF). Lokus označen kao *AZFa* sadrži dva gena, dok se u preostala dva lokusa (*AZFb* i *AZFc*) nalazi 26 gena u ukupno 46 kopija (16,17). Mikrodelecije su najučestalije u lokusu *AZFc* i dovode se u vezu sa teškim primarnim poremećajem u razvoju testisa koji za posledicu ima azoospermiju ili oligozoospermiju (11). Mikrodelecije u okviru ovih regiona najčešće nastaju kao rezultat intrahromozomske homologne rekombinacije između regiona molekula DNK bogatih ponovljenim sekvencama organizovanih u palindrome (14).

1.2.2.1. Delecije regiona *AZFa*

Region *AZFa* nalazi se na dugom kraku hromozoma Y, u blizini centromere, i veličine je 800 kb. Obuhvata nekoliko gena, od kojih su dva glavna gena kandidata povezana sa spermatogenezom *USP9Y* (eng. *ubiquitin-specific protease 9, Y Chromosome*, USP9Y) i *DBY* (eng. *DEAD/H box polypeptide*, DBY) (slika 1.1). Rezultati istraživanja pakazali su da delecije u jednom od ova dva gena mogu imati za posledicu značajnu redukciju broja zrelih spermatozoida u ejakulatu (18). Učestalost delecija regiona *AZFa* relativno je niska među sterilnim muškarcima, međutim ono što je karakteristično za ovaj tip delecije je fenotip koji se dovodi u vezu sa sindromom Sertolijevih ćelija (eng. *Sertolli-cell only*, SCO) (19).

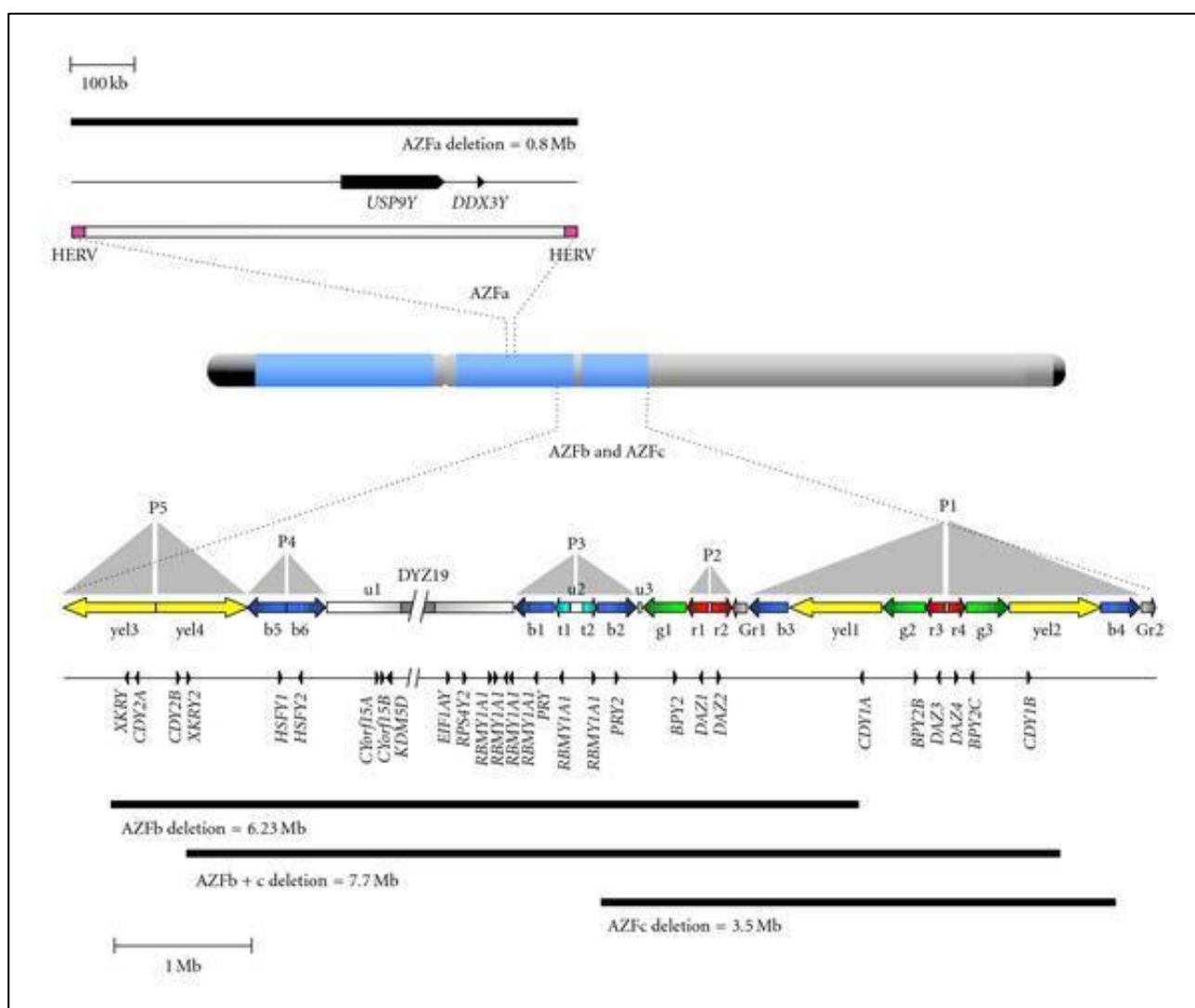
1.2.2.2. Delecije regiona *AZFb*

Region *AZFb* je dugo smatran zasebnim regionom u okviru lokusa *AZF*, molekularnom analizom pokazano je da se regionu *AZFb* i *AZFc* u određenom stepenu preklapaju, odnosno da region *AZFb* „zalazi” u *AZFc* i da sa njim deli oko 1,5 Mb dugu sekvencu molekula DNK (slika 1.1). Zajedno ova dva regiona prostiru se od palindroma označenog kao P5 do proksimalnog dela palindroma označenog kao P1 i njihovom delecijom (eng. *P5/proximal-P1 deletion*) „uklanja” se 6,2 Mb duga sekvenca koja obuhvata 32 kopije gena. Ono što je karakteristično za region *AZFb* jeste prisustvo invertovanih palindromskih ponovaka, u okviru kojih se nalaze geni uključeni u proces sazrevanja spermatozoida. Gen *RBM Y* (eng. *RNA-binding motif protein Y chromosome*, RBMY) prisutan je sa nekoliko kopija u okviru regiona *AZFb*. Ovi geni kodiraju proteine sa RNK-vezujućim domenima za koje se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u metabolizmu različitih tipova molekula RNK tokom spermatogeneze. Druga grupa gena koja je zahvaćena delecijom regiona *AZFb* je familija gena *HSFY* (eng. *Heat-shock transcription factor Y-linked*) koji kodiraju za proteine toplotnog šoka, a njihova delecija detektovana je kod muškaraca sa azoospermijom (20).

1.2.2.3. Delecije regiona AZFc

Delecije u okviru regiona *AZFc* mogu imati različite efekte na sterilitet kod muškaraca. Klinička dijagnoza može varirati od azoospermije bez opstrukcije, preko težih i lakših oblika oligozoospermije, do retkih slučajeva kod kojih delecija u okviru ovog regiona nema uticaja na proizvodnju i kvalitet spermatozoida (21).

Sam region *AZFc* veličine je 3,5 Mb i sačinjen je od blokova ponovljenih sekvenci koji se nazivaju amplikoni. Sekvence amplikona klasifikovane su u familije od kojih svaka familija ima prepoznatljive genetičke karakteristike, dok sekvence u okviru iste familije imaju preko 99,9% homologije, što može imati za posledicu neretku pojavu strukturnih rearanžmana u okviru ovih regiona. Postoji ukupno pet familija amplikonskih sekvenci koje su obeležene po bojama (plava, zelena, crvena, siva i žuta), dok ukupan broj amplikona u okviru regiona *AZFc* iznosi 13 (četiri crvena, tri plava, tri zelena, dva siva i dva žuta) (slika 1.1). Invertovano ponavljanje sekvence amplikona formiraju palindrome, organizacione strukture višeg reda. Palindromi označeni kao P1 i P2 u potpunosti se nalaze u regionu *AZFc*, dok je palindrom P3 podeljen između regiona *AZFc* i *AZFb* (22).



Smatra se da amplikonsko/palindromska organizacija regiona *AZFc* predstavlja vid zaštite i "čuvanja" gena bitnih za proces spermatogeneze. Međutim, upravo zbog ovakve organizacije sekvenci često dolazi do nealelske homologne rekombinacije (eng. *non-allelic homologous recombination, NAHR*). NAHR može imati za posledicu izmenu redosleda amplikona, pri čemu dolazi do invertovanja njihovih pozicija i mešanja sekvenci palindroma. Pored toga mogu se duplirati ili višestruko umnožiti pojedini amplikoni, dok se neki mogu u potpunosti „izbrisati”. Kao rezultat NAHR u okviru regiona *AZFc* mogu nastati različiti tipovi genetičkih reanažmana (23). Strukturne promene mogu se odraziti kako na broj tako i na poziciju samih gena što donekle može objasniti heterogenost kliničke dijagnoze (24).

U regionu *AZFc* nalaze se četiri protein-kodirajuće familije gena: *PRY2* (eng. *PTPBL-related gene on Y 2, PRY2*), *BPY2* (eng. *Basic protein Y chromosome, 2, BPY2*), *DAZ* (eng. *Deleted in Azoospermia, DAZ*) i *CDY1* (eng. *Chromodomain Y-linked 1, CDY1*). Ovi geni lokalizovani su u plavim, zelenim, crvenim i žutim amplikonima, sa po jednom aktivnom transkripcionom jedinicom po kopiji amplikona (slika 1.1). Njihovi proteinski produkti ekspimiraju se u testisima i učestvuju u procesima progamiranog ćelijskog umiranja, spermatogeneze, regulacije transkripcije i remodelovanja hromatina, transporta, čuvanja i translacione aktivacije razvojno-specifičnih molekula informacionih RNK (iRNK) (25,26).

U rearanžmanima između amplikona iz iste familije broj njihovih kopija može biti izmenjen a da fenotipski to rezultuje samo blažim smanjenjem broja spermatozoida, ne i njihovim potpunim odsusutvom. Težu kliničku sliku daje samo „brisanje” svih amplikona (svih gena) iz regiona *AZFc*, odnosno kompletna delecija regiona. Pokazano je i da težina kliničke slike kod muškaraca sa potpunom delecijom regiona *AZFc* može biti ublažena usled prisustva funkcionalnih homologa gena *DAZ* i *CDY1* koji se nalaze na autozomima (27).

1.2.2.4. Varijacije u broju kopija regiona *AZFc*

Osim mikrolelecije koja obuhvata čitav region *AZFc*, u okviru istog regiona registruju se i suptilnije strukturne promene po tipu inverzija, delecija ili duplikacija. Ovi strukturni rearanžmani dovode do promena u broju i poziciji višestruko ponovljenih sekvenci gena *DAZ*, *CDY1* i *BPY2*, i mogu se klasifikovati kao varijacije u broju kopija (eng. *Copy number variations, CNVs*) (28). Kombinacijom različitih tipova strukturnih promena mogu nastati kompleksni rearanžmani kod kojih delecije i duplikacije zahvataju isti region ili gde inverzija regiona prethodi deleciji i/ili duplikaciji amplikonskih sekvenci (29).

Među najučestalijim CNV u 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 (30–32).

Varijacije u broju kopija regiona *AZFc* detektovane su kako kod seterilnih tako i kod fertilnih muškaraca iz opšte populacije. To predstavlja razlog zbog čega je teško utvrditi značaj CNVs u patogenezi muškog steriliteta. Tome doprinose i rezultati studija slučajeva i kontrola koji su često kontradiktorni i ukazuju da efekat CNVs na muški sterilitet zavisi od geografske i etničke pripadnosti (10,33–37). Dosadašnja istraživanja nedvosmisleno su pokazala da delecija b2/b4 "uklanja" čitav region *AZFc* i predstavlja jedan od najčešćih genetičkih uzročnika steriliteta kod muškaraca. Takođe je pokazano da delecija gr/gr, analizirana kod muškaraca iz velikog broja evropskih zemalja, obuhvata gene koji se ekstrapimiraju u testisima i time povećava rizik za poremećaje tokom spermatogeneze što za posledicu može imati razvoj muškog steriliteta (38).

Strukturna organizacija regiona *AZFc* omogućava nastanak velikog broja različitih CNVs, a njihova mala učestalost u opštoj populaciji i izostanak metoda za njihovu detekciju predstavljaju ograničavajuće faktore za dalja istraživanja. 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. Multipleks PCR-om, korišćenjem 15 pari prajmera, moguće je analizirati isto toliko lokusa u jednoj reakciji. Ova metoda nema mogućnost detekcije duplikacija i inverzija, dok se kompleksni rearanžmani tipa gr/gr delecija+b2/b4 duplikacija, multipleks PCR-om registruju samo kao parcijalna delecija gr/gr (39).

Za razliku od multipleks PCR-a, metoda višestrukog umnožavanja ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*, MLPA) 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. Iz tog razloga, smatra se da je MLPA senzitivnija i efikasija metoda u detekciji CNVs u regionu *AZF* hromozoma Y (39).

1.3. Uloga alela niske penetrabilnosti u razvoju steriliteta kod muškaraca

Genetičke varijante u sekvenci molekula DNK predstavljaju još jedan od faktora rizika za razvoj steriliteta kod muškaraca. Za razliku od retkih bolesti kod kojih određena genetička varijanta, označena kao mutacija, zastupljena sa učestalošću manjom od 5% u opštoj populaciji i nosi gotovo 100% rizik za ispoljavanje, kod složenih osobina i brojnih bolesti čoveka konkretna varijanta samo je jedan od mnogobrojnih uzročnih genetičkih faktora, čiji efekat dodatno može biti modifikovan sredinskim uticajem. Hipoteza “česta bolest – česta varijanta” govori o tome da su uzročnici čestih multifaktorijalnih bolesti genetičke varijante sa visokom učestalošću u opštoj populaciji, pri čemu pojedinačna varijanta ima nisku penetrabilnost i samim tim mali udeo koji doprinosi ispoljavanju fenotipa odnosno bolesti. Svaka od genetičkih varijanti koja doprinosi riziku za razvoj patološkog stanja ili neke druge složene osobine nije nužna, kao ni dovoljna da samostalno uzrokuje fenotipsku promenu. Zbog toga genetičke varijante radije tumačimo kao faktore predispozicije, a ne kao direktne uzročnike razvoja nekog fiziološkog ili patološkog stanja. Međutim, identifikacijom genetičkih varijanti asociраниh sa kompleksnim osobinama i patološkim stanjima, može se doći do otkrića novih uzročnika kao i novih patoloških puteva vrednih daljeg istraživanja (40).

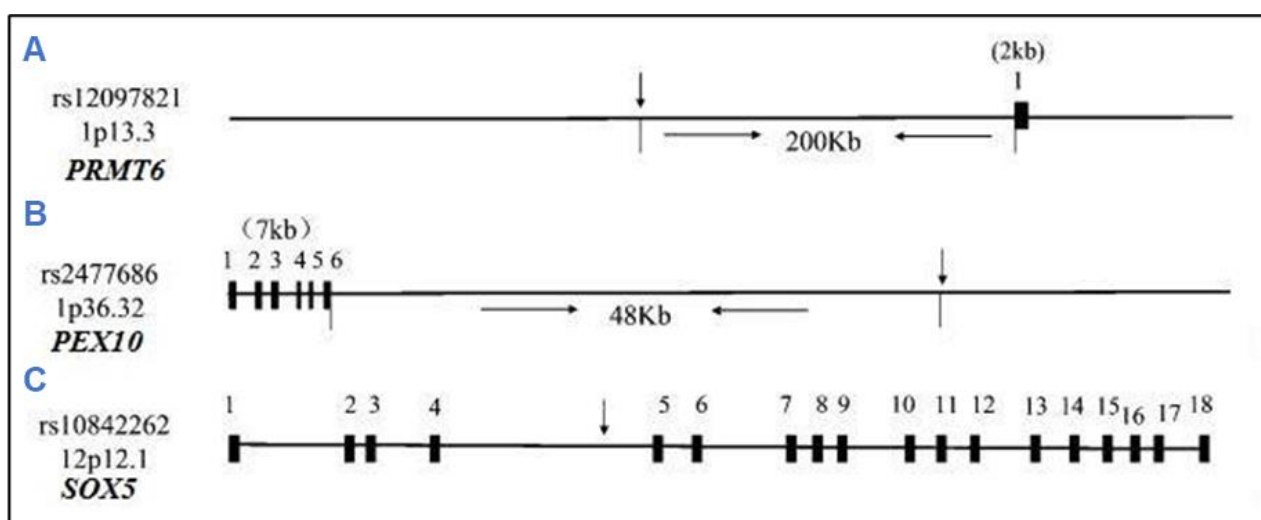
Upravo zbog niske penetrabilnosti čestih genetičkih varijanti koje doprinose ukupnom riziku za razvoj patološkog stanja, kao i zbog složene molekularno-genetičke pozadine, molekularno-genetička osnova bolesti poput muškog steriliteta, ne može se ispitivati kroz uobičajene studije asocijacije na porodicama, već je praktičniji populaciono baziran pristup. Studije asocijacije koje se sprovode sa ciljem identifikacije genetičkih varijanti asociраниh sa idiopatskim sterilitetom kod muškaraca obično su dizajnirane kao studije slučajeva i kontrola, ređe kao studije slučajeva. Prvobitno su rađene studije asocijacije bazirane na genima kandidatima, biranim na osnovu značaja njihovih proteina u razvoju i funkcionisanju reproduktivnog sistema. Iako je doneo neke rezultate, ovaj pristup ubrzo je prevaziđen, pre svega zbog pristrasnosti u izboru gena kandidata, kao i zbog čestih lažno pozitivnih rezultata i loše validacije (41).

Projekat „Genoma čoveka” (eng. *Human Genome Project*, HGP) pružio je mogućnost za metodološke inovacije, prvenstveno u smislu istovremene analize velike količine genetičkih podataka, kao i pratećeg razvoja softvera za obradu dobijenih rezultata genotipizacije. Upravo je na tim temeljima razvijen pristup za studije asocijacije na čitavom genomu bez početne hipoteze, takozvane GWA studije (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWASs) (42).

Prva pilot GWA studija koja je regrutovala muškarce iz Severne Evrope sa dijagnostikovanom azoospermijom i teškom oligozoospermijom, i fertilne muškarce kao kontrolnu

grupu, realizovana je 2009. godine, nakon čega su usledile mnogobrojne studije asocijacije koje su za cilj imale potvrdu značaja i uloge čestih genetičkih varijanti u razvoju muške neplodnosti. GWA studije koje su potom usledile uglavnom su bile dvostepeno dizajnirane, gde je prva faza podrazumevala *skrining*, a druga validaciju rezultata prve faze na većem broju slučajeva i kontrola, dodatno ukazujući na potrebu za regrutovanjem velikog broja ispitanika u ovom tipu studija. Na osnovu rezultata inicijalnih GWA studija demonstrirano je da česte genetičke varijante ne doprinose pojedinačno, već imaju udruženi efekat na ispoljavanje klinički značajnog rizika za razvoj idiopatskog steriliteta kod muškaraca (42).

GWA studija sprovedena u populaciji Kine 2011. godine, regrutovala je muškarce sa dijagnostikovanom azoospermijom bez opstrukcije. U ovoj studiji identifikovane su tri tačkaste genetičke varijante (eng. *single nucleotide variations*, SNVs) rs12097821, rs2477686 i rs10842262, za koje je pokazana statistički značajna asocijacija sa rizikom za razvoj idiopatskog steriliteta kod muškaraca iz Kine (slika 1.2). Identifikovane genetičke varijante lokalizovane su u okviru ili neposrednoj blizini gena za koje je poznato da imaju direktnu ili indirektnu ulogu u determinaciji, diferencijaciji i funkcionisanju muškog reproduktivnog sistema (43).



Slika 1.2. Shematski prikaz regiona genoma koji okružuju genetičke varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262 i strukture blisko pozicioniranih gena *PRMT6*, *PEX10* i *SOX5*. Strelicama su označene pozicije SNVs, dok su crnim pravougaonicima obeleženi egzoni navedenih gena (Preuzeto i modifikovano iz Zou i sar, 2014) (48).

Tačkasta genetička varijanta rs12097821 pozicionirana je 200 kb uzvodno od gena *PRMT6* (eng. *protein arginine N-methyltransferase 6*, *PRMT6*) koji se nalazi na hromozomu 1 (slika 1.2.A). Na eksperimentalnom mišu kao model sistemu pokazano je da utišavanje gena *PRMT6* značajno inhibira migraciju germinativnih ćelija, čime je sugerisano na njegovu ulogu u proliferativnoj fazi procesa spermatogeneze. U istoj studiji, smanjenjem ekspresije (eng. *knocking down*) gena *PRMT6* promovisana je apoptoza germinativnih ćelija, dok je proliferacija ćelija blokirana (44). Dodatno, pokazano je da enzim DNK polimeraza β (*POLB*) formira kompleks sa proteinom *PRMT6*, čime biva metilovana, a njena aktivnost značajno raste. *POLB* je lokalizovana oko homolognih hromozoma tokom procesa mejoze, pa se došlo do zaključka da protein *PRMT6* ima regulatornu ulogu na proces mejotičke rekombinacije, izuzetno važne u samoj spermatogenezi (43).

Tačkasta genetička varijanta rs10842262 nalazi se u okviru introna autozomalnog gena *SOX5* (eng. *SRY-related HMG-box gene 5*, *SOX5*), na kratkom kraku hromozoma 12 (slika 1.2.C). Gen *SOX5* kodira protein koji je član familije transkripcionih regulatora uključenih u determinaciju pola i diferencijaciju polnih ćelija. Članovi porodice gena *SOX*, poput *SOX5*, pokazuju sličnost u delu sekvence koji kodira za DNK vezujući domen sa genom *SRY* odgovornim za determinaciju testisa.

Protein SOX5 kao regulatorni protein transkripcije reguliše ekspresiju gena uključenih u proces spermatogeneze (45).

Genetička varijanta rs2477686 lokalizovana je na prvom autozomalnom hromozomu u blizini gena *PEX10* (eng. *Peroxisome biogenesis factor 10*) (slika 1.2.B). Proteinski produkt *PEX10* karakterističan je za membranu peroksizoma. U OMIM bazi navedeno je da mutacije u genu *PEX10* dovode do neonatalne adrenoleukodistrofije, poremećaja u biogenezi peroksizoma, opisane kao *Zellweger-ov* sindrom (46). Na model sistemu *Drosophila sp.* pokazano je da mutacija u genu *PEX10*, koji je ortologan humanom *PEX10*, dovodi do poremećaja u procesu spermatogeneze, što rezultuje sterilnim muškim fenotipom (47).

Dalja istraživanja uloge ovih gena u razvoju neplodnosti kod muškaraca, kao i uticaj genetičkih varijanti na ekspresiju i funkcionalnost njihovih proteinskih produkata, dovela bi do otkrivanja jednog dela patofizioloških mehanizama koji leže u osnovi muškog steriliteta.

1.4.Uloga oksidativnog stresa u razvoju steriliteta kod muškaraca

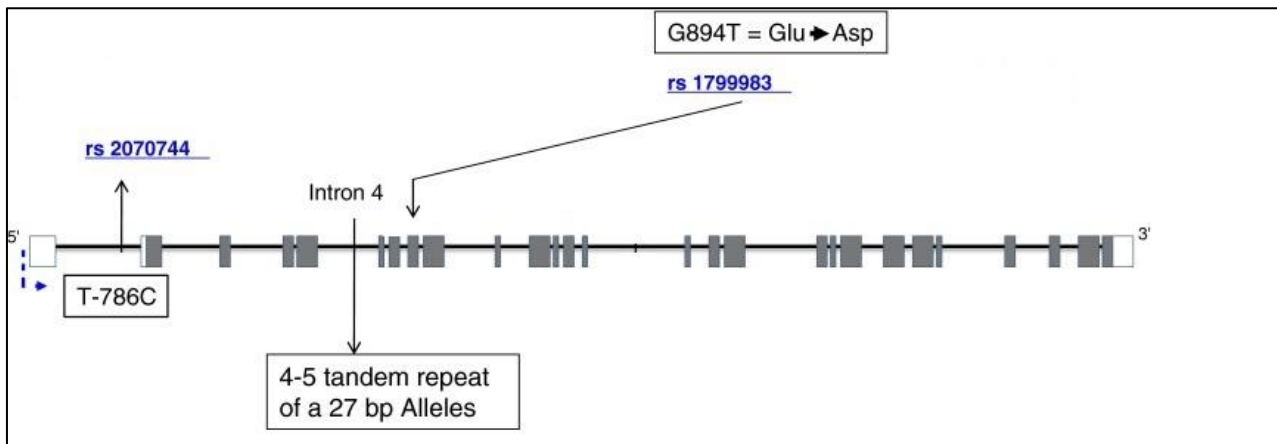
Rezultati brojnih studija pokazali su da je unutarćelijski balans između reaktivnih vrsta kiseonika (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) i antioksidanata od ključne važnosti za pravilno sazrevanje muških germinativnih ćelija, odnosno pravilno odvijanje procesa spermatogeneze. Ćelije u kojima je povećana koncentracija slobodnih radikala nalaze se u stanju oksidativnog stresa (OS), što za posledicu može imati oštećenja kako jedarnih i mitohondrijskih molekula DNK, tako i proteina i lipida ćelijskih membrana. Kao odgovor na ove promene, u ćeliji se aktivira mehanizam programiranog ćelijskog umiranja po tipu apoptoze (49).

Eksperimentalna istraživanja pokazala su da OS ima uticaja na pokretljivost spermatozoida i može biti značajan faktor rizika za pojavu muškog steriliteta (50). Jedan od reaktivnih molekula, koji nastaje u uslovima OS je i azot monoksid (NO), sekundarni glasnik uključen u veliki broj bioloških procesa (51). Azot monoksid nastaje aktivnošću enzima azot-monoksid sintetaze (NOS; EC 1.14.13.39), koji katalizuje oksidaciju L-arginina u L-citrulin. Kod čoveka, tri gena kodiraju za tri izozima azot-oksida sinteze; neuronalnu (nNOS ili NOS1), citokinima indukovanu (iNOS ili NOS2) i endotelnu formu (eNOS ili NOS3) (52).

Enzim azot-monoksid sintetaza 3 (NOS3) konstitutivno se eksprimira u testikularnom tkivu. i produkuje male količine NO koje imaju protektivnu ulogu u uslovima oksidativnog stresa. Povećana koncentracija NO indukuje proces ćelijskog umiranja po tipu apoptoze i utiče na smanjenje pokretljivosti spermatozoida. Imunohistohemijskim metodama, dokazano je prisustvo enzima NOS3 u ćelijama testisa tokom spermatogeneze, kao i u epitelnim ćelijama epididimisa i *vas deferens-a*. Promene u aktivnosti enzima NOS3 i posledično smanjenje fiziološke koncentracije NO mogu predstavljati rizik za nastanak steriliteta kod muškaraca (53–56).

Studije asocijacije koje su istraživali ulogu gena *NOS3* u razvoju muškog steriliteta identifikovale su dve tačkaste genetičke varijante (rs2070744 i rs1799983) i jednu intronsku varijantu po tipu tandemski ponovljene sekvence nukleotida (4a/4b), koje se dovode u vezu sa promenom aktivnosti enzima (slika 1.3). Funkcionalna posledica prisustva manje učestalog alela C genetičke varijante rs2070744 u okviru promotora gena *NOS3* dovodi do zamene timina (T) citozinom (C) na poziciji -786, što za posledicu ima kreiranje regulatornog elementa za koji se vezuje represorni protein transkripcije (57). Prisustvo manje učestalog alela T genetičke varijante rs1799983 u egzonu 7 ima za posledicu promenu aminokiselinske sekvence, pri čemu se glutaminska kiselina zamenjuje asparaginskom kiselinom. Ova aminokiselinska zamena uzrokuje promenu lokalizacije enzima u endotelnim ćelijama, što za posledicu ima promenu u aktivnosti enzima i smanjenu produkciju NO (58).

Do danas je istraživana moguća asocijacija ove tri genetičke varijante u genu *NOS3* sa pojavom muškog steriliteta u studijama slučajeva i kontrola u populacijama Južne Koreje (59), Italije (60), Irana (61), Brazila (62) i Kine (63–65). Rezultati ovih studija nisu potpuno usaglašeni oko uloge analiziranih genetičkih varijanti gena *NOS3* u procesima razvoja steriliteta kod muškaraca, što ostavlja mogućnost sprovođenja studija kontrola i slučajeva i u drugim populacijama.



Slika 1.3. Shematski prikaz regiona genoma koji okružuju genetičke varijante rs2070744, rs1799983 i 4a/4b i strukture gena, *NOS3*. Strelicama su označene pozicije varijanti, dok su pravougaonicima obeleženi egzoni navedenih gena (Preuzeto i modifikovano iz Kim i sar, 2013.) (66).

2. Ciljevi rada

1. Analizirati prisustvo genetičkih promena po tipu varijacija u broju kopija u okviru regiona *AZF* hromozoma Y i ispitati njihovu moguću asocijaciju sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.
2. Ispitati moguću asocijaciju tačkastih genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821, odabranih na osnovu rezultata GWA studije, sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.
3. Spovesti meta-analizu asocijacije genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata GWA studije i rezultata prethodnih studija, sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.
4. Ispitati moguću asocijaciju tačkastih genetičkih varijanti rs1799983 i rs2070744, kao i intronske varijante 4a/4b u genu *NOS3* sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

Formiranje jedinstvene kolekcije genomske DNK izolovanih iz uzoraka periferne krvi i bukalnih briseva muškaraca sa kliničkom dijagnozom steriliteta započeto je u februaru 2016. godine i trajalo je do kraja 2018. godine. Kolekcija genomske DNK izolovane iz pune periferne krvi 118 muškaraca sa sterilitetom dobijena je na osnovu saradnje Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sa Odeljenjem za neurobiologiju, Univerzitet u Beogradu -Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i Centrom za vantelesnu oplodnju „Akademik Vojin Šulović“ Opšte bolnice Valjevo. Kolekcija genomske DNK izolovane iz bukalnih briseva 90 muškaraca sa sterilitetom dobijena je na osnovu saradnje Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu sa Specijalističkom urološkom ordinacijom TTC, Beograd i Klinikom za urologiju Kliničkog centra Srbije.

Muškarci uključeni u ovu studiju dali su informisani pristanak a studija je rađena uz odobrenja Etičkog komiteta Opšte bolnice u Valjevu (broj OBV-02-1170) i Klinike za urologiju Kliničkog centra Srbije (broj 68/5 od 18. 02. 2016 godine).

U analizu asocijacije genetičkih varijanti rs1799983, rs2070744 i intronske varijante 4a/4b u genu *NOS3* sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca u Srbiji uključen je 131 uzorak iz kolekcije sterilnih muškaraca. U analizu asocijacije genetičkih varijanti rs12097821, rs12097821 i rs10842262 sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca u Srbiji uključeno je 208 uzoraka iz kolekcije sterilnih muškaraca koji su bili dostupni u novembru 2017. godine. Prilikom primene metode MLPA u identifikaciji varijacija u broju kopija regiona *AZF* hromozoma Y kod muškaraca sa idiopatskim sterilitetom uključeno je 105 uzoraka molekula DNK iz kolekcije sterilnih muškaraca, izolovanih iz pune periferne krvi, koji su bili dostupni u novembru 2017. godine.

Kontrolnu grupu činili su uzorci genomske DNK iz kolekcije uzoraka fertilnih muškaraca formirane u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2. Metode

3.2.1. Stratifikacija uzoraka sterilnih muškaraca na osnovu kliničke dijagnoze

Dijagnostika steriliteta sprovedena je prema standardnom protokolu koji uključuje klinički pregled i analizu spermograma. Na osnovu kriterijuma preporučenih od strane Evropskog udruženja urologa (67), sterilni muškarci raspoređeni su u dve grupe.

Prvu grupu činili su muškarci sa postavljenom dijagnozom oligoastenozoospermije (eng. *oligoasthenozoospermia*), kod kojih je broj spermatozoida u ejakulatu bio ispod 15 miliona/ml, a broj progresivno pokretnih spermatozoida ispod 32% od ukupnog broja.

Drugu grupu činili su muškarci sa postavljenom dijagnozom azoospermije bez opstrukcije (eng. *Non-obstructive azoospermia*, NOA), kod kojih nije bilo prisutnih spermatozoida u ejakulatu i kod kojih nije postojala opstrukcija semenih kanala.

3.2.2. Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i briseva bukalne sluznice

Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i bukalnih briseva vršena je pomoću komercijalnog kita *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.

Procedura izolovanja genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi:

1. U mikrotube od 1,5 ml dodavano je: 200 µl pune periferne krvi, 200 µl AL pufera i 2 µl proteinaze K;
2. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 10 minuta na 56° C;
3. Dodavano je 200 µl 96% etanola, vorteksovano 15 sekundi i centrifugirano na 8000 rpm (eng. *rotation per minute*, rpm) 1 minut (*Labofuge 400R*, rotor 3324, *Heraeus instruments*, Nemačka);
4. U kolonice je dodavano po 600 µl inkubirane smeše. Kolonice su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut;
5. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube, dodavano je 500 µl AW1 pufera i centrifugirane su na 8000 rpm 1 minut;
6. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube, dodavano je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su na 13000 rpm 3 minuta;
7. Kolonice su smeštane u nove mikrotube od 1,5 ml i DNK sa membrane kolonice eluirana je sa 150 µl dejonizovane vode (*Nuclease-Free Water*, *Qiagen*, Nemačka);
8. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirana na 13000 rpm 60 minuta;
9. Izolovana DNK čuvana je na + 4° C.

Procedura izolovanja geomske DNK iz briseva bukalne sluznice:

1. Vrhovi drvenih štapića sa vatom na kojoj su se nalazili uzorci bukalne sluznice isecan su i stavljani u mikrotube zapremine 1,5 ml;
2. U mikrotube sa brisevima dodavano je 300 µl pufera TE, 300 µl AL pufera i 2 µl proteinaze K;
3. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 30 minuta na 56° C;
4. Dodavano je 200 µl 96% etanola, vorteksovano 15 sekundi i centrifugirano na 8000 rpm 1 minut;
5. U kolonice je dodavano po 700 µl uspostavljene smeše. Kolonice su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut;
6. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube, dodavano je 500 µl AW1 pufera i centrifugirane su na 8000 rpm 1 minut;
7. Kolonice su smeštane u nove kolektorske tube, dodavano je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su na 13000 rpm 3 minuta;
8. Kolonice su smeštane u nove mikrotube od 1,5 ml i DNK sa membrane kolonice je eluirana sa 60 µl dejonizovane vode (*Nuclease-Free Water*, *Qiagen*, Nemačka);
9. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirana na 13000 rpm 1 minut;
10. Izolovana DNK čuvana je na + 4° C.

Količina i kvalitet izolovane genomske DNK proveravani su elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Vizuelizacija uzoraka vršena je dodavanjem Midori Green-a (*NIPON Genetics*, Nemačka) u gel. Kvalitet izolovane genomske DNK određivan je posmatranjem DNK u agaroznom gelu na transiluminatoru. Prisustvo jedne diskretne trake ukazivalo je na to da je izolovana DNK nativna, dok je prisustvo razmaza ukazivalo delimičnu ili potpunu degradaciju izolovane DNK (68).

Kvantifikacija izolovane genomske DNK vršena je poređenjem intenziteta fluorescencije analiziranih DNK i standarda DNK.

Provera količine i kvaliteta izolovane genomske DNK vršena je prema sledećem protokolu:

1. 0,8% rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) zagrevan je do ključanja u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris – borat, 1 mM EDTA, pH 8);
2. Dodavan je *Midori Green* (*NIPON Genetics*, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 0,3 µg/ml, a gel je hlađen do 40°C;
3. Ohlađen rastvor nalivan je u kadicu za elektroforezu i ostavljan je da polimerizuje 30 do 45 minuta na sobnoj temperaturi;
4. Uzorci DNK (5 µl) mešani su sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenol plavo (w/v) 30% glicerol) u odnosu 5:1 i nalivani na gel;
5. Za kvantifikaciju izolovane genomske DNK korišćen je marker K562 (*Promega*, SAD), a pri nanošenju na gel tretiran je jednako kao i DNK uzorci;
6. Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u sistemu za elektroforezu (*Mini-sub Cell GT* ili *Wide Mini-sub Cell GT*, *BioRad*, SAD);
7. Po završetku elektroforeze, gel je preuziman iz sistema i izlagan UV svetlu ($\lambda = 254$ nm) na transiluminatoru (*Mini-transiluminator*, *BioRad*, SAD).

Određivanje koncentracije izolovane genomske DNK, izolovane iz uzoraka periferne krvi, vršena je na fluorometru (*QubitR 2.0 Fluorometer*, *Invitrogen*, SAD) korišćenjem komercijalnog kita *Qubit™ dsDNA BR Assay Kits* (*Invitrogen*, SAD), prema sledećem protokolu:

1. Qubit™ radni rastvor pripreman je mešanjem Qubit™ dsDNA BR reagensa sa Qubit™ dsDNA BR puferom u odnosu 1:200;
2. Dodavano je po 190 µl radnog rastvora u svaku ependorf epruvetu za standarde.
3. Zatim je dodavano po 10 µl svakog Qubit™ standarda u odgovarajuću ependorf epruvetu i smeša je kratko vorteksovana;
4. U ependorf epruvete za uzorke dodavano je 195 µl radnog rastvora, a potom je ispipetirano 5 µl uzorka DNK u odgovarajuće epruvete;
5. Smeša je kratko vorteksovana pre nego što su koncentracije izmerene na aparatu.

3.2.3. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu *NOS3*

Tri genetičke varijante odabrane su na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome-wide association study*, GWAS) koja je sprovedena u populaciji Kine (43). Genetičke varijante birane su na osnovu minimum dva od sledeća tri kriterijuma:

- a) Potvrđena asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u studiji asocijacije na čitavom genomu,
- b) Analizirana asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u replikativnim studijama sprovedenim u drugim populacijama,
- c) Potvrđena asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u replikativnim studijama sprovedenim u drugim populacijama.

Gen *NOS3* koji kodira enzim azot-monoksid sintazu 3 odabran je kao kandidat gen za analizu asocijacije sa muškim sterilitetom. Osnovni kriterijum prilikom izbora gena *NOS3* kao gena kandidata bila je njegova uloga u oksidativnom stresu za koji je pokazano da negativno utiče na broj i pokretljivost spermatozoida kod muškaraca. Genetičke varijante u ovom genu birane su na osnovu minimum dva od sledeća tri kriterijuma:

- a) Analizirana asocijacija genetičkih varijanti sa muškim sterilitetom u drugim populacijama,
- b) Potvrđena asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u drugim populacijama,
- c) Utvrđena povezanost genetičkih varijanti sa izmenjenim nivoom ekspresije gena *NOS3*.

3.2.4. Genotipizacija genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu *NOS3*

Genotipizacija varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu, i varijanti rs2070744 i rs1799983 koje se nalaze u genu *NOS3*, rađena je primenom metode analize polimorfizama u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Intronska varijanta 4a/4b koja se nalazi u okviru gena *NOS3* genotipizovana je metodom lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR).

PCR metoda omogućava selektivnu *in vitro* amplifikaciju određenog fragmenta molekula DNK. Sinteza segmenata molekula DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom, a selektivnost reakcije ogleda se u upotrebi prajmera, oligonukleotida dužine 14-40 nukleotida, koji hibridizuju sa komplementarnim sekvencama u molekulu DNK. PCR reakcija odvija se u mikrotubama koje se podvrgavaju preciznim, cikličnim promenama temperature (69). RFLP metoda bazira se na razlikama u dužini fragmenata koji se dobijaju kao produkti reakcije restrikcione digestije primenom enzima restrikcionih endonukleaza tipa II. Fragmenti molekula DNK u okviru kojih su se nalazile ispitivane genetičke varijante umnožavani su lančanom reakcijom polimeraze, a zatim je vršena restrikciona digestija PCR produkata (69).

Za izvođnje reakcije PCR korišćeni su prajmeri čije su sekvence predstavljene u tabeli 3.1. Sastavi PCR reakcionih smeša predstavljani su u tabeli 3.2, tabeli 3.3, tabeli 3.4 i tabeli 3.5. Temperaturni profili PCR reakcija, kao i očekivane dužine umnoženih fragmenata nalaze se u tabeli 3.6.

Tabela 3.1. Osnovne karakteristike prajmera korišćenih u PCR reakcijama kojima su umnožavani fragmenti DNK koji okružuju varijante dobijene na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i varijanti u genu *NOS3*.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Dužina sekvence
rs10842262-fw	5'-GGCCCAGAAAGACAAATACT-3'	20 bp
rs10842262-rv	5'-ATTGTTATCTCCAGCCATAC-3'	20 bp
rs2477686-fw	5'-GCAGTGTTTCGTCCTGCAATC-3'	20 bp
rs2477686-rv	5'-TGCTAGCAGCATCCACAGTC-3'	20 bp
rs12097821-fw	5'-GCAGTTGTATACTTATGCAC-3'	20 bp
rs12097821-rv	5'-CAGAGAGTTTTAGATTGCCT-3'	20 bp
rs2070744-fw	5'-ATGCTCCCACCAGGGCATCA-3'	20 bp
rs2070744-rv	5'-GTCCTTGAGTCTGACATTAGGG-3'	22 bp
rs1799983-fw	5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3'	21 bp
rs1799983-rv	5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'	22 bp
nos3_4a_4b_fw	5'-CTATGGTAGTGCCTTGGCTGGAGG-3'	24 bp
nos3_4a_4b_rv	5'-ACCGCCCAGGGAAGCTCCGCT-3'	21 bp

Prajmeri korišćeni za umnožavanje fragmenata molekula DNK koji sadrže varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262 dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i intronske varijante 4a/4b u okviru gena za *NOS3*, dizajnirani su korišćenjem softverskog programa Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research, SAD*) (70). Sekvence prajmera korišćenih u PCR reakciji za umnožavanje fragmenata DNK koji sadrže varijante rs2070744 i rs1799983 u genu *NOS3*, preuzeti su iz prethodno objavljenih studija (71,72).

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

Komponente	Osnovna Koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
PCR pufer A sa sadrži 15 mm MgCl ₂ (Kapa Biosystems, SAD)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (Fermentas, Litvanija)	10 mM	200 µM	0.3
Prajmer Rv	10 µM	0.2 µM	0.3
Prajmer Fw	10 µM	0.2 µM	0.3
BSA	166.67 µg/µl	10 µg/µl	0.9
Taq polimeraza (Kapa Biosystems, SAD)	5 U/µl	0.04 U/µl	0.12
DNK	/	/	1.5
Dejonizovana voda (Serva, SAD)	/	/	10.08
Ukupno			15

Tabela 3.3. Sastav PCR smeše za umnožavanje DNK regiona koji okružuje genetičku varijantu rs1799983.

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
PCR pufer A sa sadrži 15 mm MgCl ₂ (Kapa Biosystems, SAD)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (Fermentas, Litvanija)	10 mM	200 µM	0.3
Prajmer Rv	10 µM	0.2 µM	0.3
Prajmer Fw	10 µM	0.2 µM	0.3
BSA	166.67 µg/µl	10 µg/µl	0.9
Taq polimeraza (Kapa Biosystems, SAD)	5 U/µl	0.04 U/µl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Serva, SAD)	/	/	9.58
Ukupno			15

Tabela 3.4. Sastav PCR smeše za umnožavanje DNK regiona koji okružuje genetičku varijantu rs2070744.

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (μl)
PCR pufer A sa sadrži 15 mm MgCl ₂ (Kapa Biosystems, SAD)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (Fermentas, Litvanija)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	1.5
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	1.5
BSA	166.67 μg/μl	10 μg/μl	0.9
Taq polimeraza (Kapa Biosystems, SAD)	5 U/μl	0.03	0.12
DNK	/	/	3
Dejonizovana voda (Serva, SAD)	/	/	6.18
Ukupno			15

Tabela 3.5. Sastav PCR smeše za umnožavanje DNK regiona koji okružuje intronsku varijantu 4a/4b.

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (μl)
PCR pufer A sa sadrži 15 mm MgCl ₂ (Kapa Biosystems, SAD)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (Fermentas, Litvanija)	10 mM	200 μM	0.15
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.15
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.15
BSA	166.67 μg/μl	10 μg/μl	0.9
Taq polimeraza (Kapa Biosystems, SAD)	5 U/μl	0.03	0.12
DNK	/	/	1.5
Dejonizovana voda (Serva, SAD)	/	/	10.53
Ukupno			15

Tabela 3.6. Temperaturni profili PCR reakcija i dužine amplifikovanih DNK fragmenata koji okružuju analizirane genetičke varijante.

Genetička varijanta	Temperaturni profil			Dužina fragmenta
	1x	35x	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
	1x	30x	1x	
rs2070744	97°C/3 min	95°C/60s 51°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	237 bp
	1x	40x	1x	
rs1799983	97°C/3 min	95°C/60s 56°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	206 bp
	1x	35x	1x	
4a/4b	97°C/3 min	95°C/60s 62°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	169 i 196 bp

Uspešnost i specifičnost reakcije PCR proveravana je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Prisustvo jedne diskretne trake očekivane dužine ukazivao je na specifičnu amplifikaciju željenog fragmenta molekula DNK. Za određivanje dužine umnoženog fragmenta DNK korišćeni su DNK standardi za dužinu (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* ili *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*, 23, *Fermentas*, Nemačka), koji su prilikom nanošenja na gel tretirani jednako kao i produkti PCR reakcije. Procedura pripreme gela, elektroforeze i vizuelizacije PCR produkata vršena je prema sledećem protokolu:

- 1,5% rastvor agaroze zagrevan je do ključanja u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris – borat, 1 mM EDTA, pH 8);
- Dodavan je *Midori Green* (*NIPON Genetics*, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 0,3 µg/ml ili Et-Br (*Tokyo chemical industry co., ltd*, Japan) u krajnjoj koncentraciji od 0,5 µg/ml;
- Ohlađen rastvor nalivan je u kadicu oblepljenu lepljivom trakom i ostavljan je da polimerizuje 30 – 45 minuta na sobnoj temperaturi;
- PCR uzorci (5 µl) mešani su sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenol-plavo (w/v), 30% glicerol i ksilencijanol) u odnosu 5:1 i nalivani na gel;
- Za proveru očekivane veličine PCR produkata korišćeni su markeri *pUC19 DNA/MspI Marker* ili *50 bp DNA ladder* (*Fermentas*, Litvanija) (1 µl), a pri nanošenju na gel tretirani su jednako kao i uzorci DNK.
- Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u sistemu za elektroforezu (*Mini-sub Cell GT* ili *Wide Mini-sub Cell GT*, *BioRad*, SAD);
- Po završetku elektroforeze, gel je izlagan UV svetlu ($\lambda=254$ nm) na transiluminatoru (*Mini-transilluminator*, *BioRad*, SAD).

Genotipizacija intorske varijante 4a/4b u genu za *NOS3* vršena je interpretacijom rezultata elektroforeze u 3% agaroznom gelu, prema gore navedenom protokolu. Prisustvo trake veličine 169

bp ukazivalo je na prisustvo manje učestalog alela 4a, dok je prisustvo trake veličine 196 bp ukazivalo na prisustvo više učestalog alela 4b.

Produkti PCR reakcije u zapremini od 10 µl korišćeni su prilikom pripreme reakcione smeše za digestiju restrikcijom endonukleazama. U digestionu smešu dodat je restrikcioni enzim, njemu odgovarajući pufer i dejonizovana voda. Osnovne karakteristike endonukleaza korišćenih u analizi genetičkih varijanti nalaze se u tabeli 3.7. Restrikcijom digestija produkata PCR reakcije vršena je preko noći inkubacijom na temperaturi optimalnoj za aktivnost endonukleaza.

Tabela 3.7. **Karakteristike restrikcijom endonukleaza korišćenih za genotipizaciju tačkastih genetičkih varijanti.**

Endonukleaza	Genetička varijanta	Restrikcijom mesto ^a	Pufer	Temperatura digestije	Dužine restrikcijom fragmenata
FspBI	rs10842262 (G/C)	5'-CTAG-3'	Tango buffer	37°C	89 i 136 bp
FspBI	rs2477686 (C/G)	5'-CTAG-3'	Tango buffer	37°C	73 i 173 bp
AluI	rs12097821 (T/G)	5'-AGCT-3'	Tango buffer	37°C	139 i 78 bp
MspI	rs2070744 (C/T)	5'-CCGG-3'	Tango buffer	37°C	156, 81, 46 i 35 bp
MboI	rs1799983 (T/G)	5'-GATC-3'	Buffer R	37°C	119 i 87 bp

^a alelske varijante koje kreiraju restrikcijom mesto prikazane su podebljanim slovima

Produkti restrikcijom digestije razdvajani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Procedura pripreme gela, elektroforeze i vizuelizacije fragmenata DNK opisana je prethodno u ovom poglavlju. Genotip analiziranih uzoraka određivan je interpretacijom rezultata elektroforeze.

Za genotip TT genetičke varijante rs12097821 očekivano je prisustvo traka dužine 139 i 78 bp, za genotip TG tri trake dužine 217, 139, i 78 bp, dok za genotip TT samo jedne trake dužine 217 bp. Očekivane dužine restrikcijom produkata za genotip CC genetičke varijante rs2477686 bile su 173 i 73 bp, za genotip CG 246, 173 i 73 bp, a za genotip GG 246 bp. I na kraju, očekivane dužine restrikcijom produkata za genotip GG genetičke varijante rs10842262 bile su 136 i 89 bp, za genotip GC 225, 136 i 89 bp i 225 bp za genotip CC.

Genotip TT genetičke varijante rs1799983 detektovan je na osnovu prisustva dve trake dužine 87 i 119 bp, genotip TG na osnovu tri trake dužine 87, 119 i 206 bp, dok je genotip GG detektovan na osnovu jedne trake dužine 206 bp. Očekivane dužine restrikcijom produkata za genotip CC genetičke varijante rs2070744 bile su 35, 46 i 156 bp, genotip TG četiri trake dužine 35, 46, 81 i 156 bp, dok je za genotip TT očekivano prisustvo dve trake dužine 81 i 156 bp.

3.2.5. Provera validnosti RFLP metode za genotipizaciju genetičke varijante rs10842262 korišćenjem metode bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja

U nastojanju da se utvrdi validnost rezultata genotipizacije genetičke varijante rs10842262 dobijenih metodom RFLP, za 144 nasumično odabranih uzoraka fertilnih kontrola i 96 uzoraka sterilnih muškaraca, ponovljena je genotipizacija korišćenjem metode bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja u kombinaciji sa kapilarnom gel elektroforezom.

Reakcija bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja urađena je korišćenjem *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD) u ukupnoj zapremini od 15 µl. Sastav reakcione smeše i krajnje koncentracije/zapremine komponenata bili su sledeći: 1 µl BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 1 µl BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer, 0,16 µM uzvodni prajmer (5'-AGCTGCAGAGGTGGATGAAG-3'), 1,27 M betain i produkti PCR reakcije u ukupnoj zapremini od 10 µl.

Kapilarna gel elektroforeza sprovedena je na automatskom sekvenceru *Applied Biosystems™ 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA). Očitavanje sekvenci rađeno je uz pomoć softverskog paketa *Sequencing Analysis Software v6.0* (Thermo Fisher Scientific, SAD) dok je analiza sekvenci rađena u okviru programa BioEdit (*Ibis Biosciences, SAD*).

3.2.6. Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca

Provera kvaliteta rezultata genotipizacije, kao i pravilne selekcije i genetičke strukture kontrolne grupe podrazumevala je analizu prisustva Hardy–Vainbergove ravnoteže u različitim grupama ispitanika. Analiza prisustva Hardy-Vajnbergove ravnoteže sprovedena je zasebno za grupu uzoraka poreklom od muškaraca sa sterilitetom, i grupu uzoraka poreklom od fertilnih muškaraca (kontrolna grupa). Za navedene analize korišćen je egzaktni test u okviru softverskog paketa SNPStats (*Catalan Institute of Oncology, Španija*) (73).

Nakon provere potencijalnog odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, testirana je asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca. Korišćenjem statističkih testova analizirane su razlike u distribucijama genotipova između sterilnih muškaraca i muškaraca iz kontrolne grupe, kao i između grupa muškaraca formiranih na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta i kontrolne grupe (73).

Za statističku obradu rezultata genotipizacije korišćen je program SNPStats (*Catalan Institute of Oncology, Barselona, Španija*) (73). Primenjeni statistički testovi asocijacija zasnovani su na logističkoj regresiji, a kao mera asocijacije određenog alela ili genotipa sa rizikom za razvoju steriliteta korišćen je odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR). Odnos šansi pokazuje koliko je verovatnoća razvoja steriliteta veća kod osoba koje poseduju određeni alel ili genotip u odnosu na osobe koje ovaj alel ne poseduju ili imaju neki drugi genotip iste genetičke varijante (74). Prilikom izračunavanja vrednosti OR, kao referentni genotip ili alel korišćen je homozigotni genotip učestalijeg alela, odnosno učestaliji alel. Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni za koje je dobijena *P* vrednost manja od 0,05. *P* vrednosti $\geq 0,05$ i $< 0,1$ smatrane su statističkim trendom asocijacije.

Prilikom procene asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije, testirani su različiti genetički modeli: dominantni, recesivni, overdominantni, kodominantni i log-aditivni model. Procena najadekvatnijeg genetičkog modela za ustanovljene asocijacije vršena je na osnovu vrednosti Akaike informacionog kriterijuma (eng. *Akaike information criterion*, AIC) (75). Model za koji je dobijena najmanja vrednost AIC smatran je najadekvatnijim genetičkim modelom za analiziranu asocijaciju. Ukoliko je razlika u vrednostima najmanjih dobijenih AIC u istom testu bila manja od 2, svaki od genetičkih modela kojima odgovaraju ove vrednosti AIC smatran je potencijalno relevantnim i nije se smatralo statistički opravdanim donošenje zaključka o najadekvatnijem genetičkom modelu.

3.2.7. Meta-analiza analiziranih genetičkih varijanti selektovanih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca i rezultata prethodnih studija vezanih za muški sterilitet

Naučne publikacije uključene u meta-analizu identifikovane su na osnovu pretrage *PubMed* baze podataka. Pretraživanje baze zasnivalo se na upotrebi kombinacija sledećih ključnih reči:

- a) “sterilitet” (eng. *infertility*), “azoospermia”, “asthenozoospermia”, “oligoasthenozoospermia” ili “oligospermia”;
- b) “Asocijacija” (eng. *association*), “polimorfizam” (eng. *polymorphism*), “SNP” ili “varijanta(e)” (eng. *variant(s)*); i
- c) Ime genetičke varijante ili imena gena (“*PRMT6*” ili “rs12097821”, “*PEX10*” ili “rs2477686”, “*SOX5*” ili “rs10842262”).

Prilikom definisanja kriterijuma pretrage uključene su i studije objavljene na drugim jezicima osim engleskog, kako bi se izbeglo izostavljanje rezultata iz pojedinih populacija, a time i izvor potencijalne greške uzrokovane razlikama prisutnih u okviru različitih populacija. Pretraga je bila ograničena na radove sa dostupnim celokupnim tekstom.

Pretraga baze podataka rezultovala je većim brojem preklapajućih rezultata dobijenih korišćenjem više kombinacija ključnih reči. Nakon isključivanja duplikata publikacija, pristupljeno je analizi referenci pronađenih naučnih publikacija. Analiza referenci originalnih studija, revijskih radova i prethodnih meta-analiza sprovedena je sa ciljem identifikacije dodatnih studija koje bi bile pogodne za uključivanje u meta-analizu. Selekcija potencijalnih referenci pogodnih za detaljniju analizu sa ciljem procene pogodnosti za meta-analizu vršena je na osnovu naslova.

Izabrani radovi objavljeni su do oktobra 2018. godine. U proces selekcije uključeni su i radovi koji su u tom trenutku bili objavljeni samo u elektronskoj formi. Studije koje nisu vezane za temu istraživanja, a bile su rezultat pretrage baze podataka, identifikovane su na osnovu iščitavanja naslova i apstrakata i isključivane iz dalje analize.

3.2.7.1. Procena pogodnosti studija za uključivanje u meta-analizu

Nakon inicijalne pretrage na osnovu naslova i apstrakata, među studijama relevantnim za temu istraživanja za dalju analizu selektovane su one koje studije se ispunjavale sve navedene kriterijume:

- a) Predstavljaju studije asocijacije genetičkih varijanti rs12097821, rs2477686 ili rs10842262, sa rizikom za razvoj steriliteta kod muškaraca;
- b) Dizajn studije odgovara studijama slučajeva i kontrola;
- c) Objavljene su distribucije alela i genotipova na osnovu kojih se mogu dobiti rezultati predstavljeni odnosom šansi (OR) sa 95% intervalom poverenja (CI) i *P* vrednošću;
- d) Poseduju detaljne informacije o procedurama regrutovanja učesnika u studiji, dijagnostičkim protokolima i kriterijumima za postavljanje kliničke dijagnoze steriliteta, metodama genotipizacije, statističkoj obradi podataka i druge relevantne metodološke podatke.

Prilikom selekcije radova pored teksta publikacije, analiziran su i dodatni materijali dostupni u elektronskom formatu. Iz meta-analize isključene su studije sa očiglednim greškama u prikazu rezultata, poput neusaglašenosti između teksta u tabelama i delovima rada u kojem se navode rezultati. Svaka studija koja nije ispunjavala minimum jedan od prethodno navedenih kriterijuma isključivana je iz dalje analize.

3.2.7.2. Ekstrakcija podataka iz studija selektovanih za meta-analizu

Iz svake studije selektovane za uključivanje u meta-analizu izdvojeni su sledeći podaci:

- a) Prezime prvog autora publikacije;
- b) Godina publikovanja rada;
- c) Država u kojoj je studija sprovedena;
- d) Etničko poreklo učesnika u studiji;
- e) Karakteristike kontrolne grupe, uključujući način regrutovanja;
- f) Dizajn studije i primenjene metode;
- g) Veličina uzorka;
- h) Analizirane genetičke varijante; i
- i) Broj genotipova i alela analizirane genetičke varijante ili dostupna vrednost OR sa 95% CI i P vrednost;

Izabrane studije podeljene su u grupe na osnovu genetičkih varijanti koje su analizirane u kontekstu asocijacije sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca. Meta-analiza je sprovedena samo u slučajevima kada je tri ili više studija uključivalo analizu efekata pojedinačne varijante. U slučajevima kada su pojedinačne studije uključivale dve ili više grupa ispitanika sa različitim kliničkim dijagnozama steriliteta, formirani su paneli koji su nezavisno uključeni u meta-analizu, iako neki od panela pripadaju istoj studiji.

3.2.7.3. Softverski paketi i statistički testovi korišćeni u okviru meta-analize

Analiza heterogenosti studija i meta-analize za pojedinačne grupe sprovedene su pomoću statističkog softvera *Open Meta-analyst* (Tufts Medical Center, SAD) (76). Kohranov Q statistički test (eng. *Cochran's Q test*) dostupan u okviru navedenog softverskog paketa korišćen je u kombinaciji sa određivanjem indeksa nedoslednosti (eng. *inconsistency index*, I^2) za analizu heterogenosti rezultata studija.

Heterogenost rezultata studija smatrana je značajnom u slučajevima kada je P vrednost dobijena primenom Kohranovog Q testa bila manja od 0,1. Vrednosti I^2 od 0% do 25% ukazuje na odsustvo heterogenosti, vrednosti I^2 od 25% do 50% na umerenu heterogenost, vrednosti I^2 od 50% do 75% na veliku heterogenost, dok su vrednosti I^2 od 75% do 100% ukazuje na ekstremnu heterogenost studija. Ukoliko nije pokazana značajna heterogenost rezultata studija i panela ($P \geq 0,1$ ili $I^2 < 50\%$) korišćen je model fiksiranog efekta (eng. *fixed-effect model*) za meta-analizu, dok je prisustvo značajne heterogenosti uslovljavalo korišćenje modela neuređenih efekata (eng. *random-effects model*). Za svaku meta-analizu korišćen je model biran na osnovu procenjene heterogenosti rezultata studija i panela u okviru odgovarajućeg seta, nezavisno od heterogenosti procenjene na nivou ukupne kolekcije studija.

Vrednosti OR i njihovih 95% CI izračunate su za svaku genetičku varijantu korišćenjem modela fiksiranog efekta ili modela neuređenih efekata u zavisnosti od heterogenosti rezultata studija. Prilikom korišćenja modela fiksiranog efekta za meta-analizu studija sa heterogenošću rezultata ispod praga statističke značajnosti, *Mantel-Haenszel* metoda inverzne vrednosti varijanse korišćena je za dodeljivanje vrednosti "težine" (eng. *weighting*), odnosno veličine učinka pojedinačnim studijama i panelima (77). Za model neuređenih efekata, u istu svrhu korišćen je metod koji su predložili DerSimonian i Laird (78). Na osnovu rezultata pojedinačnih studija uključenih u meta-analizu u vidu vrednosti OR i njihovih 95% CI konstruisani su "Šumski dijagrami" (eng. *Forest plots*). Za svaku meta-analizu izračunavane su P vrednosti, a kao prag statističke značajnosti korišćena je P vrednost od 0,05.

Zasebne meta-analize sprovedene su za dominantni, recesivni i overdominantni genetički model, kao i za efekte manje učestalog alela genetičkih varijanti, njegovih homozigota i heterozigota. Kao referentni genotip u navedenim poređenjima korišćen je homozigot učestalijeg alela ili učestaliji alel.

Prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija procenjavano je primenom Egerovog testa (79), kao i analizom asimetrije Funel dijagrama. Vrednost praga statističke značajnosti u Egerovom testu iznosila je 0,05.

3.2.8. Identifikacija varijacija u broju kopija regiona AZF hromozoma Y kod sterilinih muškaraca primenom metode višestrukog umnožavanja ligiranih proba (MLPA)

Metoda višestrukog umnožavanja ligiranih proba korišćena je za analizu varijacija broja kopija u okviru regiona AZF hromozoma Y. MLPA metoda pruža mogućnost analize više od 50 različitih ciljnih sekvenci u jednoj reakciji. Bitna karakteristika ove metode je ta što omogućava višestruko umnožavanje jedinstvenih, ligiranih proba, komplementarnim sekvencama od interesa. Korišćenjem jednog para prajmera tokom PCR reakcije umnožavaju se sve vezane probe čime je omogućena relativna kvantifikacija sekvenci od interesa, odnosno posredno prebrojavanje broja kopija hromozomskih regiona, gena ili čak delova gena (80).

Svaka MLPA proba sastoji se iz dve oligonukleotidne sekvence. Specifično dizajnirane sekvence nalaze se na suprotnim krajevima oligonukleotida i poseduju jedinstveni deo komplementaran sekvencama od interesa. Pored jedinstvenog, sadrže i jedan univerzalni deo zajednički za sve probe, koji omogućava istovremeno umnožavanje svih proba tokom PCR reakcije. Da bi se proba amplifikovala, neophodno je da obe oligonukleotidne sekvence pronađu sebi komplementarne sekvence u okviru molekula DNK i da se prilikom vezivanja za molekul DNK pozicioniraju tako da između njih može doći do procesa ligacije. Takođe, jedan ili oba oligonukleotida poseduju i umetnutu sekvencu (eng. *stuffer* sekvencu) jedinstvene dužine koja uslovljava da po završetku amplifikacije svaka proba bude različite dužine, što omogućava razdvajanje i razlikovanje proba korišćenjem kapilarne elektroforeze (81).

Reakcija višestrukog umnožavanja ligiranih proba može se podeliti u pet koraka:

- a) Denaturacija molekula DNK (matrice) i hibridizacija proba;
- b) Reakcija ligacije;
- c) PCR umnožavanje uspešno ligiranih proba;
- d) Razdvajanje smeše umnoženih produkata kapilarnom elektroforezom; i
- e) Analiza rezultata upotrebom različitih softvera;

U prvom koraku, DNK matrica se denaturiše i inkubira sa smešom MLPA proba. Probe pronalaze komplementarne sekvence u molekulu DNK i vezuju se za njih. Samo u slučajevima kada se oba dela probe u potpunosti vežu za ciljanu sekvencu, moguća je reakcija ligacije. Uspešno ligirane probe umnožavaju se PCR reakcijom korišćenjem jednog para prajmera, pri čemu je jedan prajmer fluorescentno obeležen. Produkti PCR reakcije razdvajaju se kapilarnom elektroforezom pod denaturišućim uslovima, a obrada i vizuelizacija rezultata vrši fragment analizom korišćenjem softvera *Coffalyser* (MRC-Holland, Holandija).

Apsolutni intenzitet fluorescencije koji se dobija po završenoj kapilarnoj elektroforezi ne predstavlja direktan pokazatelj broja kopija ciljnih sekvenci. Da bi se utvrdio broj njihovih kopija, signali koji potiču od proba prolaze kroz dva koraka normalizacije. Prva normalizacija, odnosno prvo ujednačavanje podataka, obavlja se unutar samog uzorka (eng. *intra-sample normalisation*) i tom prilikom se signali koji potiču od intenziteta fluorescencije svake od proba koriguju prema signalima koji potiču od intenziteta fluorescencije referentnih proba. Referentne probe detektuju sekvence za

koje se očekuje da imaju neizmenjen broj kopija u svim uzorcima. Signali dobijeni u prvom prolaze i drugi korak normalizacije u kome se koriguju relativni nivoi fluorescencije svih proba u ispitivanom uzorku u odnosu na nivo fluorescencije proba iz referentnih uzoraka (eng. *inter-sample normalisation*). Za referentne DNK uzorke očekuje se da imaju neizmenjen broj kopija svih sekvenci detektovanih od strane kako specifičnih tako i referentnih proba. Intenzitet signala dobijen na ovaj način pokazatelj je broja sekvenci od interesa i može se koristiti za interpretaciju rezultata.

Identičan obrazac signala u ispitivanom uzorku sa obrascem signala koji imaju probe u referentnom uzorku, ukazuje na odsustvo genetičkih rearanžmana koji bi doveli do promena u broju kopija sekvenci od interesa u ispitivanom uzorku. Odsustvo signala ukazivao je na prisustvo delecija, parcijalne delecije manifestuju se smanjenjem intenziteta signala, dok su duplikacije rezultovale povećanjem emitovane fluorescencije, odnosno povećanjem intenziteta signala koji potiču od pojedinih proba u odnosu na iste probe u referentnim uzorcima. Osim rasporeda i relativnih intenziteta signala, *Coffalyser* za svaku probu računa koeficijent doze (eng. *Dosage Quotient*, DQ). Koeficijent doze je precizna mera broja vezanih proba, odnosno tačna mera svih ispitivanih sekvenci u nekom uzorku. Veza između koeficijenta doze i broja kopija predstavljena je u tabeli 3.8.

Tabela 3.8. Odnos koeficijenta doze i broja prisutnih sekvenci.

Status broja kopija	Koeficijent doze (DQ)
0 kopija	DQ=0
2→1 (delecija)	0,40 < DQ < 0,65
normalan	0,80 < DQ < 1,20
2→3 (duplikacija)	1,30 < DQ < 1,65
2→4 (duplikacija)	1,75 < DQ < 2,15

Za detekciju varijacija u broju kopija hromozoma Y korišćena su dva komercijalna seta koja sadrže smešu MLPA proba (82).

P360-A1 MLPA komercijalni kit za hromozom Y, sadrži ukupno 53 probe: 14 proba za detekciju specifičnih sekvenci unutar regiona *AZFa*, 16 proba za region *AZFb* i 13 proba koje detektuju sekvence unutar regiona *AZFc* hromozoma Y. U okviru P360-A1, nalaze se dve probe za autozomalni gen *DPY19L2* (deletiran kod bolesnika sa globozoospermijom) i osam referentnih proba koje detektuju sekvence na autozomnim hromozomima. Produkti amplifikacije MLPA proba iz P360-A1 MLPA komercijalnog seta imaju dužine između 136 i 500 nukleotida (nt). Takođe, uključeno je i 9 kontrolnih proba čiji produkti amplifikacije imaju dužinu manju od 120 nt: četiri probe za Q-fragmente (dužine 64-70-76-82 nt), tri probe za D-fragmente (dužine 88-92-96 nt), jednu probu za X hromozom (dužina produkta amplifikacije 100 nt) i jednu dodatnu probu za Y-hromozom (105 nt).

Probe za Q-fragmente (eng. *Quantity Fragments*) ne moraju da hibridizuju sa ciljnom sekvencom, niti moraju da budu ligirane da bi bile umnožene tokom PCR reakcije. Umnožavaju se potpuno nezavisno od DNK matrice i ukazuju na relativnu količinu materijala prisutnog u uzorku. Koncentracija DNK materijala u uzorku inverzno koreliše sa intenzitetom signala Q-fragmenata.

Probe za D-fragmente (eng. *Denaturation Fragments*) vezuju se za sekvence bogate CpG ostrvcima koje su zbog izuzetno visokog GC baznog sastava zahtevnije za denaturaciju. Odsustvo fragmenata dužina 88 i 96 nt, odnosno slab intenzitet njihovih signala, ukazuje na potencijalne probleme nastale tokom procesa denaturacije DNK.

P360-B1 komercijalni kit za hromozom Y, sadrži 55 MLPA proba: 16 proba za region *AZFa*, 15 proba za region *AZFb* i 12 proba koje detektuju specifične sekvence unutar regiona *AZFc*. P360-

B1 sadrži i jednu probu za gen *SRY* koji se nalazi na p-kraću hromozoma Y i 12 referentnih proba. Produkti amplifikacije MLPA proba imaju dužine između 130 i 507 nt. Prisutno je i 9 referentnih proba čiji produkti amplifikacije imaju dužine manje od 120 nt. Za razliku od P360-A1, unutar P360-B1 seta nije prisutne probe za autozomalni gen *DPY19L2*, kao ni za sekvence koje okružuju gene *RBMY2CP* (region *AZFc*) i *KDM5D* (region *AZFb*). Takođe, jedna proba za gen *USP9Y* (region *AZFa*) i 6 referentnih proba su zamenjene sa dve probe za gen *DDX3Y* (*AZFa*) i 4 referentne probe koje detektuju različite sekvence na autozomima.

Uz MLPA probe iz P360-A1 i P360-B1 setova, korišćen je SALSA MLPA EK1 kit (*MRC Holland*, Holandija) koji sadrži sledeće reagense: SALSA MLPA pufer (eng. *SALSA MLPA Buffer*), SALSA Ligazu-65 (eng. *SALSA Ligase-65*), Ligaza-65 pufere A i B (eng. *Ligase Buffer A*, *Ligase Buffer B*), SALSA PCR prajmer miks (eng. *SALSA PCR Primer Mix*) i SALSA polimerazu (eng. *SALSA Polymerase*).

MLPA analiza delecija i duplikacija regiona *AZF* hromozoma Y sprovedena je prema sledećem protokolu:

Denaturacija DNK

1. U ependorf epruvete zapremine 0,2 ml dodavano je po 5 µl DNK (10-50 ng);
2. Uzorci su denaturisani na 98°C/5 min u PCR mašini (*Veriti® Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*, SAD), a zatim preneti na led;

Hibridizacija proba

1. Pripremljen je master miks za hibridizaciju, koji je za svaku pojedinačnu reakciju sadržavao: 0,75 µl SALSA MLPA pufera i 0,75 µl miksa proba (za prvih 30 reakcija korišćen je P360-A1 miks, ostatak reakcija izvođen je sa P360-B1 miksom);
2. Smeša je kratko vorteksovana, a zatim je u ependorf epruvete sa uzorcima DNK dodavano po 1,5 µl master miksa;
3. Smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole bez vorteksovanja.
4. Hibridizacija je vršena u PCR mašini inkubiranjem na 95 °C/1 min, a zatim na 60°C/16-20 h.

Ligacija hibridizovanih proba

1. Pripremljen je master miks za ligaciju, koji je za svaku pojedinačnu reakciju sadržavao: 1,5 µl Ligaza-65 pufera A, 1,5 µl Ligaza-65 pufera B i 12,5 µl dH₂O;
2. Smeša je kratko vorteksovana, a zatim je za svaku reakciju dodato po 0,5 µl Ligaze 65 u master miksu;
3. Smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole bez vorteksovanja;
4. Zatim je u ependorf epruvete sa uzorcima, koje su držane na 54°C, dodavano po 16 µl master miksa za ligaciju i sve je izmešano pipetiranjem gore-dole bez vorteksovanja;
5. Ligacija je vršena u PCR mašini inkubiranjem na 54°C/15 min (reakcija ligacije), zatim na 98°C u trajanju od 5 min (inaktivacija Ligaze 65).

Reakcija PCR-a

1. Pripreman je master miks za PCR koji je za svaku pojedinačnu reakciju sadržavao 1 µl SALSA PCR prajmera, 3,75 µl dH₂O i 0,25 µl SALSA polimeraze;
2. Master miks promešan je pipetiranjem gore-dole bez vorteksovanja i čuvan na ledu do upotrebe;

3. Na sobnoj temperaturi, u svaku epruvetu sa produktima ligacije dodavano je po 5 μ l master miksa za PCR reakciju;
4. Smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole bez vorteksovanja; Reakcija PCR-a sastojala se od: 35 ciklusa denaturacije na 95°C/0,5 min, hibridizacije prajmera na 60°C/0,5 min i ekstenzije na 72°C/1 min. Finalna ekstenzija vršena je inkubiranjem na 72°C/20 min, a uzorci su čuvani na 15°C do fragment analize.

Kapilarna elektroforeza (fragment analiza)

1. Na plejt sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD) nalivano je po 0,8 μ l produkata MLPA reakcije;
2. U svaki bunarić sa uzorkom dodavano je po 9,2 μ l master miksa koji je napravljen mešanjem 0,2 μ l standarda za dužinu DNK (Gene Scan 500 Lize Size Standard, *Applied Biosystems*, SAD) i 9 μ l Hi-Di formamida (*Applied Biosystems*, SAD) po uzorku;
3. Uzorci su denaturisani inkubiranjem na 86°C/3 min, a potom hlađeni stavljanjem plejta na led;
4. U softveru *GeneMapper* kreiran je plejt (*Applied Biosystems*, SAD) uz odabir parametara za deponovanje rezultata na računaru (eng. *result group*), kao i odgovarajućeg protokola za MLPA (eng. *instrument protocol*): vreme injektiranja uzorka 15 s pri naponu od 1,6 kV i izvođenje elektroforeze na naponu od 15 kV na 60°C/30 min u kapilari od 36 cm, koja je ispunjena polimerom POP4 (*Performance Optimized Polymer™-4*, *Applied Biosystems*, SAD).

3.2.8.1. Statistička obrada rezultata MLPA anallize u cilju procene potencijalne asocijacije varijacija broja kopija u okviru regiona AZF hromozoma Y sa rizikom za razvoj steriliteta kod muškaraca

Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je Fišerovo egzaktni test dostupan u okviru programskog okruženja R (83). Primenom navedenog statističkog testa analizirane su razlike u distribucijama detektovanih varijacija u broju kopija između sterilnih muškaraca i muškaraca iz kontrolne grupe, kao i između grupa muškaraca podeljenih na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta i kontrolne grupe. Kao prag statističke značajnosti smatrana je P vrednost od 0,05.

4. Rezultati

4.1. Rezultati stratifikacije uzoraka sterilnih muškaraca na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta

U okviru ove studije analizirano je ukupno 118 uzoraka periferne krvi i 90 uzoraka brisa bukalne sluznice muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatskog steriliteta, kao i 223 uzoraka genomske DNK izolovane iz brisa bukalne sluznice ili periferne krvi fertilnih muškaraca iz opšte populacije Srbije koji su činili kontrolnu grupu. Prosečna starost muškaraca sa sterilitetom bila je 32,42 godina, dok je u kontrolnoj grupi ona iznosila 32,48 godina.

Na osnovu kliničke dijagnoze sterilni muškarci svrstani su u dve grupe. Prvu grupu činilo je 114 (54,8%) muškaraca sa postavljenom dijagnozom oligoastenozoospermije. U drugu grupu svrstano je 94 (45,2%) muškaraca sa postavljenom dijagnozom azoospermije bez opstrukcije (eng. *Non-obstructive azoospermia*, NOA).

4.2. Rezultati provere količine i kvaliteta izolovane DNK elektroforezom u agaroznom gelu

Kvalitet i količina izolovanih genomskih DNK proveravani su elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Poređenjem intenziteta fluorescencije standarda za koncentraciju (K562) sa intenzitetima fluorescencije uzoraka utvrđeno je da je najmanja izmerena koncentracija uzorka bila veća od 1ng/μl (slika 4.1).

Precizna kvantifikacija izolovane genomske DNK vršena je na fluorometru (*QubitR 2.0 Fluorometer*, *Invitrogen*, SAD) korišćenjem komercijalnog seta *Qubit™ dsDNA BR Assay Kits*, *Invitrogen*, SAD). Koncentracija izolovanih genomskih DNK kretala se u granicama od 1 ng/μl do 45 ng/μl. Uzorci genomske DNK koncentracije manje od 10 ng/μl su uparavani a oni sa koncentracijom preko 20 ng/μl su razblaživani do optimalne koncentracije za MLPA reakciju koja iznosi 10-20 ng/μl.



Slika 4.1. Provera kvaliteta i količine izolovane genomske DNK elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu bojenim etidijum bromidom. (K562 – DNK standard za količinu 1ng/μl; oznakama STE170, STE171, STE172, STE173, STE174, STE175, STE176, STE178 i STE179 obeleženi su uzorci izolovane genomske DNK muškaraca sa dijagnozom steriliteta).

4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u genu NOS3

Na osnovu kriterijuma datih u poglavlju Materijal i metode odabrano je ukupno šest genetičkih varijanti za analizu u okviru ove teze. Tri tačkaste genetičke varijante odabrane na osnovu studije asocijacije na čitavom genomu nalaze se 200 kb uzvodno od gena *PRMT6*, 47 kb nizvodno od gena *PEX10* i u okviru introna gena *SOX5*. Preostale tri varijante nalaze se u promotoru, intronu i egzonu gena *NOS3*. Kompletna lista odabranih varijanti i njihove pozicije u odnosu na poznate gene prikazani su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Odabrane genetičke varijante i njihove pozicije u odnosu na poznate gene.

Gen	Genetička varijanta	Pozicija
<i>PRMT6</i>	rs12097821	200 kb uzvodno
<i>PEX10</i>	rs2477686	47 kb nizvodno
<i>SOX5</i>	rs10842262	intron
<i>NOS3</i>	rs2070744	promotor
<i>NOS3</i>	rs1799983	egzon
<i>NOS3</i>	4a/4b	intron

4.4. Rezultati genotipizacije odabranih genetičkih varijanti dobijenih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i genetičkih varijanti u promotoru i egzonu gena NOS3

Specifičnost PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK u okviru kojih se nalaze genetičke varijante rs12097821 (slika 4.2), rs2477686 (slika 4.3), rs10842262 (slika 4.4), rs1799983 (slika 4.5) i rs2070744 (slika 4.6) proveravana je elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu.



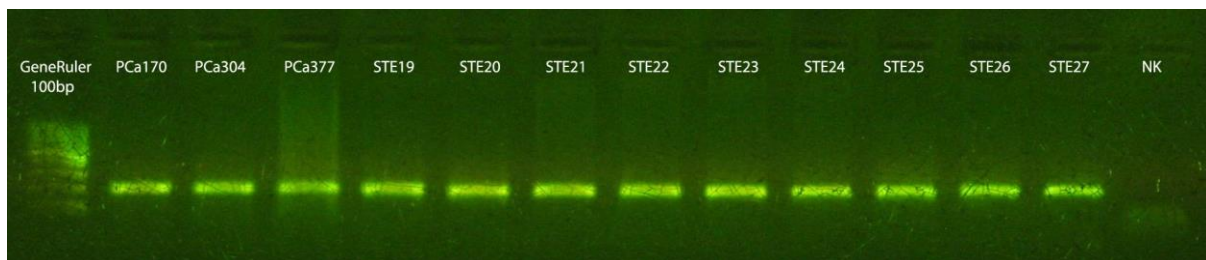
Slika 4.2. Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs12097821 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa etidijum bromidom. Očekivana dužina umnoženih fragmenata DNK iznosila je 217 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; STE 190 - 197 predstavljaju uzorke amplifikovanih fragmenata molekula DNK sterilnih muškaraca; oznakama p-8676so, p-8625so i p-8697so obeleženi su kontrolni uzorci PCR reakcije; neg. kont. – negativna kontrola).



Slika 4.3. **Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs2477686 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa etidijum bromidom.** Očekivana dužina umnoženih fragmenata DNK iznosila je 246 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; STE 168 – 174 predstavljaju uzorke amplifikovanih fragmenata molekula DNK sterilnih muškaraca; oznakama p-8670so, p-8676so i p-8697so obeleženi su kontrolni uzorci PCR reakcije; neg. kont. – negativna kontrola).



Slika 4.4. **Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs10842262 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa etidijum bromidom.** Očekivana dužina umnoženih fragmenata DNK iznosila je 225 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; STE 154 – 163 predstavljaju uzorke amplifikovanih fragmenata molekula DNK sterilnih muškaraca; oznakama p-8420so, p-8436so i p-8517so obeleženi su kontrolni uzorci PCR reakcije; neg. kont. – negativna kontrola).



Slika 4.5. **Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs1799983 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa Midori Green-om.** Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 206 bp. (100bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 100bp; STE 19-27 predstavljaju uzorke amplifikovanih fragmenata molekula DNK sterilnih muškaraca; oznakama PCa170, PCa304 i PCa377 obeleženi su kontrolni uzorci PCR reakcije; NK – negativna kontrola).



Slika 4.6. **Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs2070744 elektroforezom elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa Midori Green-om.** Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 237 bp. (50bp - standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50bp; STE 33- 47 predstavljaju uzorke amplifikovanih fragmenata molekula DNK sterilnih muškaraca; oznakama PCa 21 PCa51 i PCa52 obeleženi su kontrolni uzorci PCR reakcije; NK – negativna kontrola).

Genotipizacija genetičkih varijanti rs12097821 (slika 4.7), rs2477686 (slika 4.8), rs10842262 (slika 4.9), rs1799983 (slika 4.10) i rs2070744 (slika 4.11), vršena je pomoću PCR-RFLP metode. Fragmenti dobijeni restrikcionom digestijom produkata PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Rezultati genotipizacije prikazani su u tabeli 4.2.



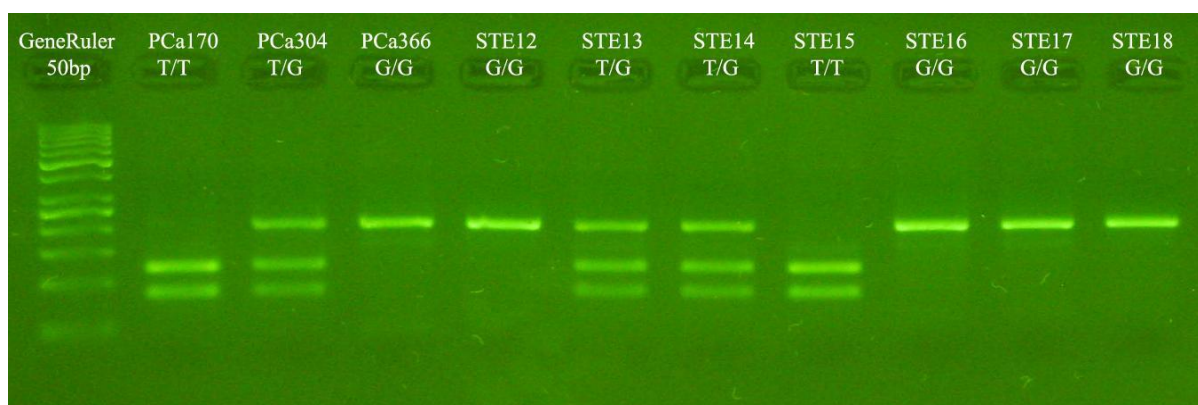
Slika 4.7. **Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs12097821 metodom RFLP.** Homozigot T/T detektovan je prisustvom dve trake veličina 78bp i 139bp, heterozigot T/G prisustvom tri trake veličina 78bp, 139bp i 217bp i homozigot G/G prisustvom jedne trake veličine 217bp. (GeneRuler 50bp – standard za dužinu; oznakama p-8676so, p-8625so i p-8697so obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 182-203 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).



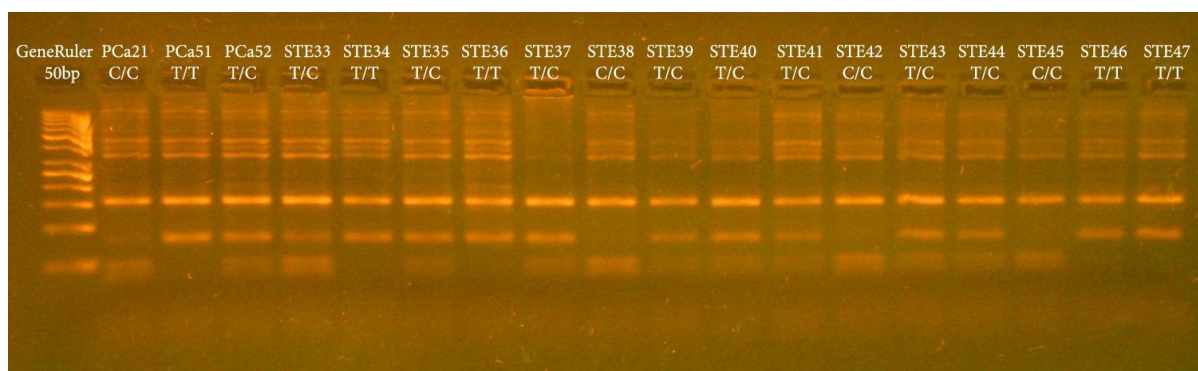
Slika 4.8. **Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs2477686 metodom RFLP.** Homozigot C/C detektovan je prisustvom dve trake veličina 73bp i 173bp, heterozigot C/G prisustvom tri trake veličina 73bp, 173bp i 246bp i homozigot G/G prisustvom jedne trake veličine 246bp. (GeneRuler 50bp – standard za dužinu; oznakama p-8670so, p-8676so i p-8697so obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 197-204 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).



Slika 4.9. **Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs10842262 metodom RFLP.** Homozigot G/G detektovan je prisustvom dve trake veličina 89bp i 136bp, heterozigot G/C prisustvom tri trake veličina 89bp, 136bp i 225bp i homozigot C/C prisustvom jedne trake veličine 225bp. (GeneRuler 50bp – standard za dužinu; oznakama p-8420so, p-8436so i p-8517so obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 151-164 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).



Slika 4.10. **Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs1799983 metodom RFLP.** Homozigot G/G detektovan je prisustvom trake veličine 206bp, heterozigot G/T prisustvom tri trake veličina 87bp, 119bp i 206bp i homozigot T/T prisustvom dve trake veličina 87bp i 119bp. (GeneRuler 50bp – standard za dužinu; oznakama PCa obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 12-18 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).



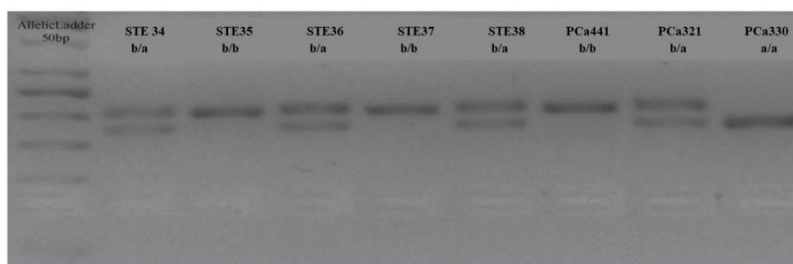
Slika 4.11. **Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs2070744 metodom RFLP.** Homozigot C/C detektovan je prisustvom tri trake veličina 35bp, 46bp i 156bp, heterozigot T/C prisustvom četiri trake veličina 35bp, 46bp, 81bp i 156bp i homozigot T/T prisustvom dve trake veličina 81bp i 156bp. (GeneRuler 50bp – standard za dužinu; oznakama PCa obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 34-47 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).

Tabela 4.2. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs12097821, rs2477686, rs10842262, rs1799983 i rs2070744.

Genotip	Broj kontrola (%)	Broj sterilnih muškaraca sa NOA (%)	Broj sterilnih muškaraca sa oligoastenozoospermijom (%)
rs12097821			
G/G	161 (78,5)	70 (74,5)	82 (73,9)
T/G	42 (20,5)	23 (24,5)	28 (25,2)
T/T	2 (1)	1 (1,1)	1 (0,9)
rs2477686			
G/G	51 (25)	28 (30,4)	38 (34,2)
C/G	102 (50)	39 (42,4)	55 (49,5)
C/C	51 (25)	25 (27,2)	18 (16,2)
rs10842262			
G/G	38 (18,4)	28 (29,8)	26 (23,6)
G/C	127 (61,6)	44 (46,8)	58 (52,7)
C/C	41 (19,9)	22 (23,4)	26 (23,6)
rs1799983			
G/G	66 (50,4)	35 (41,7)	22 (46,8)
G/T	53 (40,5)	42 (50)	18 (38,3)
T/T	12 (9,2)	7 (8,3)	7 (14,9)
rs2070744			
T/T	57 (43,5)	27 (32,1)	25 (53,2)
T/C	63 (48,1)	47 (56)	16 (34)
C/C	11 (8,4)	10 (11,9)	6 (12,8)

4.5. Rezultati genotipizacije genetičkih varijante 4a/4b u okviru introna gena *NOS3*

Genotipizacija genetičke varijante 4a/4b (slika 4.12), vršena je pomoću PCR metode. Fragmenti dobijeni restrikcionom digestijom produkata PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Rezultati genotipizacije prikazani su u tabeli 4.3.



Slika 4.12. Rezultati genotipizacije intonske varijante 4a/4b metodom PCR. Homozigot b/b detektovan je prisustvom jedne trake veličine 196bp, heterozigot a/b prisustvom dve trake veličina 169bp i 196bp i homozigot a/a prisustvom jedne trake veličine 169bp. (*GeneRuler* 50bp – standard za dužinu; oznakama PCa obeleženi su kontrolni uzorci restrikcione digestije; oznakama STE 34-38 obeleženi su uzorci sterilnih muškaraca).

Tabela 4.3. **Rezultati genotipizacije intronske varijante 4a/4b u okviru gena NOS3.**

Genotip	Broj kontrola (%)	Broj sterilnih muškaraca sa NOA (%)	Broj sterilnih muškaraca sa oligoastenozoospermijom (%)
4a/4b			
b/b	89 (67,9)	54 (64,3)	38 (80,8)
a/b	39 (29,8)	26 (30,9)	7 (14,9)
a/a	3 (2,3)	4 (4,8)	2 (4,3)

4.6. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu

Za genetičke varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262 odabranih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu, genotipizovan je kompletan set uzoraka. Distribucije genotipova u grupi sterilnih muškaraca, kao i u kontrolnoj grupi, prikazane su u tabeli 4.4, dok su distribucije genotipova u grupama muškaraca podeljenih prema kliničkoj dijagnozi steriliteta prikazane u tabeli 4.5. Za testiranu genetičku varijantu rs10842262 u kontrolnoj grupi uočeno je odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže (prilog 1).

Iako je u kontrolnoj grupi genetičke varijante rs10842262 primećeno odstupanje od Hardy Vajnbergove ravnoteže, poređenjem učestalosti genotipova između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola dobijeni su statistički značajni rezultati za dva genetička modela, overdominantni ($P=0.017$; $OR=0.62$, 95% CI 0.42–0.92) i kodominantni ($P=0.048$; $OR=0.57$, 95% CI 0.35–0.92). Kada je grupa sterilnih muškaraca podeljena prema kliničkoj dijagnozi steriliteta, statistički značajni rezultati dobijeni su prilikom poređenja učestalosti genotipova između sterilnih muškaraca sa NOA i fertilnih kontrola za kodominantni ($P=0.038$, $OR=0.47$, 95% CI 0.26–0.85), dominantni ($P=0.031$, $OR=0.53$, 95% CI 0.30–0.94) i overdominantni ($P=0.016$, $OR=0.55$, 95% CI 0.33–0.90) genetički model. Nakon poređenja sterilnih muškaraca sa oligoastenozoospermijom i fertilnih kontrola nisu dobijeni statistički značajni rezultati ni za jedan od testiranih genetičkih modela.

Za genetičku varijantu rs2477686, poređenjem učestalosti genotipova između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola nisu dobijeni statistički značajni rezultati koji bi potvrdili postojanje asocijacije ni za jedan od testiranih genetičkih modela. Ono što jeste bilo uočeno je statistički trend značajnosti za dominantni genetički model ($P=0.094$). Takođe, rezultati ukazuju na prisustvo asocijacije između manje učestalog alela C ove genetičke varijante i smanjenog rizika za pojavu muškog steriliteta kod muškaraca sa dijagnozom oligoastenozoospermije prema log-aditivnom genetičkom modelu ($P=0.03$, $OR=0.69$, 95% CI 0.50–0.97).

Poređenjem učestalosti genotipova genetičke varijante rs12097821 nije utvrđeno prisustvo statistički značajnih razlika između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola. Najmanje dobijene P vrednosti dobijene su za dominantni ($P=0.3$) i overdominantni ($P=0.29$) genetički model. Statistički značajni rezultati nisu dobijeni ni nakon što su sterilni muškarci podeljeni u grupe na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta.

Tabela 4.4. **Rezultati testova asocijacije varijanti odabranih na osnovu rezultata sudija asocijacije na čitavom genomu sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca.**

Genetička varijanta	Genetički model	Genotip	Broj seterilnih muškaraca (%)	Broj kontrola (%)	<i>sterilni muškarci vs. kontrole</i>		AIC
					OR (CI 95%)	P-vrednost	
<i>rs10842262</i>							
	Kodominantni	C/C	54 (26.5)	38 (18.4)	1	0.048	568.3
		G/C	102 (50)	127 (61.6)	0.57 (0.35-0.92)		
	Dominantni	G/G	48 (23.5)	41 (19.9)	0.82 (0.46-1.48)	0.051	568.6
		C/C	54 (26.5)	38 (18.4)	1		
	Recesivni	G/C-G/G	150 (73.5)	168 (81.5)	0.63 (0.39-1.01)	0.37	571.6
		C/C-G/C	156 (76.5)	165 (80.1)	1		
	Overdominantni	G/G	48 (23.5)	41 (19.9)	1.24 (0.77-1.98)	0.017	566.7
		C/C-G/G	102 (50)	79 (38.4)	1		
	Log-aditivni	---	---	---	0.62 (0.42-0.92)	0.5	571.9
<i>rs2477686</i>							
	Kodominantni	G/G	66 (32.5)	51 (25)	1	0.23	567.3
		C/G	94 (46.3)	102 (50)	0.71 (0.45-1.13)		
	Dominantni	C/C	43 (21.2)	51 (25)	0.65 (0.38-1.12)	0.094	565.4
		G/G	66 (32.5)	51 (25)	1		
	Recesivni	C/G-C/C	137 (67.5)	153 (75)	0.69 (0.45-1.07)	0.36	567.4
		G/G-C/G	160 (78.8)	153 (75)	1		
	Overdominantni	C/C	43 (21.2)	51 (25)	0.81 (0.51-1.28)	0.46	567.7
		G/G-C/C	109 (53.7)	102 (50)	1		
	Log-aditivni	---	---	---	0.86 (0.58-1.27)	0.11	565.7
<i>rs12097821</i>							
	Kodominantni	G/G	152 (74.2)	161 (78.5)	1	0.57	573.2
		T/G	51 (24.9)	42 (20.5)	1.29 (0.81-2.05)		
	Dominantni	T/T	2 (1)	2 (1)	1.06 (0.15-7.61)	0.3	571.3
		G/G	152 (74.2)	161 (78.5)	1		
	Recesivni	T/G-T/T	53 (25.9)	44 (21.5)	1.28 (0.81-2.02)	1	572.4
		G/G-T/G	203 (99)	203 (99)	1		
	Overdominantni	T/T	2 (1)	2 (1)	1.00 (0.14-7.17)	0.29	571.3
		G/G-T/T	154 (75.1)	163 (79.5)	1		
	Log-aditivni	---	---	---	1.29 (0.81-2.04)	0.33	571.4
					1.24 (0.81-1.90)		

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

Tabela 4.5. **Rezultati testova asocijacije varijanti odabranih na osnovu rezultata sudija asocijacije na čitavom genomu sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca podeljenih u dve grupe na osnovu kliničke dijagnoze.**

Genetička varijanta	Genetički model	Genotip	Broj seterilnih muškaraca sa NOA (%)	Broj sterilnih muškaraca sa oligoastenozoospermijom (%)	Broj kontrola (%)	<i>NOA vs. kontrole</i>			<i>oligoastenozoospermija vs. kontrole</i>		
						OR (CI 95%)	P-vrednost	AIC	OR (CI 95%)	P-vrednost	AIC
<i>rs10842262</i>											
Kodominantni		C/C	28 (29.8)	26 (23.6)	38 (18.4)	1			1		
		G/C	44 (46.8)	58 (52.7)	127 (61.6)	0.47 (0.26-0.85)	0.038	372.5	0.72 (0.40-1.29)	0.3	412.1
Dominantni		G/G	22 (23.4)	26 (23.6)	41 (19.9)	0.73 (0.36-1.48)			1.08 (0.54-2.17)		
		C/C	28 (29.8)	26 (23.6)	38 (18.4)	1	0.031	372.4	1	0.44	411.8
Recesivni		G/C-G/G	66 (70.2)	84 (76.4)	168 (81.5)	0.53 (0.30-0.94)			0.80 (0.46-1.40)		
		C/C-G/C	72 (76.6)	84 (76.4)	165 (80.1)	1	0.49	376.6	1	0.28	411.3
Overdominantni		G/G	22 (23.4)	26 (23.6)	41 (19.9)	1.23 (0.68-2.21)			1.37 (0.78-2.40)		
		C/C-G/G	50 (53.2)	52 (47.3)	79 (38.4)	1	0.016	371.3	1	0.13	410.1
Log-aditivni		G/C	44 (46.8)	58 (52.7)	127 (61.6)	0.55 (0.33-0.90)			0.69 (0.43-1.11)		
		---	---	---	---	0.83 (0.57-1.21)	0.34	376.1	1.04 (0.72-1.48)	0.85	412.4
<i>rs2477686</i>											
Kodominantni		G/G	28 (30.4)	38 (34.2)	51 (25)	1			1		
		C/G	39 (42.4)	55 (49.5)	102 (50)	0.70 (0.39-1.26)	0.45	371.3	0.72 (0.42-1.23)	0.092	410
Dominantni		C/C	25 (27.2)	18 (16.2)	51 (25)	0.89 (0.46-1.74)			0.47 (0.24-0.94)		
		G/G	28 (30.4)	38 (34.2)	51 (25)	1	0.33	369.9	1	0.084	409.8
Recesivni		C/G-C/C	64 (69.6)	73 (65.8)	153 (75)	0.76 (0.44-1.31)			0.64 (0.39-1.06)		
		G/G-C/G	67 (72.8)	93 (83.8)	153 (75)	1	0.69	370.7	1	0.067	409.5
Overdominantni		C/C	25 (27.2)	18 (16.2)	51 (25)	1.12 (0.64-1.96)			0.58 (0.32-1.05)		
		G/G-C/C	53 (57.6)	56 (50.5)	102 (50)	1	0.22	369.4	1	0.94	412.8
		C/G	39 (42.4)	55 (49.5)	102 (50)	0.74 (0.45-1.21)			0.98 (0.62-1.56)		

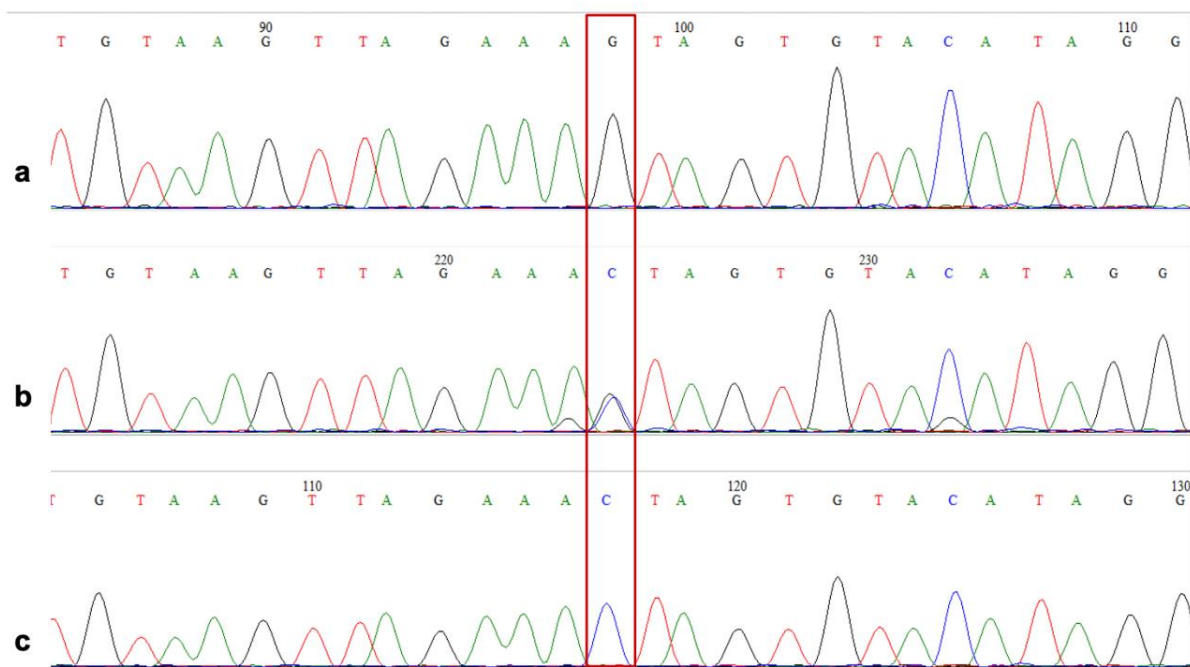
<i>rs12097821</i>											
	Log-aditivni	---	---	---	---	0.94 (0.67-1.32)	0.72	370.8	0.69 (0.50-0.97)	0.03	408.1
Kodominantni	G/G	70 (74.5)	82 (73.9)	161 (78.5)	1				1		
	T/G	23 (24.5)	28 (25.2)	42 (20.5)	1.26 (0.70-2.25)	0.74	377.7	1.31 (0.76-2.26)	0.63	414.8	
Dominantni	T/T	1 (1.1)	1 (0.9)	2 (1)	1.15 (0.10-12.89)				0.98 (0.09-10.99)		
	G/G	70 (74.5)	82 (73.9)	161 (78.5)	1				1		
Recesivni	T/G-T/T	24 (25.5)	29 (26.1)	44 (21.5)	1.25 (0.71-2.22)	0.44	375.7	1.29 (0.75-2.22)	0.35	412.8	
	G/G-T/G	93 (98.9)	110 (99.1)	203 (99)	1				1		
Overdominantni	T/T	1 (1.1)	1 (0.9)	2 (1)	1.09 (0.10-12.19)	0.94	376.3	0.92 (0.08-10.29)	0.95	413.7	
	G/G-T/T	71 (75.5)	83 (74.8)	163 (79.5)	1				1		
	T/G	23 (24.5)	28 (25.2)	42 (20.5)	1.26 (0.70-2.24)	0.44	375.7	1.31 (0.76-2.26)	0.34	412.8	
	Log-aditivni	---	---	---	---	1.22 (0.72-2.08)	0.46	375.7	1.25 (0.75-2.07)	0.39	412.9

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

4.7. Rezultati provere validnosti RFLP metode za genotipizaciju genetičke varijante rs10842262 korišćenjem metode bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja

Učestalosti genotipova varijante rs10842262 u okviru kontrolne grupe nisu bile u saglasnosti sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom i usled toga je ponovljena genotipizacija dela uzoraka korišćenjem bidirekcionog Sangerovog sekvenciranja.

Genotipizacija Sangerovom metodom sprovedena je na delu uzoraka iz obe grupe, pri čemu je iz kontrolne grupe nasumično izabrano 144/206 (69,90%), dok je iz grupe sterilnih muškaraca izabrano 96/204 (47,05%) uzoraka. Analizom hromatograma u okviru programa BioEdit (*Ibis Biosciences*, SAD) jasno je uočena distinkcija između dva homozigotna i jednog heterozigotnog genotipa genetičke varijante rs10842262 (Slika 4.13). Rezultati genotipizacije sprovedeni Sangerovom metodom bili su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim RFLP metodom za 142/144 (98,61%) kontrolna i 94/96 (97,92%) uzoraka iz grupe sterilnih muškaraca.



Slika 4.13. Hromatografski prikaz rezultata genotipizacije genetičke varijante rs10842262 korišćenjem metode Sangerovog sekvenciranja. Na slici su prikazani: a) homozigot manje učestalog alela G, b) heterozigot GC i c) homozigot učestalijeg alela C.

4.8. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genu *NOS3*

Za potrebe testiranja asocijacije tačkastih genetičkih varijanti rs1799983 i rs2070744, kao i intronske varijante 4a/4b u okviru gena *NOS3* sa rizikom za pojavu muškog steriliteta, genotipizacija je sprovedena za 131 sterilna muškaraca i 131 fertilnih kontrola. U kontrolnoj grupi nije uočeno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže ni za jednu od testiranih varijanti (prilog 2).

Poređenjem učestalosti alela i genotipova tri genetičke varijante u okviru gena *NOS3* nije utvrđeno prisustvo statistički značajnih razlika između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola (tabela 4.6).

Takođe u grupi muškaraca sa dijagnozom NOA, ni za jednu od analiziranih genetičkih varijanti nije utvrđena asocijacija sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca. Ono što jeste bilo uočeno je statistički trend značajnosti za log-aditivni ($P=0.094$) i dominantni ($P=0.094$) genetički model (tabela 4.7).

U grupi muškaraca sa dijagnozom oligoastenozoospermije, heterozigot intronske varijante 4a/4b u poređenju sa homozigotima iste genetičke varijante, statistički je značajno asociran sa povećanim rizikom za pojavu muškog steriliteta prema overdominantnom genetičkom modelu ($P=0.038$, $OR=2.42$, $95\%CI$ 1.00-5.88). Takođe, primećen je i statistički trend značajnosti prilikom testiranja asocijacije između genetičke varijante rs2070744 i rizika za pojavu steriliteta kod muškaraca sa oligoastenozoospermijom prema dominantnom genetičkom modelu ($P=0.094$) (tabela 4.7).

Tabela 4.6. **Rezultati testova asocijacije varijanti u okviru NOS3 gena sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca.**

Genetička varijanta	Genetički model	Genotip	Broj seterilnih muškaraca (%)	Broj kontrola (%)	<i>sterilni muškarci vs. kontrole</i>		
					OR (CI 95%)	P-vrednost	AIC
<i>rs1799983</i>							
	Kodominantni	G/G	57 (43.5)	66 (50.4)	1	0.54	368
		G/T	60 (45.8)	53 (40.5)	0.76 (0.46-1.27)		
		T/T	14 (10.7)	12 (9.2)	0.74 (0.32-1.73)		
	Dominantni	G/G	57 (43.5)	66 (50.4)	1	0.26	366
		G/T-T/T	74 (56.5)	65 (49.6)	0.76 (0.47-1.23)		
	Recesivni	G/G-G/T	117 (89.3)	119 (90.8)	1	0.68	367
		T/T	14 (10.7)	12 (9.2)	0.84 (0.37-1.90)		
	Overdominantni	G/G-T/T	71 (54.2)	78 (59.5)	1	0.38	366.4
		G/T	60 (45.8)	53 (40.5)	0.80 (0.49-1.31)		
	Log-aditivni	---	---	---	0.82 (0.57-1.19)	0.3	366.1
<i>rs2070744</i>							
	Kodominantni	T/T	52 (39.7)	57 (43.5)	1	0.56	368
		T/C	63 (48.1)	63 (48.1)	0.91 (0.55-1.52)		
		C/C	16 (12.2)	11 (8.4)	0.63 (0.27-1.47)		
	Dominantni	T/T	52 (39.7)	57 (43.5)	1	0.53	366.8
		T/C-C/C	79 (60.3)	74 (56.5)	0.85 (0.52-1.40)		
	Recesivni	T/T-T/C	115 (87.8)	120 (91.6)	1	0.31	366.2
		C/C	16 (12.2)	11 (8.4)	0.66 (0.29-1.48)		
	Overdominantni	T/T-C/C	68 (51.9)	68 (51.9)	1	1	367.2
		T/C	63 (48.1)	63 (48.1)	1.00 (0.62-1.62)		
	Log-aditivni	---	---	---	0.83 (0.57-1.21)	0.34	366.3
<i>4a/4b</i>							
	Kodominantni	b/b	92 (70.2)	89 (67.9)	1	0.46	367.6
		a/b	33 (25.2)	39 (29.8)	1.22 (0.71-2.11)		
		a/a	6 (4.6)	3 (2.3)	0.52 (0.13-2.13)		
	Dominantni	b/b	92 (70.2)	89 (67.9)	1	0.69	367
		a/b-a/a	39 (29.8)	0.85 (0.48-1.51)	1.11 (0.66-1.88)		
	Recesivni	b/b-a/b	125 (95.4)	128 (97.7)	1	0.3	366.2
		a/a	6 (4.6)	3 (2.3)	0.49 (0.12-2.00)		
	Overdominantni	b/b-a/a	98 (74.8)	92 (70.2)	1	0.41	366.5
		a/b	33 (25.2)	39 (29.8)	1.26 (0.73-2.17)		
	Log-aditivni	---	---	---	1.00 (0.64-1.56)	1	367.2

Tabela 4.7. Rezultati testova asocijacije varijanti u okviru gena *NOS3* sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca podeljenih u dve grupe na osnovu kliničke dijagnoze.

Genetička varijanta	Genetički model	Genotip	Broj seterilnih muškaraca sa NOA (%)	Broj sterilnih muškaraca sa oligoastenozoospermijom (%)	Broj kontrola (%)	<i>NOA vs. kontrole</i>			<i>oligoastenozoospermija vs. kontrole</i>		
						OR (CI 95%)	P-vrednost	AIC	OR (CI 95%)	P-vrednost	AIC
<i>rs1799983</i>											
Kodominantni		G/G	35 (41.7)	22 (46.8)	66 (50.4)	1			1		
		G/T	42 (50)	18 (38.3)	53 (40.5)	0.67 (0.38-1.19)	0.38	291.8	0.98 (0.48-2.02)	0.57	210.4
Dominantni		T/T	7 (8.3)	7 (14.9)	12 (9.2)	0.91 (0.33-2.52)			0.57 (0.20-1.63)		
		G/G	35 (41.7)	22 (46.8)	66 (50.4)	1			1		
Recesivni		G/T-T/T	49 (58.3)	25 (53.2)	65 (49.6)	0.70 (0.40-1.22)	0.21	290.1A	0.87 (0.44-1.69)	0.67	209.3
		G/G-G/T	77 (91.7)	40 (85.1)	119 (90.8)	1			1		
Overdominantni		T/T	7 (8.3)	7 (14.9)	12 (9.2)	1.11 (0.42-2.94)	0.83	291.7	0.58 (0.21-1.56)	0.29	208.4
		G/G-T/T	42 (50)	29 (61.7)	78 (59.5)	1			1		
Log-aditivni	---	G/T	42 (50)	18 (38.3)	53 (40.5)	0.68 (0.39-1.18)	0.17	289.8	1.09 (0.55-2.17)	0.8	209.4
		---	---	---	---	0.83 (0.54-1.26)	0.38	290.9	0.82 (0.50-1.33)	0.42	208.8
<i>rs2070744</i>											
Kodominantni		T/T	27 (32.1)	25 (53.2)	57 (43.5)	1			1		
		T/C	47 (56)	16 (34)	63 (48.1)	0.63 (0.35-1.15)	0.23	290.7	1.73 (0.84-3.56)	0.23	208.5
Dominantni		C/C	10 (11.9)	6 (12.8)	11 (8.4)	0.52 (0.20-1.38)			0.80 (0.27-2.42)		
		T/T	27 (32.1)	25 (53.2)	57 (43.5)	1			1		
Recesivni		T/C-C/C	57 (67.9)	22 (46.8)	74 (56.5)	0.61 (0.35-1.09)	0.094^a	288.9	1.48 (0.76-2.88)	0.25	208.2
		T/T-T/C	74 (88.1)	41 (87.2)	120 (91.6)	1			1		
Overdominantni		C/C	10 (11.9)	6 (12.8)	11 (8.4)	0.68 (0.27-1.68)	0.4	291	0.63 (0.22-1.80)	0.39	208.8
		T/T-C/C	37 (44)	31 (66)	68 (51.9)	1			1		
		T/C	47 (56)	16 (34)	63 (48.1)	0.73 (0.42-1.26)	0.26	290.4	1.80 (0.90-3.59)	0.094^a	206.7

<i>4a/4b</i>											
	Log-aditivni	---	---	---	---	0.69 (0.45-1.07)	0.094^a	288.9	1.14 (0.68-1.91)	0.63	209.3
	Kodominantni	b/b	54 (64.3)	38 (80.8)	89 (67.9)	1			1		
		a/b	26 (30.9)	7 (14.9)	39 (29.8)	0.91 (0.50-1.66)	0.59	292.6	2.38 (0.98-5.79)	0.1	207
	Dominantni	a/a	4 (4.8)	2 (4.3)	3 (2.3)	0.46 (0.10-2.11)			0.64 (0.10-3.99)		
		b/b	54 (64.3)	38 (80.8)	89 (67.9)	1			1		
	Recesivni	a/b-a/a	30 (35.7)	9 (19.1)	0.85 (0.48-1.51)	0.85 (0.48-1.51)	0.58	291.4	1.99 (0.88-4.50)	0.084^a	206.5
		b/b-a/b	80 (95.2)	45 (95.7)	128 (97.7)	1			1		
	Overdominantni	a/a	4 (4.8)	2 (4.3)	3 (2.3)	0.47 (0.10-2.15)	0.33	290.7	0.53 (0.09-3.26)	0.5	209
		b/b-a/a	58 (69)	40 (85.1)	92 (70.2)	1			1		
	Log-aditivni	a/b	26 (30.9)	7 (14.9)	39 (29.8)	0.95 (0.52-1.71)	0.85	291.7	2.42 (1.00-5.88)	0.038	205.2
			---	---	---	---	0.82 (0.50-1.34)	0.42	291.1	1.55 (0.77-3.13)	0.2

^a Statistički trend značajnosti.

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

4.9. Rezultati meta-analize genetičkih varijanti odabranih na osnovu rezultata studije asocijacije na čitavom genomu i rezultata prethodnih studija

Koristeći različite kombinacije ključnih reči prilikom pretrage baze naučnih publikacija *PubMed* i nakon isključivanja studija duplikata, prikupljeno je ukupno 5 studija koje zadovoljavaju kriterijume za uključivanje u meta-analizu. Jedna od studija koja je ispunjavala kriterijume bila je i inicijalna GWAS na osnovu koje su odabrane tri genetičke varijante za analizu asocijacije sa muškim sterilitetom u populaciji Srbije. Zbog velikog broja ispitanika koji su bili uključeni u inicijalnu GWAS i potencijalnog uticaja na rezultate asocijacije, sprovedene su dve nezavisne meta-analize pri čemu jedna od njih nije uključila ovu studiju.

Sve studije koje su bile uključene u meta-analizu ispitivale su asocijaciju većeg broja genetičkih varijanti sa pojavom steriliteta kod muškaraca, a jedna od njih imala je dve kohorte ispitanika na osnovu kojih su formirana dva panela, koji su nezavisno uključeni u meta-analizu. Takođe, na osnovu rezultata studije asocijacije sprovedene u populaciji Srbije, formirana su dva panela zasnovana na različitim kliničkim dijagnozama sterilnih muškaraca. U slučaju jedne studije koja je uključivala muškarce sa različitim dijagnozama steriliteta nije formirano više panela pošto je broj ispitanika nakon stratifikacije na osnovu kliničke dijagnoze u jednoj grupi bio zanemarljivo mali. Na kraju je na osnovu 5 studija, ne računajući inicijalnu GWAS, formirano 7 nezavisnih studijskih panela za genetičke varijante rs12097821 i rs2477686, dok je za rs10842262 broj studijskih panela bio 6 pošto jedna od ukupno pet studija nije uključivala ovu genetičku varijantu.

Rezultati meta-analize koja je obuhvatila i inicijalnu GWAS, pokazali su prisustvo asocijacije sa rizikom za pojavu muškog steriliteta za sve testirane genetičke varijante.

Za genetičku varijantu rs12097821, P-vrednosti za alelski (OR=1.173, 95% CI 1.080–1.275) i recesivni (OR=1.406, 95% CI 1.224–1.615) genetički model bili su manji od 0,001. Međutim, kada je inicijalna GWAS isključena iz meta-analize, asocijacija rs12097821 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta nije bila statistički značajna ni za jedan od testiranih genetičkih modela (tabela 4.8) (slika 4.13). Takođe, statistička značajnost nije postignuta u grupi muškaraca sa dijagnozom NOA kao ni u grupi muškaraca azijskog porekla.

Nakon isključivanja inicijalne GWAS, za manje učestali alel G genetičke varijante rs2477686 pokazano je da povećava rizik za pojavu steriliteta kod muškaraca prema alelskom (P=0.009, OR=1.169, 95% CI 1.040–1.315) i recesivnom (P=0.008, OR=1.472, 95% CI 1.109–1.955) genetičkom modelu, dok je za dominantni genetički model bio prisutan statistički trend značajnosti (P=0.069) (tabela 4.9) (slika 4.14).

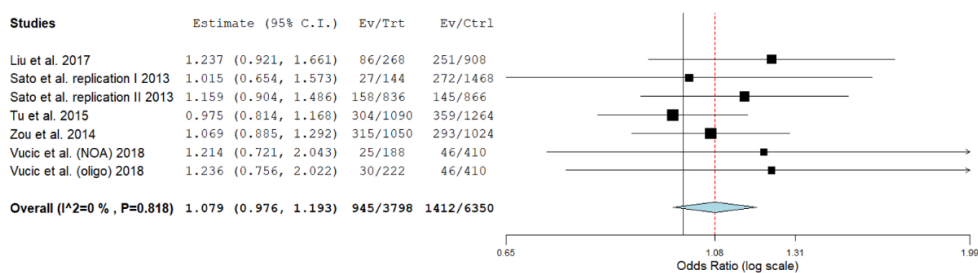
Tabela 4.8. Meta-analiza potencijalne asocijacije genetičke varijante rs12097821 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

Genetička varijanta	Dominantni model			Recesivni model			Overdominantni model			Alelski model		
	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>
<i>rs12097821</i> (uključena GWAS)	1.178 (1.057 - 1.312)	0.003	0.069	1.414 (1.230 - 1.625)	< 0.001	0.81	1.090 (0.991 - 1.197)	0.075	0.192	1.173 (1.080 - 1.275)	< 0.001	0.097
<i>rs12097821</i> (isključena GWAS)	1.063 (0.939 - 1.203)	0.338	0.771	1.289 (0.993 - 1.675)	0.057	0.746	1.006 (0.887 - 1.141)	0.922	0.545	1.079 (0.976 - 1.193)	0.136	0.818

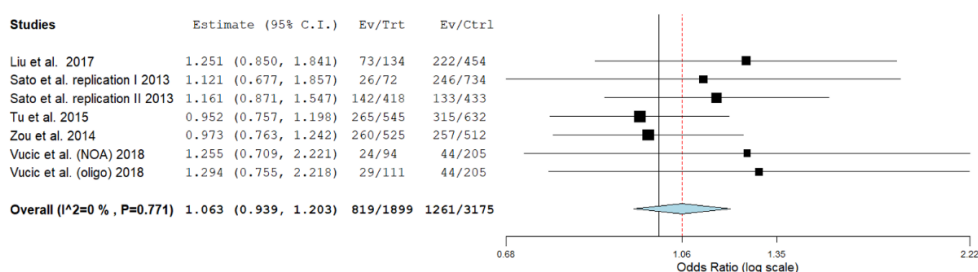
Tabela 4.9. Meta-analiza potencijalne asocijacije genetičke varijante rs2477686 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

Genetička varijanta	Dominantni model			Recesivni model			Overdominantni model			Alelski model		
	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>
<i>rs2477686</i> (uključena GWAS)	1.275 (1.159 - 1.403)	< 0.001	0.319	1.698 (1.148 - 2.512)	0.008	0.002	1.159 (1.047 - 1.284)	0.005	0.265	1.272 (1.144 - 1.414)	< 0.001	0.069
<i>rs2477686</i> (isključena GWAS)	1.138 (0.988 - 1.311)	0.072	0.725	1.484 (1.116 - 1.973)	0.007	0.54	1.040 (0.902 - 1.198)	0.589	0.48	1.169 (1.040 - 1.315)	0.009	0.906

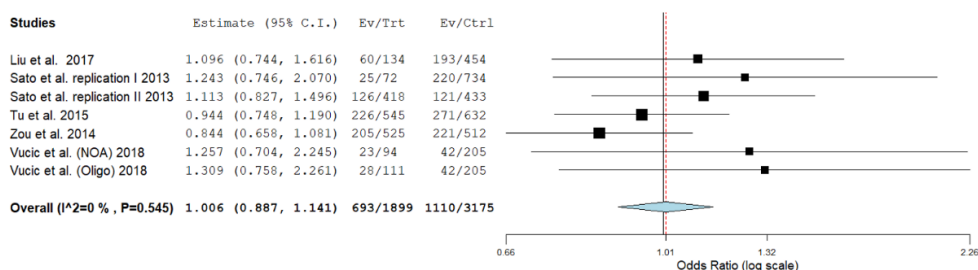
A



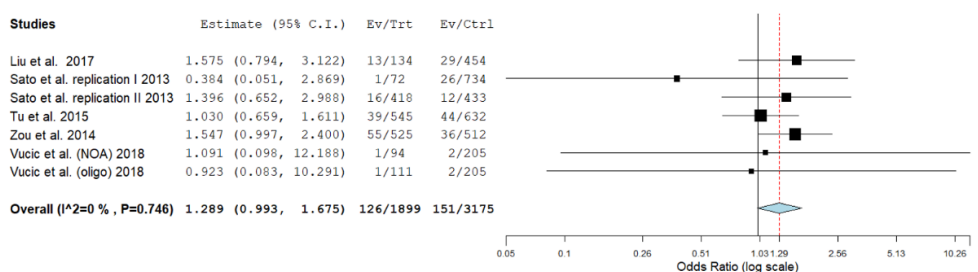
B



C

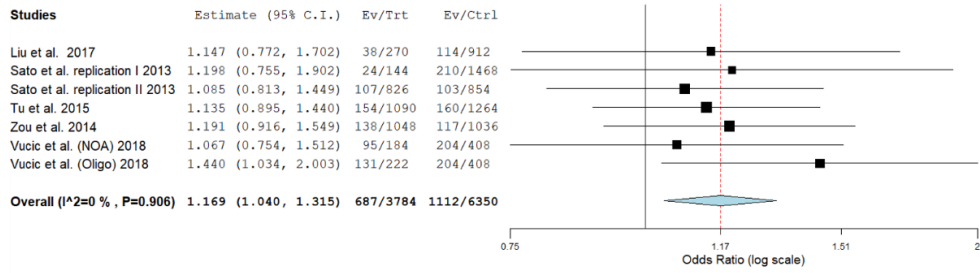


D

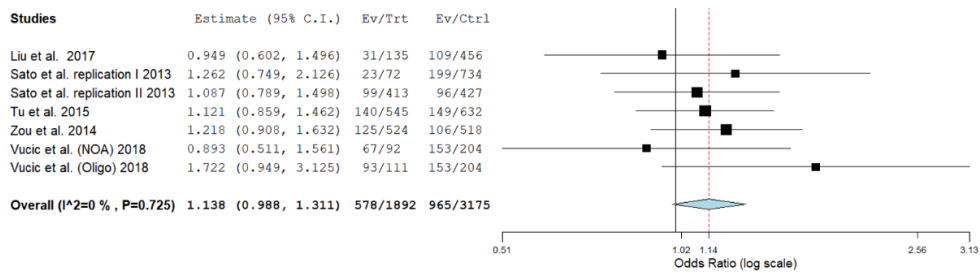


Slika 4.13. Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs12097821 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta za alelski (A), dominantni (B), overdominantni (C) i recesivni (D) genetički model. Rezultati dobijeni na osnovu različitih genetičkih modela predstavljeni su kao OR sa 95% CI, sveukupni efekat sa 95% prikazan je na šumskom dijagramu. Veličina kvadratnih simbola predstavlja rezultat studije proporcionalan veličini učinka pojedinačnih studijskih panela. P-vrednosti su dobijene iz testova heterogenosti rezultata studija.

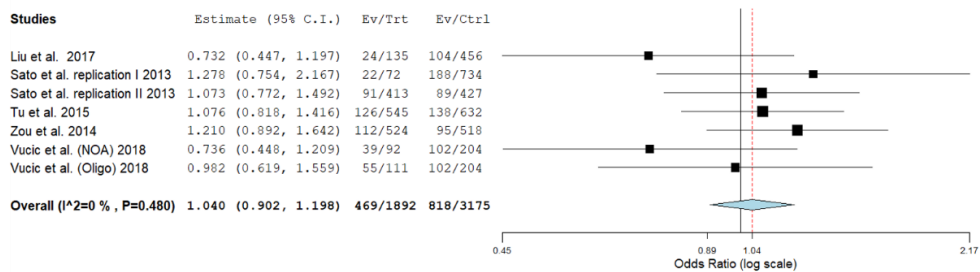
A



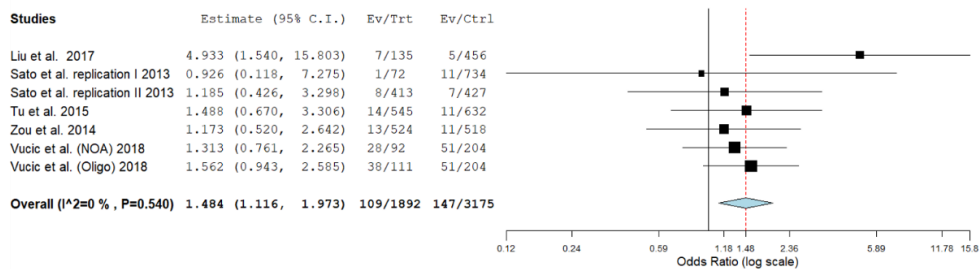
B



C



D



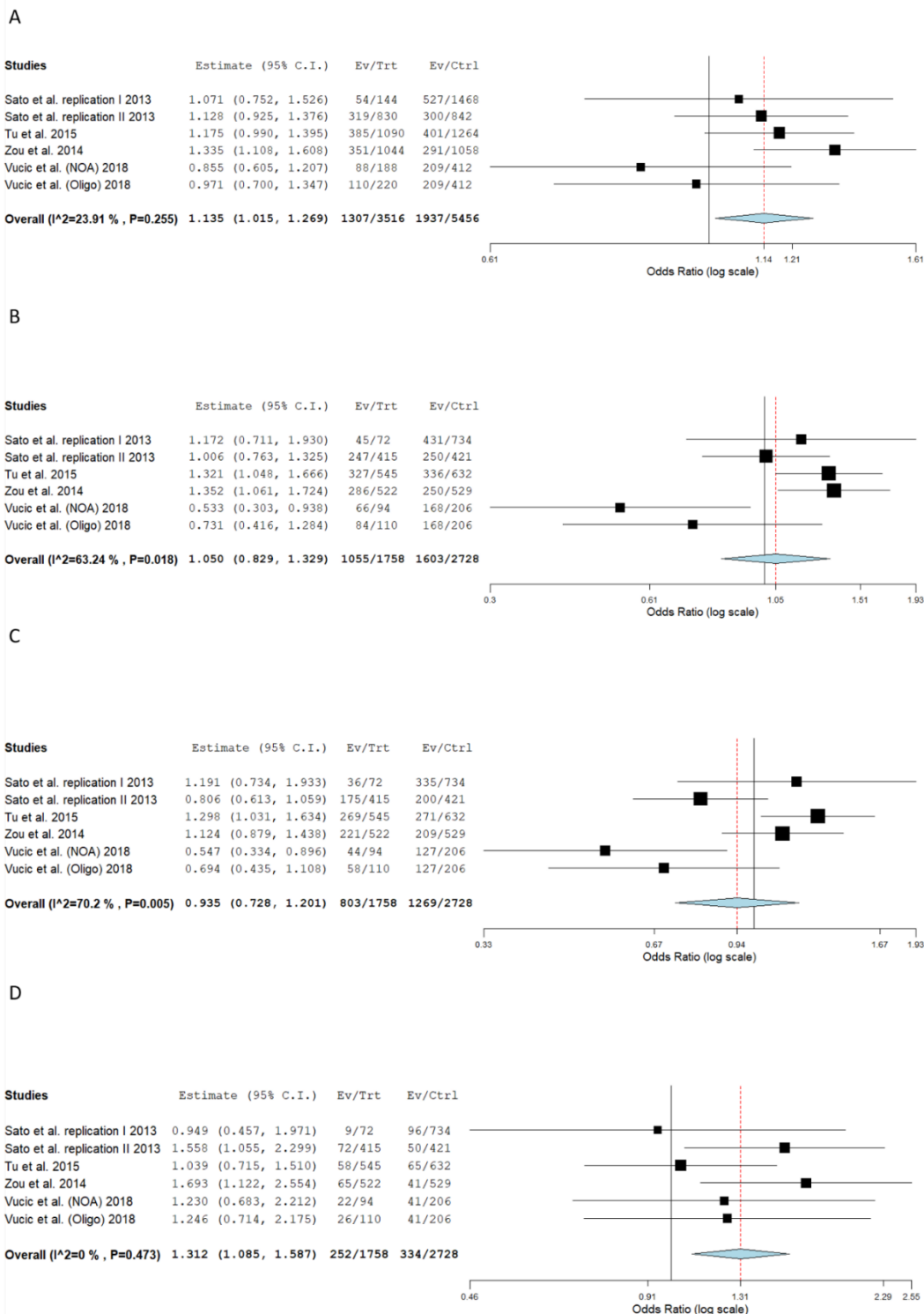
Slika 4.14. Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs2477686 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta za alelski (A), dominantni (B), overdominantni (C) i recesivni (D) genetički model. Rezultati dobijeni na osnovu različitih genetičkih modela predstavljeni su kao OR sa 95% CI, sveukupni efekat sa 95% prikazan je na Šumskom dijagramu. Veličina kvadratnih simbola predstavlja rezultat studije proporcionalan veličini učinka pojedinačnih studijskih panela. P-vrednosti su dobijene iz testova heterogenosti rezultata studija.

Statistički značajan rezultat prema alelskom modelu dobijen je za podgrupu studija koje su uključivale muškarce sa dijagnozom oligozoospermije, oligoastenozoospermije i astenozoospermije. Na osnovu istog genetičkog modela dobijen je statistički trend značajnosti za asocijaciju genetičke varijante rs2477686 sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca sa NOA. Ista genetička varijanta asocirana je prema alelskom genetičkom modelu sa muškim sterilitetom u grupi muškaraca poreklom iz Azije ($P=0.049$) (prilog 3).

Za manje učestali alel G genetičke varijante rs10842262, dobijen je statistički značajan rezultat koji ukazuje na asocijaciju ove varijante sa povećanim rizikom za pojavu muškog steriliteta prema alelskom ($P=0.004$, $OR=1.149$, $95\%CI$ 1.046–1.262) i recesivnom ($P=0.004$, $OR=1.314$, $95\%CI$ 1.089–1.587) genetičkom modelu, čak i nakon isključivanja inicijalne GWAS studije iz meta-analize (tabela 4.10) (slika 4.15). Statistička značajnost rezultata bila je prisutna i u podgrupi slučajeva i kontrola azijskog porekla, kao i u podgrupi sterilnih muškaraca sa dijagnozom NOA (prilog 4).

Tabela 4.10. Meta-analiza potencijalne asocijacije genetičke varijante rs10842262sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

Genetička varijanta	Dominantni model			Recesivni model			Overdominantni model			Alelski model		
	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>	<i>P_{het}</i>
<i>rs10842262</i> (uključena GWAS)	1.181 (0.980 - 1.423)	0.081	< 0.001	1.220 (1.088 - 1.367)	< 0.001	0.671	1.066 (0.874 - 1.300)	0.529	< 0.001	1.179 (1.079 - 1.288)	< 0.001	0.026
<i>rs10842262</i> (isključena GWAS)	1.050 (0.829 - 1.329)	0.687	0.018	1.312 (1.085 - 1.587)	0.005	0.473	0.935 (0.728 - 1.201)	0.599	0.005	1.135 (1.015 - 1.269)	0.026	0.255



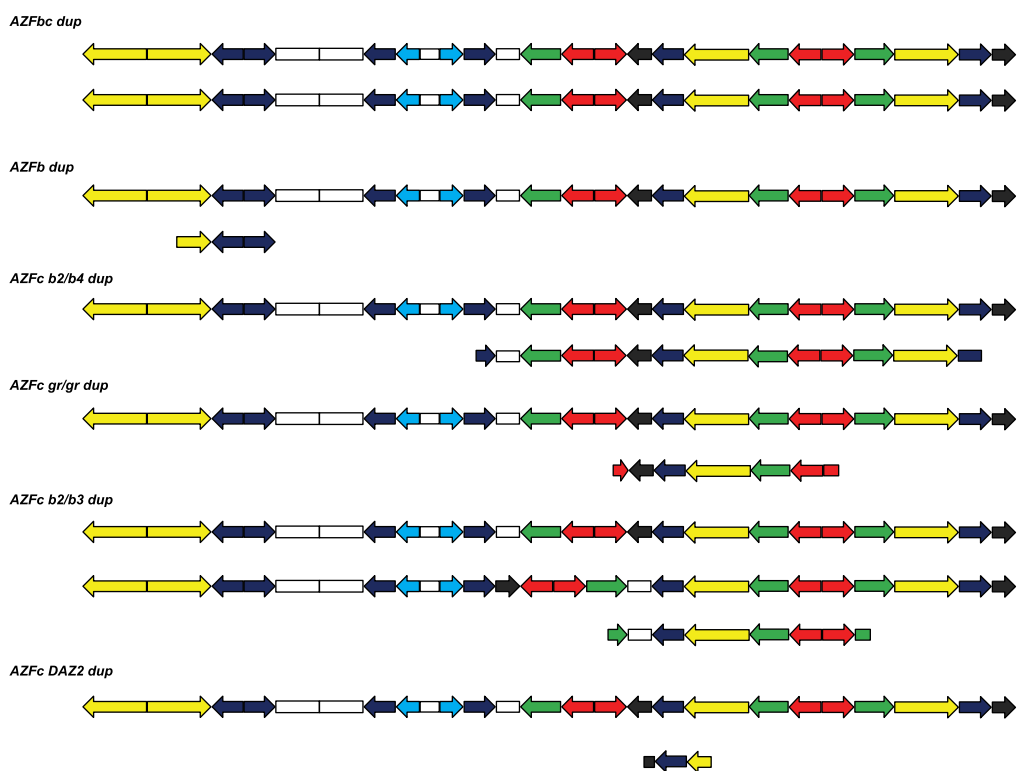
Slika 4.15. Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs10842262 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta za alelski (A), dominantni (B), overdominantni (C) i recesivni (D) genetički model. Rezultati dobijeni na osnovu različitih genetičkih modela predstavljani su kao OR sa 95% CI, sveukupni efekat sa 95% prikazan je na Šumskom dijagramu. Veličina kvadratnih simbola predstavlja rezultat studije proporcionalan veličini učinka pojedinačnih studijskih panela. P-vrednosti su dobijene iz testova heterogenosti rezultata studija.

Vizuelnom inspekcijom Funel dijagrama nije utvrđena asimetrija koja bi sugerisala na prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije. Takođe, rezultati Egerovog testa nisu ukazivali na prisustvo ovog tipa greške ni za jedan od testiranih genetičkih modela.

4.10. Analiza asocijacije varijacija u broju kopija regiona *AZF* hromozoma Y sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca

Korišćenjem metode MLPA detektovane su varijacije u broju kopija kod 24 (22,86%) od ukupno 105 uzoraka sterilnih muškaraca. U kontrolnoj grupi fertilnih muškaraca, prisustvo CNVs detektovano je kod 11 (9,82%) od ukupno 112 analizirana uzorka. Od ukupnog broja CNVs detektovano je šest tipova duplikacija, tri tipa delecija i jedan kompleksni rearanžman.

Šest različitih tipova duplikacija detektovano je kod 9 od ukupno 112 kontrola (8,04%) i kod 16 od ukupno 105 sterilnih muškaraca (15,24%). Četiri od šest duplikacija nalazile su se u okviru regiona *AZFc* hromozoma Y, jedna duplikacija obuhvatala je regione *AZFb* i *AZFc* i jedna koja se nalazila u okviru regiona *AZFb* (slika 4.16).

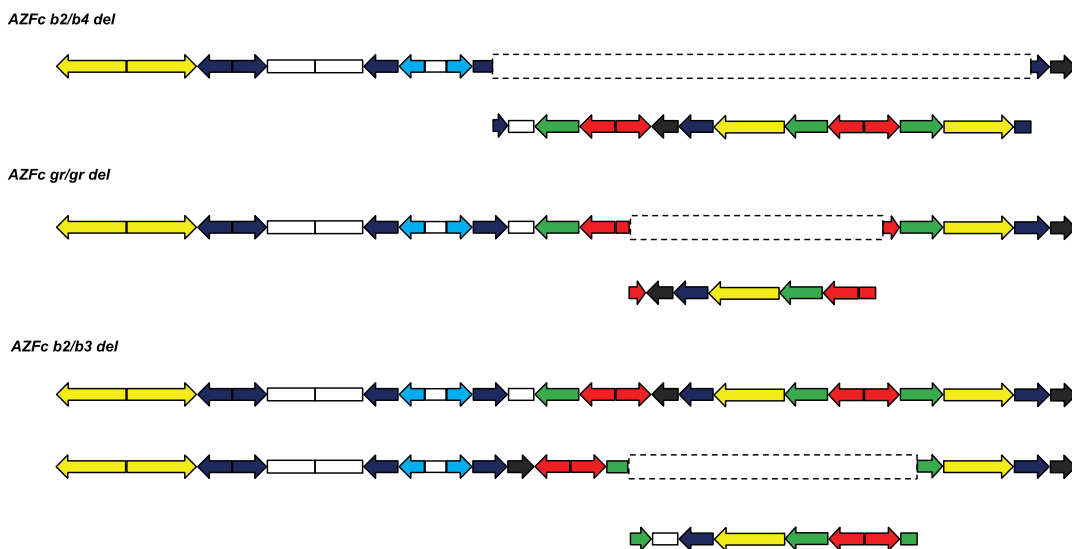


Slika 4.16. Shematski prikaz CNV po tipu duplikacija u regionima *AZFc* i *AZFb* hromozoma Y.

Ni za jednu od detektovanih duplikacija nije dobijen statistički značajan rezultat koji bi ukazivao na potencijalnu asocijaciju sa pojavom steriliteta kod muškaraca. Duplikacija *gr/gr* identifikovana je kod četvorice fertilnih muškaraca i kod osam sterilnih muškaraca ($P=0,238$), duplikacija *b2/b4* kod jednog foertilnog muškarca i pet sterilnih muškaraca ($P=0,264$), duplikacija *b2/b4* detektovana je kod jednogfertilnog i jednog sterilnog muškarca ($P=1$), dok je duplikacija koja dovodi do promena u broju kopija gena *DAZ2* identifikovana samo kod jednog fertilnog muškarca (tabela 4.11). Duplikacija koja obuhvata deo *AZFb* i čitav region

AZFc detektovana je kod jednog muškarca sa oligoastenozoospermijom. Kod jednog fertilnog muškarca i kod jednog muškarca sa dijagnozom NOA detektovana je duplikacija lokalizovana u genima *HSFY1* i *CDY2B* koji se nalaze u okviru regiona *AZFb* ($P=0,529$). Rezultati Fišerovog egzaktnog testa nisu ukazivali na prisustvo statistički značajnih razlika između učestalosti detektovanih CNVs ni nakon stratifikacije sterilnih muškaraca na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta (tabela 4.11).

Tri CNV po tipu delecija detektovane su kod 7 od ukupno 105 sterilnih muškaraca (6,67%), međutim nijedna CNV ovoga tipa nije detektovana u kontrolnoj grupi (slika 4.17).

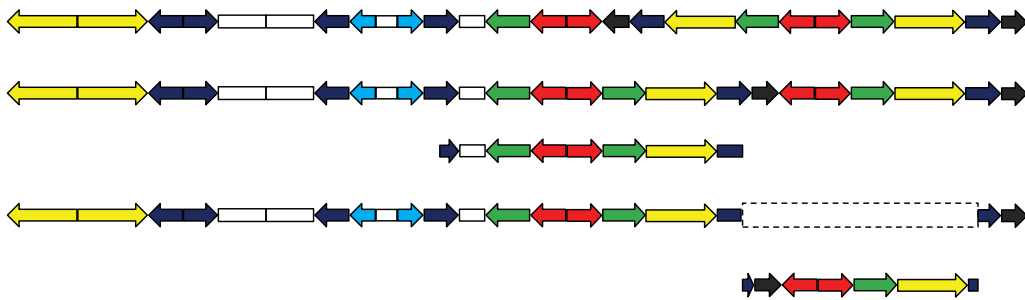


Slika 4.17. Shematski prikaz CNV po tipu delecija u regionu *AZFc* hromozoma Y.

Delecija između *gr/gr* amplikona koja obuhvata veliki deo *AZFc* regiona, detektovana je kod četiri muškarca sa oligoastenozoospermijom, ali ne i kod muškaraca sa NOA kao ni kod fertilnih kontrola. Delecija *b2/b3* pronađena je kod jednog muškarca sa NOA, ali ne i kod ostalih grupa, dok je delecija *b2/b4* takođe identifikovana samo kod dva muškarca sa NOA. Statistički trend značajnosti dobijen je za *gr/gr* deleciju prilikom poređenja broja detektovanih CNVs između ukupnog broja slučajeva i kontrola ($P=0,053$). Statistički značajan rezultat za isti rearanžman dobijen je poređenjem između grupe muškaraca sa oligastenozoospermijom i fertilnih kontrola (tabela 4.11). Statistički značajan rezultat dobijen je i kada se analizirala asocijacija svih delecija detektovanih u okviru regiona *AZF* sa rizikom za pojavu muškog steriliteta ($P=0,024$) (tabela 4.12).

Identifikovan je i jedan CNV po tipu kompleksnog rearanžmana koji je nasto inverzijom između *r2* i *r3* amplikona, nakon čega su usledile duplikacija između *b2* i *b3* amplikona i *b3/b4* delecija (slika 4.18).

AZFc r2/r3 inv + b2/b3 dup + b3/b4 del



Slika 4.18. Shematski prikaz CNV po tipu kompleksnih rearanžmana u regionu *AZFc* hromozoma Y.

Ovaj rearanžman detektovan je kod 2 od 112 fertilnih muškaraca (1,78%) i kod 1 od ukupno 105 sterilnih muškaraca (0,97%), međutim rezultati Fišerovog egzaktnog testa nisu pokazali statistički značajnu razliku između broja detektovanih slučajeva u grupama sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola (tabela 4.11).

Tabela 4.11. Distribucije detektovanih CNVs u oviru regiona AZF hromozoma Y sa rezultatima Fišerovog egzaktnog testa.

Tipovi CNV	Fertilni muškarci (n=112)			Sterilni muškarci (n=105)			Muškarci sa NOA (n=53)			Muškarci sa oligoastenozoospermijom (n=52)		
	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost
AZFbc dup	0	1	-	1	-	0.484	0	-	1	1	-	0.317
AZFB dup	1	1	-	1	1.07 (0.01-84.47)	1	1	2.12 (0.03-168.81)	541	0	-	1
AZFc b2/b4 dup	1	1	-	1	1.07 (0.01-84.47)	1	1	2.12 (0.03-168.81)	541	0	-	1
AZFc DAZ2 dup	1	1	-	0	-	1	0	-	1	0	-	1
AZFc b2/b3 dup	2	1	-	5	2.74 (0.44-29.36)	0.265	2	2.15 (0.15-30.37)	0.594	3	3.34 (0.37-41.21)	0.328
AZFc gr/gr dup	4	1	-	8	2.22 (0.57-10.39)	0.241	6	3.42 (0.77-17.26)	0.077	2	1.08 (0.10-7.82)	1
AZFc b2/b4 del	0	1	-	2	-	0.233	2	-	0.102	0	-	1
AZFc b2/b3 del	0	1	-	1	-	0.484	1	-	0.321	0	-	1
AZFc gr/gr del	0	1	-	4	-	0.053	0	-	1	4	-	0.009
AZFc r2/r3 inv + b2/b3 dup + b3/b4 del	2	1	-	1	0.53 (0.01-10.33)	1	0	-	1	1	1.08 (0.02-21.15)	1

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano

Tabela 4.12. Distribucije detektovanih CNVs grupisanih po regionima AZF hromozoma Y sa rezultatima Fišerovog egzaktnog testa.

Tipovi CNV	Fertilni muškarci (n=112)			Sterilni muškarci (n=103)			Muškarci sa NOA (n=51)			Muškarci sa oligoastenozoospermijom (n=52)		
	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost	n	OR (95% CI)	P-vrednost
Duplikacije u okviru regiona AFZ	9	1	-	6	2.10 (0.82-5.67)	0.094	0	2.77 (0.94-8.34)	0.062	6	1.49 (0.41-5.01)	0.562
Duplikacije u okviru regiona AFZc	0	1	-	5	-	0.024	1	-	0.313	4	-	0.009

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano

5. Diskusija

Ova doktorska disertacija predstavlja studiju slučajeva i kontrola u kojoj se ispitivala moguća asocijacija genetičkih varijanti u genu *NOS3* i genetičkih varijanti selektovanih na osnovu studija asocijacije na čitavom genomu (GWAS) sa rizikom za razvoj steriliteta kod muškaraca. U okviru ove teze analizirano je i prisustvo varijacija u broju kopija (eng. *Copy Number Variations*, CNVs) u okviru regiona *AZF* hromozoma Y kod muškaraca iz populacije Srbije sa ciljem utvrđivanja moguće asocijacije ovih genetičkih rearanžmana sa pojavom muškog steriliteta.

Rezultati naše studije ukazuju da je najčešći tip CNV u ispitivanoj grupi sterilnih muškaraca duplikacija označena kao gr/gr veličine 1,6 Mb koja obuhvata aktivne kopije četiri različite familije gena za proteine u okviru regiona *AZFc*. Prethodna studija sprovedena od strane *Lin*-a i saradnika pokazala je asocijaciju između gr/gr duplikacije i povećanog rizika za nastanak steriliteta kod muškaraca iz populacije Tajvana (32). Rezultati meta-analize urađene od strane *Xie*-a i saradnika, ukazuju da etničko i geografsko poreklo ispitanika može uticati na moguću asocijaciju između prisutva duplikacija u okviru regiona *AZFc* i rizika za razvoj steriliteta kod muškaraca. Jedan od zaključaka ove studije bio je i taj da gr/gr duplikacija, kojom se povećava broj kopija gena iz familije *DAZ*, može negativno uticati na proces spermatogeneze kod muškaraca poreklom iz Azije (84).

U našoj studiji, nije dobijen statistički značajan rezultat nakon poređenja učestalosti gr/gr duplikacije između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola iz populacije Srbije. Slične studije slučajeva i kontrola sprovedene u drugim populacijama uglavnom nisu analizirale učestalost ove duplikacije i njenu asocijaciju sa rizikom za pojavu muškog steriliteta, a razlog tome je nemogućnost njene detekcije korišćenjem konvencionalnih metoda za genotipizaciju, kao i to da prisustvo gr/gr duplikacije može biti „zamaskirano“ kada su ove duplikacije udružene sa delecijama u okviru kompleksnih CNVs (85,86). U okviru istog regiona detektovana je i jedna manja duplikacija koja dovodi do povećanja broja kopija gena iz familije *DAZ*, međutim ovaj tip duplikacije identifikovan je samo kod jednog fertilnog muškarca, na osnovu čega nije bilo moguće analizirati njegovu asocijaciju sa rizikom za pojavu steriliteta.

Kod jednog muškarca sa kliničkom dijagnozom oligoastenozoospermije, identifikovana je duplikacija koja obuhvata regione *AZFb* i *AZFc* hromozoma Y. Duplikacija ovoga tipa nije detektovana u prethodnim studijama sprovedenim u drugim populacijama, kao ni kod fertilnih muškaraca regrutovanih u okviru naše studije. Međutim, uzimajući u obzir veličinu genetičkog rearanžmana i broj gena koji obuhvata, opravdana je pretpostavka da ovakva vrsta duplikacije može biti od kliničkog značaja u dijagnostici muškog steriliteta.

Pored prethodne dve, detektovana je i duplikacija lokalizovana u genu *HSFY1*, prisutna kod jednog muškarca iz kontrolne grupe i kod jednog sterilnog muškarca sa dijagnozom NOA. Gen *HSFY1* predominantno je eksprimiran u spermatidama, a smanjena ekspresija ovog gena prisutna je u testisima muškaraca kod kojih dolazi do prekida sazrevanja spermatozoida što ukazuje na potencijalnu ulogu proteina HSFY1 u u procesima regulacije spermatogeneze (87). Duplikacija regiona hromozoma Y koji obuhvata ovaj gen može biti asociirana sa rizikom za nastanak steriliteta, ali ne u značajnoj meri imajući u vidu da je ista duplikacija detektovana i kod jednog fertilnog muškarca.

Duplikacija u okviru *AZFc* regiona koja nastaje između amplikona b2 i b4 detektovana je kod jednog sterilnog i jednog muškarca iz kontrolne grupe. Korišćenjem Fišerovog egzaktnog testa nije bilo moguće utvrditi asocijaciju b2/b4 duplikacije sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz Srbije, usled relativno malog broja detektovanih duplikacija. Učestalost ove duplikacije bila je niska i drugim studijama sprovedenim u populaciji Han Kineza koje su uključivale veći broj ispitanika u poređenju sa našom studijom (23,88).

Delecija označena kao b2/b3 nastaje usled inverzije između amplikona b2 i b3 nakon čega dolazi do delecije regiona između amplikona označenih kao crveni (eng. *red*, r) i zeleni (eng. *green*, g). Kao posledica delecije „uklanja se“ sekvenca molekula DNK dužine 1,8 Mb u okviru regiona *AZFc*. Prethodne studije identifikovale su duplikaciju koja se može detektovati u istom regionu umesto delecije, što je potvrđeno u okviru naše studije. Delecija b2/b3 nalazi se sa velikom učestalošću u okviru haplogrupe N hromozoma Y koja je prisutna kod muškaraca u populacijama severne Evrope i Baltika, što ukazuje na osnivački efekat ove varijante koja u okviru haplogrupe N nema efekta na sterilitet kod muškaraca (89).

Nasuprot tome, rezultati studija sprovedenih u populacijama Kine i Maroka ukazuju na asocijaciju delecije b2/b3 sa pojavom idiopatskog steriliteta kod muškaraca sa poremećajem spermatogeneze (90,91). Rezultati prethodnih studija sugerišu da, u zavisnosti od porekla Y hromozoma, delecija b2/b3 može biti asocirana sa pojavom steriliteta kod muškaraca uzrokovanog poremećajima u procesu spermatogeneze. Rezultati studije *Pan*-a i saradnika ukazuju da delecija ili duplikacija b2/b3 nemaju izražene efekte na fertilitet muškaraca, ali da posredno mogu uzrokovati delecije čitavog regiona *AZFc* ili većih genetičkih rearanžmana tako što dovode do strukturne nestabilnosti hromozoma Y (92).

U okviru naše studije, delecija b2/b3 bila je prisutna kod jednog muškarca sa dijagnozom NOA dok u kontrolnoj grupi nije bila identifikovana. Duplikacija b2/b3 identifikovana je kod dva fertilna muškarca, dva muškarca sa dijagnozom NOA i kod tri muškarca sa dijagnozom oligoastenozoospermije. Naši rezultati ne ukazuju na statistički značajnu asocijaciju delecije i duplikacije b2/b3 sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz Srbije.

Delecija označena kao gr/gr je najviše proučavana u kontekstu asocijacije sa muškim sterilitetom međutim njen uticaj na fertilitet muškaraca do danas nije u potpunosti razjašnjen. Na osnovu rezultata prethodno objavljenih studija ova delecija predstavlja potencijalni faktor rizika koji se dovodi u vezu sa smanjenim brojem spermatozoida u ejakulatu (85,93). Takođe, postoje studije koje negiraju negativne efekte gr/gr na proces spermatogeneze i potencijalnu asocijaciju sa muškim sterilitetom (94,95).

Rezultati meta-analize, koja je uključila više od 12,000 ispitanika, pokazali su da je gr/gr delecija prisutna sa većom učestalošću kod sterilnih nego kod fertilnih muškaraca, kao i da asocijacija ove varijante sa rizikom za pojavu muškog steriliteta zavisi od etničkog porekla i geografskog regiona, pri čemu je asocijacija bila statistički značajna u populacijama Evrope i zapadnog Pacifika (96).

Uprkos suprotstavljenim zaključcima dobijenih iz studija koje su analizirale asocijaciju gr/gr delecije sa muškim sterilitetom, Evropsko udruženje urologa (eng. *European Association of Urology*, EAU) prepoznalo je ovu varijantu kao eklatantan primer značajnog genetičkog doprinosioca riziku za poremećaj u proizvodnji spermatozoida (17).

U grupi muškaraca analiziranih našom studijom, detektovana je delecija gr/gr kod četiri muškarca sa dijagnozom oligoastenozoospermije, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima koji ukazuju da delecija gr/gr može biti asocirana sa sterilitetom kod muškaraca sa smanjenim brojem i procentom progresivno pokretnih spermatozoida (97). Prisustvo delecije gr/gr nije detektovano u grupama fertilnih muškaraca i muškaraca sa dijagnozom NOA.

Kada smo analizirali sve delecije detektovane u okviru regiona *AZF*, pri čemu delecija b2/b4 nije uzimana u obzir zbog ranije potvrđene uloge kao direktnog uzročnika steriliteta, korišćenjem Fišerovog ekzaktnog testa dobijen je statistički značajan rezultat za asocijaciju delecija u okviru regiona *AZF* sa muškim sterilitetom (P -vrednost=0,024). Statistički značajan rezultat dobijen je i za asocijaciju sa

oligoastenozoospermijom nakon što su ispitanici podeljeni u grupe na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta (P -vrednost=0,009).

U dve prethodne studije, korišćenjem metode MLPA, detektovane su CNVs po tipu kompleksnih rearanžmana u okviru regiona *AZF* hromozoma Y. Međutim, klinički značaj ovih rearanžmana i dalje predstavlja nepoznanicu (38,88). U našoj studiji, kod dva fertilna i kod jednog muškarca sa dijagnozom oligoastenozoospermije, identifikovana je kompleksna varijanta koja nastaje inverzijom između amplicona r2 i r3, nakon koje dolazi do duplikacije regiona između amplicona b2 i b3, a zatim i do delecije regiona između amplicona b3 i b4. Ovaj tip varijacije u broju kopija nije detektovan u prethodnim studijama, a nakon poređenja učestalosti pojavljivanja ove varijante u grupama slučajeva i kontrola u okviru naše studije, nisu dobijeni statistički značajni rezultati koji bi ukazivali na asocijaciju sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

U ovoj studiji detektovano je deset različitih tipova varijacija u broju kopija koji se javljaju u okviru regiona *AZF* hromozoma Y, nakon čega su analizirane njihove učestalosti u grupama sterilnih i fertilnih muškaraca iz populacije Srbije. Rezultati dobijeni nakon statističke analize ukazuju na moguću asocijaciju varijacija po tipu delecija prisutnih u okviru regiona *AZFc* sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca. Odsustvo nekih od analiziranih varijanti u kontrolnoj grupi ukazuju na činjenicu da se dobijeni rezultati mogu tumačiti samo u okvirima ove studije koja je bila ograničena brojem uključenih muškaraca. Da bi se bolje opisala i okarakterisala asocijacija CNVs regiona *AZF* hromozoma Y sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca, neophodno bi bilo da se prošire grupe kako sterilnih tako i fertilnih ispitanika.

U okviru ove teze analizirana je asocijacija između tri genetičke varijante u okviru gena *NOS3*, selektovane na osnovu kriterijuma definisanih u Materijal i Metode 3.2.3, i rizika za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije, uzimajući u obzir kontradiktornost rezultata prethodnih studija nastalih usled metodoloških razlika i uticaja genetičkog i geografskog porekla. Ovo je prva studija koja se bavi ovom temom sprovedena u populaciji Srbije i druga koja je sprovedena u populacijama Evrope. Upravo to je bio motiv za sprovođenje studije slučajeva i kontrola kako bi se formirala šira slika o uticaju genetičkih varijanti gena *NOS3* na razvoj muškog steriliteta u populacijama muškaraca poreklom iz Evrope.

Enzim azot-monoksid sintetaza 3 (*NOS3*) konstitutivno se eksprimira u testisima i produkuje male količine NO koje imaju protektivnu ulogu u uslovima oksidativnog stresa. Promene u aktivnosti ovog enzima i smanjena produkcija NO mogu dovesti do oksidativnog stresa koji predstavlja jedan od faktora rizika asociраних sa pojavom steriliteta kod muškaraca (63).

Nekoliko studija imalo je za cilj ispitivanje efekta visokih koncentracija NO na kvalitet spermatozoida poredeći parametre semene tečnosti između grupe muškaraca sa kliničkom dijagnozom astenozoospermije i muškaraca sa normalnim parametrima semene tečnosti (53,60,65). Rezultati ovih studija pokazali su da visoke koncentracije NO u ejakulatu muškaraca sa astenozoospermijom negativno utiču na kinetičke karakteristike spermatozoida i posledično dovode do smanjene pokretljivosti spermatozoida (53).

Uticaj genetičkih varijanti u okviru gena *NOS3* na ekspresiju gena, količinu ekspimiranog proteina i enzimatsku aktivnost proteina *NOS3* pokazan je u endotelnim ćelijama uzgajanim u ćelijskoj kulturi, kao i u tkivu placente, što ukazuje na funkcionalni značaj analiziranih genetičkih varijanti (98,99). Takođe, rezultati istraživanja sprovedeni od strane *Son-a* i saradnika, pokazali su statistički značajnu asocijaciju između manje učestalog alela intronske varijante 4a/4b i rizika za pojavu astenozoospermije kod muškaraca. Merenjima nivoa ekspresije iRNK za protein *NOS3* pokazano je da je ekspresija ovog gena značajno povećana kod muškaraca sa astenozoospermijom u poređenju sa

fertilnim kontrolama (65). Rezultati studije sprovedene u populaciji Italije pokazali su da manje učestali alel T genetičke varijante rs1799983 može doprineti smanjenoj pokretljivosti spermatozoida. U okviru iste studije, *Buldreghini* i saradnici, potvrdili su da je nivo ekspresije gena *NOS3* viši u uzorcima periferne krvi kod muškaraca sa astenozoospermijom u poređenju sa muškarcima koji su imali neizmenjene parametre semene tečnosti. Takođe, pokazana je i pozitivna korelacija između koncentracije NO i procenta nepokretnih spermatozoida (60).

Uloga genetičkih varijanti gena *NOS3* u razvoju muškog steriliteta proučavana je u okviru studija asocijacija sprovedenih u populacijama Brazila, Italije, Južne Koreje, Kine i Irana. Studije sprovedene u populaciji Kine uključivale su i meta-analizu rezultata prethodno publikovanih studija (59–65).

Dve nezavisne studije slučaja i kontrola sprovedene u populacije Kine analizirale su asocijaciju tačkaste genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca. *Ying* i saradnici pokazali su statistički značajnu asocijaciju između manje učestalog alela C i genotipa TC varijante rs2070744 sa pojavom steriliteta kod muškaraca sa dijagnozom azoospermije i oligozoospermije, dok *Song* i saradnici nisu potvrdili ovu asocijaciju analizirajući grupu muškaraca sa astenozoospermijom (63,65). Međutim rezultati meta-analize sprovedene u prethodnoj studiji potvrdile su asocijaciju varijante rs2070744 sa muškim sterilitetom u populacijama Evrope i Azije. Rezultati studija sprovedenih u populacijama Brazila i Južne Koreje nisu ukazivali na postojanje asocijacije između varijante rs2070744 i rizika za pojavu steriliteta u grupama muškaraca sa kliničkom dijagnozom NOA i težeg oblika oligozoospermije (59,62). Rezultati studije sprovedene u populaciji Indije od strane *Safarinejad*-a i saradnika, govore u prilog asocijacije varijante rs2070744 sa muškim sterilitetom, ističući da je učestalost homozigota CC značajno viša u grupi muškaraca sa dijagnozom azoospermije u odnosu na grupu muškaraca sa oligoastenoteratozoospermijom (61).

U okviru naše ove studije nije utvrđena statistički značajna asocijacija između alela i genotipova varijante rs2070744 sa rizikom za pojavu steriliteta kod ispitivanih muškaraca.

Rezultati *Buldreghini*-ja i saradnika ukazuju da manje učestali alel T tačkaste genetičke varijante rs1799983 može imati uticaja na smanjenu pokretljivost spermatozoida kod sterilinih muškaraca iz populacije Italije sa dijagnozom astenozoospermije (60). S druge strane, u populaciji Irana manje učestali alel T i homozigot TT varijante rs1799983 nisu bili asociirani sa muškim sterilitetom (61).

Rezultati dobijeni u okviru ovog doktorata, kao i rezultati dobijeni u studijama sprovedenim u populacijama Kine, Brazila, nisu potvrdili postojanje asocijacije genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta (62,64,65).

Dve studije sprovedene u populacijama Kine i Južne Koreje potvrdile su pozitivnu korelaciju između manje učestalog alela 4a i heterozigota intronske varijante 4a/4b i rizika za pojavu muškog steriliteta. Ovi rezultati potvrđeni su i u meta-analizama prisutnim u obe studije (59,65). Rezultati studije sprovedene u populaciji Srbije ukazuju na asocijaciju heterozigota intronske varijante 4a/4b sa povećanim rizikom za nastanak muškog steriliteta kod muškaraca sa oligoastenozoospermijom.

Na osnovu korelacije između parametara dobijenih analizom spermograma i genotipova intronske varijante 4a/4b, *Yun* i saradnici ukazuju na efekat ove varijante na morfologiju spermatozoida (59). Takođe studija sprovedena u populaciji Irana pokazala je negativnu korelaciju između vrednosti parametara semene tečnosti i manje učestalog alela intronske varijante, dok studija sprovedena od strane *Song*-a i saradnika ukazuje na negativnu korelaciju između iste varijante i kako ukupnog broja, tako i broja progresivno pokretnih spermatozoida u ejakulatu (61,65). Ovi rezultati dodatno podržavaju

rezultate prikazane u okviru ove doktorske teze i pružaju potencijalno objašnjenje za biološku ulogu koju intronska varijanta 4a/4b ima na pokretljivost i broj spermatozoida.

Meta-analizom, koja je objedinila rezultate do sada objavljenih studija slučajeva i kontrola, formirana je grupa od 1356 sterilnih muškaraca i 1083 kontrola u kojoj je potvrđena statistički značajna asocijacija manje učestalih alela i genotipova genetičkih varijanti rs2070744 i rs1799983 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta (63). Uzimajući u obzir rezultate meta-analize, za očekivati je da bi povećanje broja ispitanika, kako fertilnih tako i sterilnih muškaraca, u našoj studiji potvrdilo postojanje asocijacije genetičkih varijanti rs2070744 i rs1799983 sa pojavom steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije.

Studija sprovedena u okviru ove teze predstavlja doprinos rasvetljavanju uloge koju tri genetičke varijante selektovane na osnovu rezultata GWAS imaju prilikom nastanka muškog steriliteta na grupi muškaraca sa dijagnozom NOA i oligoastenozoospermije iz populacije Srbije.

Studija asocijacije na čitavom genomu sprovedena u populaciji Kine identifikovala je tri tačkaste genetičke varijante asociirane sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca sa dijagnozom NOA (43). Nakon inicijalne GWAS usledilo je nekoliko studija slučajeva i kontrola sprovedenih na ispitanicima azijskog porekla u nastojanju da se rezultati prethodne studije provere u okviru nezavisnih studija, što je dovelo do neslaganja u rezultatima dobijenih za asocijacije analiziranih varijanti sa muškim sterilitetom (47, 99–101).

Izostanak rezultata koji bi ukazali na moguću asocijaciju genetičke varijante rs12097821 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta u populaciji Srbije u suprotnosti je sa rezultatima dobijenih na osnovu GWA studije sprovedene od strane *Hu*-a i saradnika. Međutim, odsustvo asocijacije rs12097821 sa muškim sterilitetom potvrđeno u okviru ove teze, u saglasnosti je sa rezultatima nezavisnih studija asocijacije sprovedenih u azijskim populacijama (47, 99–101). S druge strane, u većini ovih studija, asocijacija nije testirana za višestruke genetičke modele što bi moglo uticati na postojeće rezultate studija.

Rezultati *Liu*-a i saradnika pokazali su statistički značajnu asocijaciju između genetičke varijante rs2477686 i muškog steriliteta kod muškaraca sa oligozoospermijom, oligoastenozoospermijom i astenozoospermijom, kao i smanjenje broja progresivno pokretnih spermatozoida asociirano sa genotipom GG iste genetičke varijante (101). Takođe, ovo je jedina među prethodnim studijama asocijacije koja je analizirala asocijaciju tri genetičke varijante sa rizikom za pojavu steriliteta u grupama muškaraca sa smanjenim brojem i/ili pokretljivošću spermatozoida, dok su druge studije uključivale samo muškarce sa dijagnozom NOA. Iako slučajevi nisu bili stratifikovani na osnovu kliničke dijagnoze, rezultati studije sprovedene od strane *Liu*-a i saradnika u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze koji ukazuju na protektivni efekat manje učestalog alela C genetičke varijante rs2477686. Naši rezultati su u saglasnosti i sa rezultatima dobijenim u studijama sprovedenim u populacijama Kine i Japana koji ukazuju na potencijalnu asocijaciju varijante rs2477686 sa sterilitetom kod muškaraca sa dijagnozom NOA (48,100,102).

Kada je reč o potencijalnoj asocijaciji genetičke varijante rs10842262 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta, rezultati inicijalne GWA studije, kao i rezultati studije asocijacije sprovedene u populaciji Kine, potvrdile su asocijaciju alela i genotipova ove genetičke varijante u grupi muškaraca sa dijagnozom NOA (43,48). U studiji sprovedenoj od strane *Tu*-a i saradnika postignut je statistički trend značajnosti za asocijaciju rs10842262 sa NOA, dok u okviru studije *Sato*-a i saradnika ova asocijacija nije bila potvrđena (99,101).

Rezultati naše studije pokazali su statistički značajnu razliku u učestalosti genotipova genetičke varijante rs10842262 između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola. Statistički značajni rezultati dobijeni su samo u slučaju sterilnih muškaraca sa dijagnozom NOA, što je u saglasnosti sa rezultatima

prethodno objavljenih studija (43,48). Uprkos tome, učestalosti genotipova varijante rs10842262 u okviru naše studije nisu bile u saglasnosti sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom i iz tog razloga ponovljena je genotipizacija dela uzoraka korišćenjem alternativne metode za genotipizaciju.

Rezultati Sangerovog sekvenciranja nisu ukazali na greške u genotipizaciji nastale korišćenjem metode RFLP, a jedan od razloga koji bi objasnio zašto učestalosti genotipova genetičke varijante rs10842262 nisu bile u saglasnosti sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom može biti negativna selekcija nastala usled štetnih efekata ove genetičke varijante na fertilitet u analiziranim grupama ispitanika (77,103,104).

Rezultati meta-analize, koji su uključivali i inicijalnu GWAS, pokazali su asocijaciju rs12097821 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta, što je potvrđeno i u grupi muškaraca sa NOA nakon stratifikacije grupe ispitanika na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta. Asocijacija je bila značajna za tri od ukupno četiri testirana genetička modela što može ukazivati da rezultati inicijalne GWA studije usled velikog broja ispitanika u poređenju sa ostalim studijama, mogu predominantno uticati na dobijene rezultate. Iz tog razloga, tokom sinteze podataka i formiranja studijskih panela, odlučeno je da se meta-analiza ponovi bez uključivanja rezultata dobijenih u okviru ove GWAS (43). U ostalim studijama, asocijacija varijante rs12097821 sa muškim sterilitetom nije analizirana na osnovu dominantnog, recesivnog i overdominantnog modela, ali su učestalosti genotipova bile uključene u meta-analizu.

Rezultati meta-analize bez inicijalne GWAS nisu ukazivali na statistički značajnu asocijaciju, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodne meta-analize sprovedene od strane *Tu*-a i saradnika (100), pri čemu je vrednost OR dobijena na osnovu alelskog modela bila drugačija. Ovakav rezultat ukazuje da naša studija asocijacije, kao i skorašnja studija sprovedena od strane *Liu*-a i saradnika (101), nemaju značajan doprinos kada je u pitanju analiza asocijacije rs12097821 sa muškim sterilitetom. Rezultati dobijeni za preostale genetičke modele ne mogu se porediti sa rezultatima *Tu*-a i saradnika zato što je njihovoj studiji kvantitativna sinteza podatak rađena samo na osnovu alelskog modela. Ipak, nakon isključivanja inicijalne GWAS iz rezultata, statistička značajnost nije postignuta ni za jedan od genetičkih modela, što nedvosmisleno ukazuje na dominantni uticaj GWAS na rezultate. Dodatne studije slučajeva i kontrola koje bi analizirale genetičku varijantu rs12097821 bile bi neophodne kako bi se jasno utvrdilo da li je ova varijanta asociirana sa rizikom za pojavu muškog steriliteta.

Kada je u pitanju genetička varijanta rs2477686, slično kao i u slučaju varijante rs12097821, pretpostavljamo da je veličina GWAS imala uticaj na rezultate prethodno objavljene meta-analize sprovedene od strane *Tu*-a i saradnika (100). Međutim, u okviru naše meta-analize statistički značajna asocijacija dobijena je na osnovu alelskog i recesivnog genetičkog modela i nakon isključivanja GWAS studije iz analize. Takođe, asocijacija manje učestalog alela G sa rizikom za pojavu muškog steriliteta bila je statistički značajna u podgrupi muškaraca azijskog porekla. Štaviše, statistički značajna asocijacija na osnovu alelskog genetičkog modela dobijena je za podgrupu studija koje su uključivale muškarce sa kliničkom dijagnozom oligoazoospermije, oligoastenozoospermije ili astenozoospermije. Iako su u okviru ove podgrupe uključeni samo muškarci iz naše studije i studije *Lu*-a i saradnika (101), statistički značajne asocijacije su zabeležene u obe studije. Dodatne studije asocijacije, sprovedene u populacijama Evrope i Azije, neophodne su, kako bi se validirala dobijena asocijacija varijante rs2477686 sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca sa smanjenim brojem i pokretljivošću spermatozoida, i kako bi se testirala potencijalna asocijacija sa sterilitetom u grupi muškaraca sa NOA.

Nakon isključivanja inicijalne GWAS iz meta-analize, statistički značajan rezultat prema recesivnom i alelskom genetičkom modelu dobijen je analizom asocijacije genetičke varijante rs10842262 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta. Ovakav rezultat bio je očekivan uzimajući u obzir činjenicu da je u nekolicini prethodnih studija varijanta rs10842262 bila asociirana sa NOA ili sa opštim

rizikom za pojavu muškog steriliteta. Ovi rezultati takođe su u saglasnosti sa rezultatima prethodne meta-analize koja nije uzimala u obzir rezultate naše studije, ali je uključila rezultate inicijalne GWAS (102).

Jedno od ograničenja analiza sprovedene u okviru ove studije je relativno mali uzorak slučajeva i kontrola posebno uzimajući u obzir broj sterilnih muškaraca u podgrupama nakon razdvajanja na osnovu kliničke dijagnoze steriliteta. Kako bi se potvrdili rezultati dobijeni u okviru ove studije, neophodno je uključiti više sterilnih muškaraca u replikativnim studijama slučajeva i kontrola sa muškarcima iz Republike Srbije.

Neslaganje u dobijenim rezultatima između naše i ranije sprovedenih studija može se objasniti razlikama u etničkom i geografskom poreklu ispitanika, kao i u dizajnu samih studija, selekciji i regrutovanju učesnika, kriterijumima za isključivanje i primenjivanim metodama za genotipizaciju. Ovo je prva studija koja je testirala asocijacije varijanti odabranih na osnovu rezultata studije *Hu*-a i saradnika u jednoj evropskoj populaciji, poređenja sa drugim studijama bila su ograničena samo na one sprovedene u populacijama Azije, pri čemu je asocijacija sa oligoastenozoospermijom analizirana samo u jednoj od prethodnih studija (101). Uzimajući sve ove činjenice u obzir, dodatne studije sprovedene u populacijama koje do sada nisu obuhvaćene, obezbedile bi rezultate neophodne za donošenje preciznijih zaključaka o potencijalnoj asocijaciji genetičkih varijanti selektovanih na osnovu GWAS sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca različitog etničkog porekla, kao i o asocijacijama sa kliničkim parametrima koji utiču na broj i pokretljivost spermatozoida.

I pored navednih limitacija naše studije, mišljenja smo da su dobijeni rezultati dobar osnov za dalja ispitivanja uloge genetičkih varijanti i varijacija u broju kopija u patogenezi idiopatskog steriliteta kod muškaraca iz Srbije.

6. Zaključci

- Korišćenjem metode MLPA ukupno je detektovano 10 tipova CNVs u okviru regiona *AZF* hromozoma Y, od toga 6 duplikacija, tri delecije i jedan kompleksni rearanžman.
- Na osnovu rezultata Fišerovog egzaktnog testa uočena je statistički značajna razlika u učestalosti gr/gr delecije između sterilnih muškaraca sa ologoastenozoospermijom i fertilnih kontrola.
- Statistički značajan rezultat dobijen je nakon poređenja učestalosti svih delecija detektovanih u okviru regiona *AZFc* između sterilnih muškaraca i fertilnih kontrola, kao i između muškaraca sa dijagnozom oligoastenozoospermije i fertilnih muškaraca.
- Genetička varijanta 4a/4b asocirana je sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije sa dijagnozom oligostenozoospermije (na osnovu overdominantnog genetičkog modela).
- Statistički trend značajnosti prilikom testiranja asocijacije između genetičke varijante rs2070744 i rizika za pojavu steriliteta kod muškaraca sa oligoastenozoospermijom. (na osnovu dominantnog genetičkog modela) i kod muškaraca sa NOA (na osnovu dominantnog i log-aditivnog genetičkog modela).
- Genetička varijanta rs10842262 asocirana je sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije (na osnovu kodominantnog i overdominantnog genetičkog modela). Ista varijanta asocirana je sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije sa dijagnozom NOA (na osnovu kodominantnog, dominantnog i overdominantnog genetičkog modela).
- Genetička varijanta rs2477686 asocirana je sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca iz populacije Srbije sa dijagnozom oligoastenozoospermije (na osnovu log-aditivnog genetičkog modela).
- Nakon isključivanja inicijalne GWAS iz meta-analize, asocijacija rs2477686 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta bila je statistički značajna (na osnovu recesivnog genetičkog modela). Statistički značajan rezultat prema alelskom modelu dobijen je za podgrupu studija koje su uključivale muškarce sa dijagnozom oligoastenozoospermije. Na osnovu istog genetičkog modela dobijen je statistički trend značajnosti za asocijaciju sa rizikom za pojavu steriliteta kod muškaraca sa NOA. Statistička značajnost postignuta je u grupi muškaraca azijskog porekla prema alelskom genetičkom modelu.
- Nakon isključivanja inicijalne GWAS iz meta-analize, asocijacija rs10842262 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta bila je statistički značajna (na osnovu recesivnog i alelskog genetičkog modela). Statistička značajnost rezultata bila je prisutna i u podgrupi slučajeva i kontrola azijskog porekla, kao i u podgrupi sterilnih muškaraca sa dijagnozom NOA.

7. Literatura

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002; 77(5):873–82.
2. 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.
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.
4. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. 2013; 99(4):998-1007.
5. Hwang K, Lipshultz LI, Lamb DJ. Use of diagnostic testing to detect infertility. *Curr Urol Rep*. 2011; 12(1):68–76.
6. Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG. Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17(2):211-29.
7. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization; 2010. Previous editions had different title : WHO labora.
8. 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.
9. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod*. 2008; 79(2):180-9.
10. Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, de Kretser DM, et al. The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(7):507-2.
11. 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.
12. Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2007; 87(3):565-71.
13. Harewood L, Fraser P. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(R1):R76-82.
14. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. 2018;15(6):369–84.
15. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976; 34(2):119-24.
16. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(8):1161-9.
17. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F, European Academy of A, European Molecular Genetics Quality N. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2014;2(1):5-19.
18. Ramathal C, Angulo B, Sukhwani M, Cui J, Durruthy-Durruthy J, Fang F, et al. DDX3Y gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. *Sci Rep*. 2015; 5:15041.
19. Blagosklonova O, Fellmann F, Clavequin MC, Roux C, Bresson JL. AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6(9):795-9.
20. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet*. 2003; 40(1):18-24.
21. Singh K, Raman R. Male infertility: Y-chromosome deletion and testicular aetiology in cases of azoo-/oligospermia. *Indian J Exp Biol*. 2005; 43(11):1088-92.
22. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Veen F Van Der, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and

- spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(4):906-22.
23. Yang B, Ma Y, Liu Y, Li L, Yang D, Tu W, et al. Common AZFc structure may possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non-allele homologous recombination. *Sci Rep.* 2015; 5(1):10551.
 24. McElreavey K, Ravel C, Chantot-Bastaraud S, Siffroi J-P. Y chromosome variants and male reproductive function. *Int J Androl.* 2006; 29(1):296-8.
 25. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(8):739-44.
 26. Lu C, Jiang J, Zhang R, Wang Y, Xu M, Qin Y, et al. Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20(9):836-43.
 27. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part I. *Urol J.* 2006; 3(4):193-203.
 28. Eggers S, DeBoer KD, van den Bergen J, Gordon L, White SJ, Jamsai D, et al. Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. *Fertil Steril.* 2015; 103(1):214-9.
 29. Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 2004; 41(11):814-25.
 30. Krausz C, Giachini C. Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl.* 2012; 53(3):125-33.
 31. Imken L, Houate B El, Chafik A, Nahili H, Boulouiz R, Abidi O, et al. AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Moroccan men. *Asian J Androl.* 2007; 9(5):674-8.
 32. Lin YW, Hsu LC, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh SD, et al. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat.* 2007;28(5):486-94.
 33. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2005; 20(1):191-7.
 34. Zhang F, Li Z, Wen B, Jiang J, Shao M, Zhao Y, et al. A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians. *Ann Hum Genet.* 2006; 70(Pt 3):304-13.
 35. 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.
 36. Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Xiao C, Li S, et al. Evidence for the association of Y-chromosome haplogroups with susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese Han population. *J Med Genet.* 2007; 45(4):210-5.
 37. 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.
 38. Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, et al. Copy-number variations in Y-chromosomal azoospermia factor regions identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Hum Genet.* 2015; 60(3):127-31.
 39. 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.
 40. Zondervan KT, Cardon LR. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nat Protoc.* 2007; 2(10):2492-501.
 41. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(2):91-9.
 42. Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology* 2014; 2(3):315-21.

43. Hu Z, Xia Y, Guo X, Dai J, Li H, Hu H, et al. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet.* 2011; 44(2):183-6.
44. Luo M, Li Y, Guo H, Lin S, Chen J, Ma Q, et al. Protein Arginine Methyltransferase 6 Involved in Germ Cell Viability during Spermatogenesis and Down-Regulated by the Androgen Receptor. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(12):29467-81.
45. Daigle M, Roumaud P, Martin LJ. Expressions of Sox9, Sox5, and Sox13 transcription factors in mice testis during postnatal development. *Mol Cell Biochem.* 2015; 407(1–2):209-21.
46. ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN. Peroxisome biogenesis factor 10. [Internet]. Available from: <https://www.omim.org/entry/602859>
47. Chen H, Liu Z, Huang X. *Drosophila* models of peroxisomal biogenesis disorder: peroxins are required for spermatogenesis and very-long-chain fatty acid metabolism. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(3):494-505.
48. Zou S, Li Z, Wang Y, Chen T, Song P, Chen J, et al. Association study between polymorphisms of PRMT6, PEX10, SOX5, and nonobstructive azoospermia in the Han Chinese population. *Biol Reprod.* 2014; 90(5):96.
49. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod.* 2011; 26(7):1628-40.
50. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009; 73(3):461-9.
51. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12):3051-64.
52. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298 (Pt 2):249-58.
53. Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, et al. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J Androl.* 2004; 25(2):245-9.
54. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod.* 1996; 55(5):935-41.
55. Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2(11):873-8.
56. Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl.* 2001; 22(3):349-56.
57. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W, Pelvan A, Becker J, Halle M, et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res.* 2004; 95(8):841-7.
58. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J.* 2007; 21(11):2655-63.
59. Yun YJ, Park JH, Song SH, Lee S. The association of 4a4b polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene with the sperm morphology in Korean infertile men. *Fertil Steril.* 2008; 90(4):1126-31.
60. Buldreghini E, Mahfouz RZ, Vignini A, Mazzanti L, Ricciardo-Lamonica G, Lenzi A, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (Glu298Asp variant) in infertile men with asthenozoospermia. *J Androl.* 2010; 31(5):482-8.
61. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. *Mol Reprod Dev.* 2010; 77(8):720-7.
62. Bianco B, Ghirelli-Filho M, Cavalheiro CM, Cavalcanti V, Peluso C, Gava MM, et al. Variants in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene in idiopathic infertile Brazilian men. *Gene* 2013;

- 519(1):13-7.
63. Ying H-Q, Pu X-Y, Liu S-R, A Z-C. Genetic variants of eNOS gene may modify the susceptibility to idiopathic male infertility. *Biomarkers* 2013; 18(5):412-7.
 64. Yu Q, Zhang Y, Xia Y, Yang X, Li N, Ye L, et al. Analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) G894T polymorphism and semen parameters in a Chinese Han population. *Andrologia* 2014; 46(5):541-6.
 65. Song P, Zou S, Chen T, Chen J, Wang Y, Yang J, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis. *Biol Reprod.* 2015; 92(2):38.
 66. Kim HS, Bae S-C, Kim T-H, Kim S-Y. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Int Orthop.* 2013; 37(11):2289-96.
 67. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Tournaye H, et al. Guidelines on male infertility, European Association of Urology guidelines. Arnhem the Netherlands. 2015;
 68. Russell DW, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY; 2001.
 69. Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B. PCR u kliničkoj dijagnostici. Beograd: Biološki fakultet. 1999.
 70. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15):e115-e115.
 71. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; 99(22):2864-70.
 72. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002; 87(6):525-8.
 73. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22(15):1928-9.
 74. 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.
 75. Jolliffe I, Lovric M. International encyclopedia of statistical science. Principal Component Analysis. Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg; 2011. p.1094–6.
 76. Wallace BC, Dahabreh IJ, Trikalinos TA, Lau J, Trow P, Schmid CH. Closing the Gap between Methodologists and End-Users: *R* as a Computational Back-End. *J Stat Softw.* 2012; 49(5).
 77. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 22(4):719-48.
 78. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials.* 1986; 7(3):177-88.
 79. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ.* 1997; 315(7109):629-34.
 80. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(12):e57.
 81. MRC-Holland. SALSA MLPA P360 Y Chromosome Probemix. [Internet]. Available from: <https://www.mlpa.com>
 82. Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2010; 16(5):525–42.
 83. Team RC. *R: A language and environment for statistical computing.* 2013;
 84. Xie S, Zhang Y, Yang Y. Is the primary AZFc duplication a potential risk for male infertility?: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2020; 8(5):996-1004.

85. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 2008; 124(4):399-410.
86. Ye J, Ma L, Yang L, Wang J, Wang Y, Guo H, et al. Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013; 14(9):807-15.
87. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 16(1):14.
88. Zhou R, Cheng J, Ma D, Tan J, Wang Y, Hu P, et al. Identifying Novel Copy Number Variants in Azoospermia Factor Regions and Evaluating Their Effects on Spermatogenic Impairment. *Front Genet.* 2019; 10:427.
89. Repping S, van Daalen SKM, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 2004; 83(6):1046-52.
90. Wu B, Lu NX, Xia YK, Gu AH, Lu CC, Wang W, et al. A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod.* 2007; 22(4):1107-13.
91. Eloulid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One* 2012; 7(4):e34902.
92. Pan Y, Li L, Yu Y, Jiang Y, Yang X, Zhang H, et al. Natural transmission of b2/b3 subdeletion or duplication to expanded Y chromosome microdeletions. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2018; 24:6559.
93. de Llanos M, Balleca JL, Gazquez C, Margarit E, Oliva R. High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. *Hum Reprod.* 2005; 20(1):216-20.
94. Carvalho CMB, Zuccherato LW, Bastos-Rodrigues L, Santos FR, Pena SDJ. No association found between gr/gr deletions and infertility in Brazilian males. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12(4):269-73.
95. Yang Y, Xiao C-Y, Zhang S-Z, Li X, Zhang S-X. DAZ1/DAZ2 cluster deletion mediated by gr/gr recombination per se may not be sufficient for spermatogenesis impairment: a study of Chinese normozoospermic men. *Asian J Androl.* 2006; 8(2):183-7.
96. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011; 17(2):197-209.
97. Visser L, Westerveld GH, Korver CM, van Daalen SKM, Hovingh SE, Rozen S, et al. Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality. *Hum Reprod.* 2009; 24(10):2667-73.
98. Song J, Yoon Y, Park KU, Park J, Hong YJ, Hong SH, et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells. *Clin Chem.* 2003; 49(6 Pt 1):847-52.
99. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett.* 2000; 471(1):45-50.
100. Tu W, Liu Y, Shen Y, Yan Y, Wang X, Yang D, et al. 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.
101. Liu S-Y, Zhang C-J, Peng H-Y, Sun H, Lin K-Q, Huang X-Q, et al. Strong association of SLC1A1 and DPF3 gene variants with idiopathic male infertility in Han Chinese. *Asian J Androl.* 2017; 19(4):486.
102. Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, et al. Replication study and meta-analysis of human nonobstructive azoospermia in Japanese populations. *Biol Reprod.* 2013; 88(4):81-7.
103. Neale B, Ferreira M, Medland S, Posthuma D. Statistical genetics: gene mapping through linkage and association. *Garland Science;* 2007.

104. Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol.* 1999; 149(8):706-11.

8. Prilozi

Prilog 1. **Rezultati testa odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi za genetičke varijante selektovane na osnovu rezultata GWA studija.**

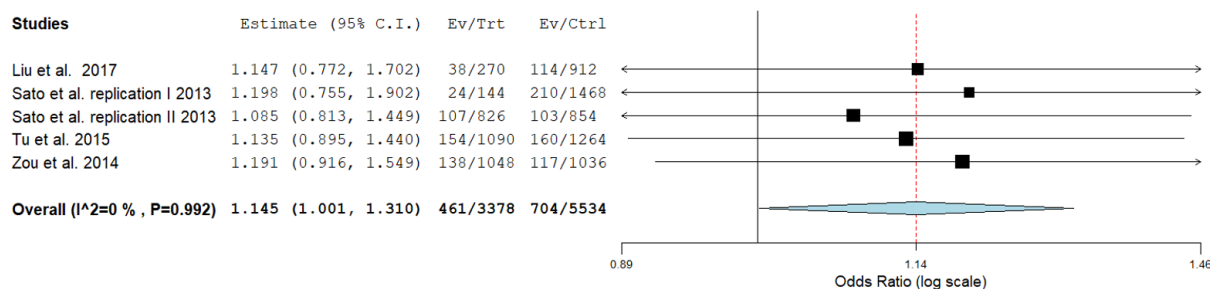
Genetička varijanta	P vrednost
rs12097821	0,683987
rs2477686	1
rs10842262	0,000814

Prilog 2. **Rezultati testa odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi za genetičke varijante u genu za NOS3.**

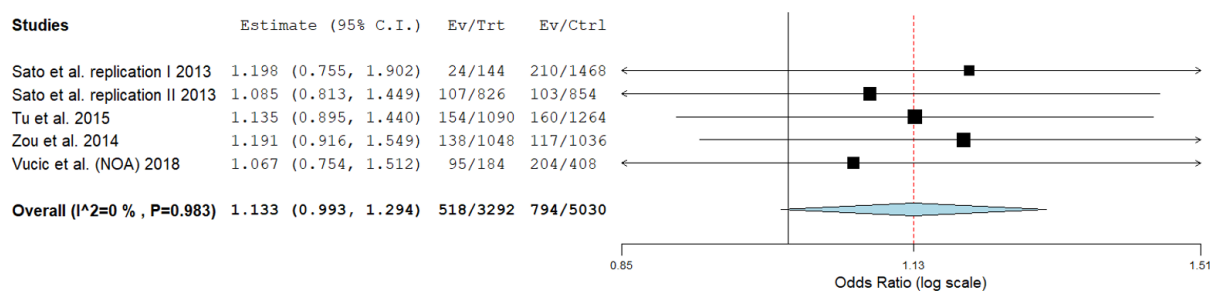
Genetička varijanta	P vrednost
rs1799983	0,773004
rs2070744	0,266371
4a/4b	0,595447

Prilog 3. **Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs2477686 sa rizikom za pojavu muškog steriliteta kod muškaraca iz populacija Azije za alelski (A), dominantni (B), overdominantni (C) i recesivni (D) genetički model.** Rezultati dobijeni na osnovu različitih genetičkih modela predstavljeni su kao OR sa 95% CI, sveukupni efekat sa 95% prikazan je na Šumskom dijagramu. Veličina kvadratnih simbola predstavlja rezultat studije proporcionalan veličini učinka pojedinačnih studijskih panela. P-vrednosti su dobijene iz testova heterogenosti rezultata studija.

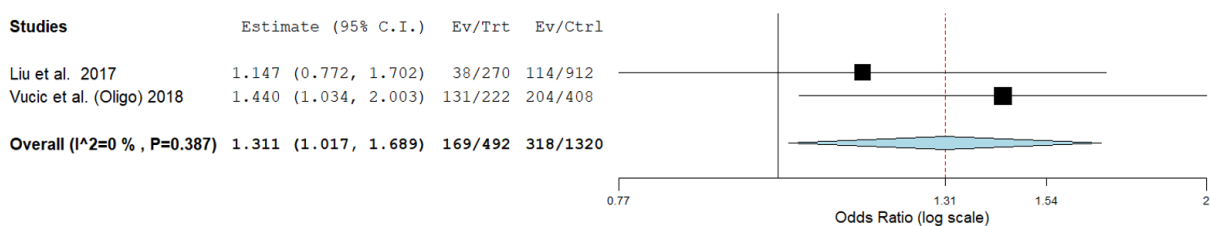
A



B

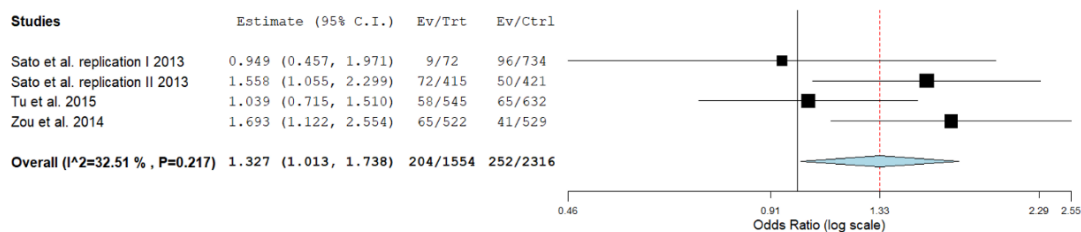


C

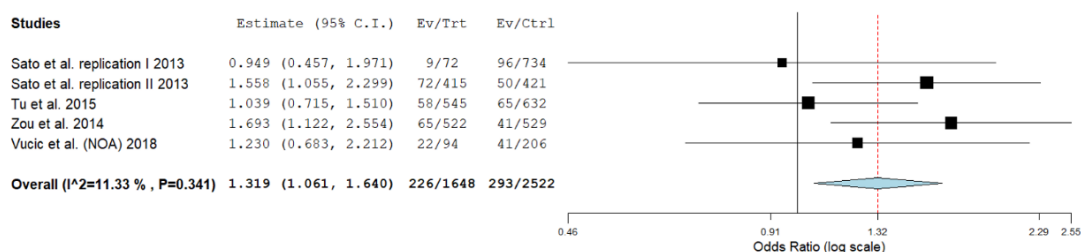


Prilog 4. **Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs10842262sa rizikom za pojavu muškog steriliteta kod muškaraca iz populacija Azije i muškaraca sa NOA za alelski (A), dominantni (B), overdominantni (C) i recesivni (D) genetički model.** Rezultati dobijeni na osnovu različitih genetičkih modela predstavljeni su kao OR sa 95% CI, sveukupni efekat sa 95% prikazan je na Šumskom dijagramu. Veličina kvadratnih simbola predstavlja rezultat studije proporcionalan veličini učinka pojedinačnih studijskih panela. P-vrednosti su dobijene iz testova heterogenosti rezultata studija.

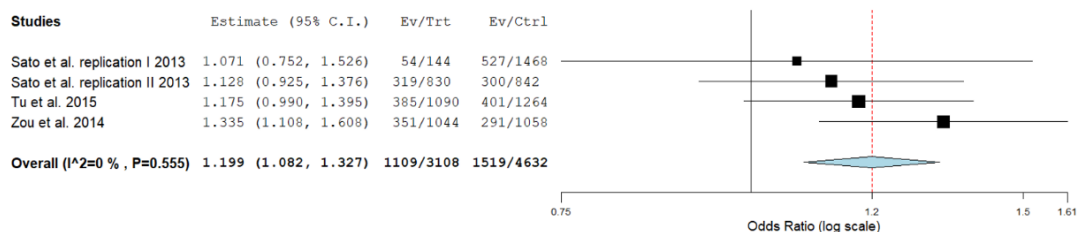
A



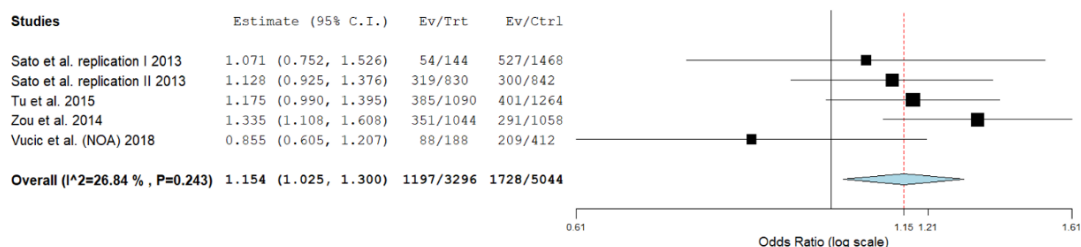
B



C



D



Biografija autora

Nemanja Lj. Vučić rođen je 26.12.1990. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije u trajanju od četiri godine, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisao je školske 2009/2010. godine i završio u roku sa prosečnom ocenom 8,98. Master studije upisao je 2013. godine na istom fakultetu, smer Molekularna biologija i fiziologija, modul Humana molekularna genetika, i završio u roku, sa prosečnom ocenom 10,00. Master tezu pod nazivom „Studija asocijacije genetičkih varijanti rs1799983 i rs2070744 u genu za NOS3 sa pojavom steriliteta kod muškaraca u populaciji Srbije“ odbranio je u junu 2014. godine. Godine 2014. upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota.

Od 2015. godine bio je angažovan na nacionalnom projektu osnovnih istraživanja 173016 kao istraživač pripravnik. Godine 2018. unapređen je u zvanje istraživač saradnik na istom projektu. U periodu od 2015. do 2017. godine, kao saradnik u nastavi, učestvovao je u izvođenju teorijske nastave na predmetu Molekularna genetika, obaveznom kursu na trećoj godini studija modula Molekularna biologija i fiziologija Biološkog fakulteta i predmetu Molekulska genetika, obaveznom kursu na trećoj godini studija Biohemije na Hemijskom fakultetu. Bio je član komisije za odbranu dva master rada, a kao autor ili koautor učestvovao je u izradi 6 naučnih radova.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Немања Љ. Вучић

Број индекса М3014/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Немања Љ. Вучић

Број индекса M3014/2014

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији“

Ментор проф. др Горан Брајушковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Повезаност структурних варијанти у хромозому Y и гену NOS3 и тачкастих варијанти у хромозомима 1 и 12 са ризиком за појаву идиопатског стерилитета код мушкараца у Србији“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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 прерада.** 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 прерада.** 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.