

# Genetika i epigenetika kao izvor neplodnosti čovjeka

---

**Novak, Anamaria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:696553>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

Anamaria Novak

Genetika i epigenetika kao izvor neplodnosti čovjeka

Diplomski rad



Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Katušić-Bojanac. Predan je na ocjenu akademske godine 2019/2020.

## Popis kratica

A4GALT	(engl. <i>alpha-1,4-galactosyltransferase</i> )
ADGRG2	(engl. <i>adhesion G protein-coupled receptor G2</i> )
AIS	sindrom neosjetljivosti na androgene (engl. <i>androgen insensitivity syndrome</i> )
AKR1C	(engl. <i>aldo-keto reductase family 1, memcer C</i> )
AMH	antimilerov hormon
AMHR-I/II	antimüllerov hormon receptor tip I/II
ANOS1	anosmin 1
ANXA5	aneksin A5
AR	androgeni receptor
ARX	(engl. <i>aristaless-related homeobox, X-linked</i> )
ATRX	(engl. <i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i> )
AURKC	aurora kinaza C
AZF	azoospermija faktor
BMP	(engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BNC1	(engl. <i>basonuclin 1</i> )
BPA	bisfenol A
BRCA	(engl. <i>breast cancer</i> )
BUB1	(engl. <i>BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase</i> )
CAPN10	(engl. <i>calpain 10</i> )
CATSPER	(engl. <i>cation channel sperm-associated</i> )
CBAVD	kongenitalna bilateralna aplazija vas deferensa
CBAVDX	kongenitalna bilateralna aplazija vas deferensa, X-vezana

CBX	(engl. <i>chromobox</i> )
CDKN2BAS	CDKN2B antisense RNA
CFTR	(engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
CHD	(engl. <i>chromodomain helicase DNA-binding protein</i> )
CHH	kongenitalni hipogonadotropni hipogonadizam
ChIP-Seq	(engl. <i>chromatin immunoprecipitation with massive parallel DNA sequencing</i> )
CITED	(engl. <i>CBP/p300-interacting transactivator with Glu/asp rich carboxy-</i>
CRP	C-reaktivni protein
CYP11A1	(engl. <i>cytochrome p450, family 11, subfamily A, polypeptide 1</i> )
DAX	(engl. <i>DSS-AHC critical region on the X chromosome</i> )
DBY	(engl. <i>DEAD-box helicase 3 Y-linked</i> )
DHH	(engl. <i>desert hedgehog</i> )
DIAPH2	(engl. <i>diaphanous-related formin 2</i> )
DMRT	(engl. <i>doublesex- and MAB3-related transcription factor</i> )
DNMT	DNA metiltransferaza
DPY19L1	(engl. <i>DPY19-like 1</i> )
DSB	(engl. <i>double strand break</i> )
DSD	poremećaji razvoja spola (engl. <i>disorders of sex development</i> )
EMX	(engl. <i>empty spiracles homeobox</i> )
ERCC6	(engl. <i>excision repair cross-complementing, group 6</i> )
ERβ	estrogeni receptor β
F2	koagulacijski faktor 2
F5	koagulacijski faktor 5 (Leiden)
FANCM	(engl. <i>Fanconi anemia-associated polypeptide</i> )
FGF	(engl. <i>fibroblast growth factor</i> )

FGFR	(engl. <i>fibroblast growth factor receptor</i> )
FIGLA	(engl. <i>folliculogenesis specific bHLH transcription factor</i> )
FMR1	(engl. <i>fragile X mental retardation 1</i> )
FN1	fibronectin 1
FOXL	(engl. <i>forkhead box L</i> )
FSH	folikulostimulirajući hormon
FSHB	beta lanac folikulostimulirajućeg hormona
FST	folistatin
FTO	(engl. <i>fat mass- and obesity-associated</i> )
GADD	(engl. <i>growth arrest- and DNA damage-inducible</i> )
GATA	proteini koji prepoznaju GATA motiv unutar promotora
GD	gonadalna disgeneza
GDF	(engl. <i>growth/differentiation factor</i> )
gDMR	diferencijalno metilirana regija zametnih stanica (engl. <i>germline differentially methylated region</i> )
GnRH	(engl. <i>gonadotropin-releasing hormone</i> )
GnRHR	GnRH receptor
GPR54/KISS1R	(engl. <i>G protein-coupled receptor 54/kisspeptin receptor</i> )
GREB1	(engl. <i>growth regulating estrogen receptor binding 1</i> )
GWAS	cjelogenomska analiza povezanosti (engl. <i>genome-wide association study</i> )
H2A	histon 2A
H3K27me3	trimetilirani lizin na 27. poziciji histonskog proteina H3
HAT	histonska acetiltransferaza
hCG	humani korionski gonadotropin
HDAC	histonska deacetilaza

HH	hipogonadotropni hipogonadizam
HNF1B	(engl. <i>hepatic nuclear factor-1 homeobox B</i> )
HOX	homeobox
HS6ST	heparan sulfate 6-O-sulfotransferaza
HSD3B2	3- $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza 2
ID4	(engl. <i>inhibitor of DNA binding 4</i> )
IGF-1/2	inzulinu sličan čimbenik rasta 1 i 2 (engl <i>insulin-like growth factor 1 or 2</i> )
IL1A	interleukin-1 $\alpha$
INS	inzulin
INSR	inzulinski receptor
IRS-1/2	supstrat 1/2 inzulinskog receptora
IVF	<i>in vitro</i> oplodnja (engl. <i>in vitro fertilization</i> )
KDM	lizin-specifična demetilaza
KISS1	kisspeptin
KLHL10	(engl. <i>kelch-like 10</i> )
KS	Kallmannov sindrom
LH	luteinizirajući hormon
LHB	beta lanac luteinizirajućeg hormona
LHX	(engl. <i>lim homeobox</i> )
LIG4 sindrom	ligaza IV sindrom
lncRNA	(engl. <i>long non-coding RNA</i> )
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
MCM	(engl. <i>minichromosome maintenance complex component</i> )
MECP2	(engl. <i>methyl-CpG binding protein 2</i> )

MFM1	(engl. <i>myofibrillar myopathy 1</i> )
miRNA	(engl. <i>micro RNA</i> )
MMP	matriks metaloproteinaza
MSH	(engl. <i>muscle segment homeobox</i> )
MTHFR	metiltetrahidrofolat reduktaza
MXC	metoksiklor
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
nCHH	normosmični oblik kongenitalnog hipogonadotropnog hipogonadizma
NCOR	(engl. <i>nuclear receptor corepressor</i> )
NGS	(engl. <i>next generation sequencing</i> )
NOA	neopstruktivna azoospermija
NOBOX	(engl. <i>newborn ovary homeobox</i> )
NPY	neuropeptid Y
NR5A1	(engl. <i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i> )
NSN	(engl. <i>non-surrounded nucleolus</i> )
NUP107	(engl. <i>nucleoporin, 107-kDa</i> )
OCT-4	(engl. <i>octamer-binding transcription factor 4</i> )
OOMD	defekt maturacije oocite (engl. <i>oocyte maturation defect</i> )
P1 i P2	protamin 1 i 2
PADI6	(engl. <i>peptidylarginine deiminase type VI</i> )
PAIS	sindrom djelomične neosjetljivosti na androgene (engl. <i>partial androgen insensitivity syndrome</i> )
PANX1	paneksin 1
PATL2	(engl. <i>PAT1 homolog 2</i> )
PAX	(engl. <i>paired box gene</i> )



PCB	poliklorirani bifenili
PCOS	sindrom policističnih jajnika (engl. <i>polycystic ovary syndrome</i> )
PDGFA	(engl. <i>platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i> )
PGC	primordijalne zametne stanice (engl. <i>primordial germ cells</i> )
piRNA	(engl. <i>piwi-interacting RNA</i> )
POA	(engl. <i>preoptic area</i> )
POI	primarna ovarijska insuficijencija
POR	cytochrome p450 oxidoreductase
PPARG	(engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> )
PREMBL	preimplantacijski embrionalni letalitet (engl. <i>preimplantation embryonic lethality</i> )
PRY	(engl. <i>PTPBL-related gene on Y</i> )
PSMC3IP	(engl. <i>proteasome 26S subunit ATPase 3-interacting protein</i> )
PTGDS	prostagalndin D2 sintaza
PTM	post-translacijske modifikacije
RA	retinoična kiselina
RBMV	(engl. <i>RNA-binding motif protein, Y chromosome</i> )
REC8SMC1B	(engl. <i>structural maintenance of chromosomes 1B</i> )
RPRGL	(engl. <i>recurrent pregnancy loss, susceptibility to</i> )
RSPO	(engl. <i>R-spondin</i> )
SAC	(engl. <i>spindle assembly checkpoint</i> )
SCMC	(engl. <i>subcortical maternal complex</i> )
SEPT12	septin 12
SF	steroidogeni faktor
SGO	(engl. <i>shugoshin</i> )

SHBG	(engl. <i>sex hormone-binding globulin</i> )
siRNA	(engl. <i>small interfering RNA</i> )
SIX	(engl. <i>six homeobox</i> )
SLC26	(engl. <i>solute carrier family 26</i> )
SN	(engl. <i>surrounded nucleolus</i> )
SOX	(engl. <i>SRY-box</i> )
SPATA16	(engl. <i>spermatogenesis-associated protein 16</i> )
SPGF	(engl. <i>spermatogenic failure</i> )
SRD5A	(engl. <i>steroid 5-alpha-reductase</i> )
SRY	(engl. <i>sex-determining region Y</i> )
STAG3	(engl. <i>stromal antigen 3</i> )
STAR	(engl. <i>steroidogenic acute regulatory protein</i> )
SYCE1	(engl. <i>synaptonemal complex central element protein 1</i> )
SYCP	(engl. <i>synaptonemal complex protein</i> )
TAC	tahikinin
TACR	tahikininski receptor
TAF	(engl. <i>TATA box-binding protein-associated factor</i> ) <i>terminal domain</i> )
TET	(engl. <i>ten-eleven translocation enzyme</i> )
TEX11	(engl. <i>testis-expressed gene 11</i> )
TGFβ	(engl. <i>transforming growth factor beta</i> )
TOP6BLC11ORF80	(engl. <i>topoisomerase VI-B like/chromosome 11 open reading frame 80</i> )
TP1 i TP2	tranzicijski proteini 1 i 2
TUBB	(engl. <i>tubulin beta</i> )
USP9Y	(engl. <i>ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome</i> )

WEE2	(engl. <i>WEE1 homolog 2</i> )
WNT	(engl. <i>wingless-type MMTV integration</i> )
WT	(engl. <i>Wilms tumor 1 transcription factor</i> )
XRCC4	(engl. <i>x-ray repair cross complementing 4</i> )
ZFPM/FOG	(engl. <i>zinc finger protein multitype/friend of GATA</i> )
ZP	zona pellucida glikoprotein

# Sadržaj

Sažetak

Summary

1. Neplodnost	1
2. Genom i genetika	3
2.1. Genetički uzroci gonadalne disgeneze	3
2.2. Genetički uzroci hipogonadotropnog hipogonadizma	11
2.3. Genetički uzroci defektne gametogeneze	17
2.3.1. Genetički uzroci defektne spermatogeneze	17
2.3.2. Genetički uzroci defektne oogeneze	20
2.4. Genetički uzroci malformacija reproduktivnog trakta	25
2.5. Genetički uzroci neuspješne oplodnje i preimplantacijskog embrionalnog aresta	28
2.6. Genetički uzroci smanjene fetalne vijabilnosti	31
2.7. Poligenski uzroci neplodnosti	34
3. Epigenom i epigenetika	37
3.1. Epigenetički mehanizmi	37
3.2. Epigenetička zbivanja tijekom gametogeneze	39
3.2.1. Epigenetička zbivanja tijekom spermatogeneze	39
3.2.2. Epigenetička zbivanja tijekom oogeneze	43
3.2.3. Učinak epigenetičkih mehanizama tijekom gametogeneze na fertilitet	47
3.3. Epigenetička zbivanja tijekom starenja gameta i fertilitet	53
3.4. Promjene epigenoma inducirane egzogenim uzrocima i fertilitet	57
3.4.1.1. Pušenje	58
3.4.1.2. Pretilost	61
3.4.1.3. Struktura prehrane	63
3.4.1.4. Endokrini disruptori	64
4. Zahvale	67
5. Literatura	68
6. Životopis	116

## Sažetak

### Genetika i epigenetika kao izvor neplodnosti čovjeka

Anamaria Novak

Neplodnost je definirana kao nemogućnost postizanja kliničke trudnoće nakon 12 mjeseci redovitih nezaštićenih spolnih odnosa i pogađa oko 10% parova generativne dobi. Brojni su uzroci neplodnosti i smanjene plodnosti, ženski, muški ili kombinirani. Za normalnu funkciju reproduktivnog sustava u oba spola nužan je pravilan embrionalni i fetalni razvoj reproduktivnih tkiva i zametnih spolnih stanica, održavanje njihovog integriteta tijekom djetinjstva i odrasle dobi, te pravilno odvijanje staničnih procesa gametogeneze uz regulativno djelovanje osi hipotalamus-hipofiza-gonada. Svi ovi procesi ovise o prikladnoj ekspresiji gena, koja je uvjetovana kako samom porukom unutar genoma, tako i pridruženim promjenama epigenoma, koje moduliraju fenotipski izražaj bez ikakvog učinka na genotip. Nepravilnosti genoma ili epigenoma unutar somatskih stanica gonada imaju učinak na determinaciju i diferencijaciju spola s posljedičnim nastankom poremećaja razvoja spola (engl. *disorders of sex development*, DSD). Nepravilnosti unutar zametnih spolnih stanica, s druge strane, ispoljavaju se kroz nepravilnosti gametogeneze, maturacije gameta, oplodnje ili ranog embrionalnog razvoja, dovodeći do defektne oplodnje, preimplantacijskog aresta ili prijenosa genetičkih i/ili epigenetičkih modifikacija na potomstvo, s posljedičnim razvojem kongenitalnih bolesti ili predispozicijom ploda za razvoj određenih bolesti u odrasloj dobi. Cilj ovog pregleda je proučiti genetičke i epigenetičke čimbenike u podlozi neplodnosti i smanjene plodnosti, sa svrhom boljeg razumijevanja njihove heterogene etiologije.

Ključne riječi: neplodnost, genetika, epigenetika, reproduktivni sustav, embrionalni razvoj

## Summary

### Genetics and epigenetics as the source of infertility in humans

Anamaria Novak

Infertility is defined as inability of establishing clinical pregnancy after 12 months of regular unprotected intercourse and it affects approximately 10% of couples in their reproductive years. The factors of infertility and reduced fertility are numerous, either female, male or combined. Accurate embryonic and fetal development of reproductive tissues and germ cells, maintenance of their integrity in adulthood, as well as proper cellular steps during gametogenesis regulated by hypothalamic-pituitary-gonadal axis, are all indispensable for the normal function of reproductive system in both sexes. All of these processes are dependent on adequate gene expression, which arises from the interplay of underlying nucleotide sequence and its associated epigenomic pattern that modulates phenotypic expression without any genotypic alteration. Any genomic or epigenomic irregularity of somatic gonadal cells has the potential to disturb sex determination and differentiation with consequential occurrence of disorders of sex development (DSD). On the other hand, irregularities of germ cells lead to defects of gametogenesis, gamete maturation processes, fertilization or early embryonic development with manifestation as fertilization failure, preimplantational arrest or transmission of genetic and/or epigenetic modifications to the offspring with subsequent development of congenital diseases or susceptibility to certain diseases in adulthood. The aim of this review is to evaluate genetic and epigenetic factors underlying infertility and subfertility so as to better appreciate the heterogeneity of their etiology.

Key words: infertility, genetics, epigenetics, reproductive system, embryonic development



## 1. Neplodnost

Neplodnost se definira kao nemogućnost postizanja kliničke trudnoće nakon 12 mjeseci redovitih nezaštićenih spolnih odnosa i relativno je čest problem, koji zahvaća oko 10% parova generativne dobi (1,2). Budući da će veći dio parova, posebice mlađih, trudnoću postići tijekom iduće godine, ispravnije je govoriti o smanjenoj plodnosti. Međutim, drugačija pravila vrijede za parove u kojima je žena starija od 35 godina, kada se evaluacija neplodnosti/smanjene plodnosti započinje već nakon 6 mjeseci pokušavanja ostvarivanja trudnoće. Naime, fekundabilitet, odnosno vjerojatnost začeća u jednom mjesečnom ciklusu, čvrsto je povezan s dobi, tako da započinje opadati već nakon 32. godine, a drastičniji pad doživljava nakon 37. godine života (1). Još jedan pojam valja razlikovati – sterilitet, stanje potpune i trajne neplodnosti (2).

Vrlo gruba podjela etiologije neplodnosti pripisuje 1/3 slučajeva isključivo muškom faktoru, 1/3 isključivo ženskom faktoru, dok u 1/3 slučajeva neplodnosti pridonose oba člana para (1). Osim već spomenutog starenja, koje ima negativne implikacije na reproduktivnu sposobnost oba spola, iako je češće izražene u žena, na smanjenje plodnosti utječe široki dijapazon različitih uzroka. Negativan učinak na plodnost u oba spola imaju bolesti

kao što su hipogonadotropni hipogonadizam, hiperprolaktinemija, cistična fibroza i druge bolesti i stanja koja uključuju poremećaj cilijarne funkcije (npr. Young sindrom, primarna cilijarna diskineza), infekcije (u prvome redu *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*), sistemske bolesti poput dijabetesa, celijakije, deficita vitamina D, autoimunih bolesti i kliničke ili subkliničke hipotireoze. Ovoj skupini faktora moraju se pridodati i čimbenici životnih navika. Tako dijetetska restrikcija i pretjerana iscrpljujuća tjelovježba, pretilost, stres, duhan, marihuana, alkohol i prisutnost endokrinih disruptora imaju štetne posljedice po funkciju reproduktivnog sustava (2).

Faktori koji pridonose isključivo ženskom faktoru neplodnosti su sindrom policističnih jajnika (pogađa 5-10% žena generativne dobi), endometrioza (prevalencija 0.8-6% u žena reproduktivne dobi), primarna ovarijska insuficijencija (prevalencija 1%) i benigne tvorbe kao što su lejomomi maternice i polipi endometrija (2). U slučaju muškog faktora neplodnosti, osim što može biti riječ o pretestikularnim uzrocima (kao što su hipotalamički hipogonadizam i druge endokrinološke i sistemske bolesti, te općem lošem zdravstvenom stanju koje je posljedica niza nezdravih životnih navika) evaluacija neplodnosti mora isključiti i potencijalne



testikularne i post-testikularne uzroke. Prvoj grupi pripadaju Klinefelterov sindrom i mikrodelecije Y kromosoma, ali i stanje po traumi, testikularnoj torziji ili varikokeli, dok drugoj skupini pripadaju opstrukcija epididimisa različitih uzroka, kongenitalna bilateralna aplazija vas deferensa ili opstrukcija ejakulatornih kanala (2,3). Kada je riječ o reproduktivnoj sposobnosti muškarca, zanimljiv je trend smanjenja kvalitete sperme koji se opaža u zadnjih 70-80 godina. Naime, nekoliko je studija (4-6) napravilo usporedbu sjemenih parametara nakon vremenskog razdoblja od nekoliko desetljeća i sve su zamijetile pad njihove kvalitete. Carlsen (4) je objavio sistematični pregled temeljen na analizi 61 studije objavljene u periodu od 1938. do 1990. u kojem je zabilježio drastični pad u koncentraciji spermija (s 113 milijuna/mL na 66 milijuna/mL) i smanjenje volumena ejakulata (s 3.40 mL na 2.75 mL). Dodatne studije provedene kasnije, pokazale su pad i u ukupnom broju spermija te u udjelu progresivno pokretnih i vijabilnih spermija (5).

Za funkcionalni reproduktivni sustav nužni su pravilni razvoj i očuvanje integriteta anatomskih struktura i fizioloških funkcija. Svi ti koraci regulirani su pravovremenom i tkivno- ili stanično-specifičnom ekspresijom gena. Mutacije tih gena mogu rezultirati gubitkom njihove

funkcije i nalaziti se u podlozi različitih bolesti. Nadalje, i sami polimorfizmi unutar gena ili čak intergenskih područja genoma, mogu biti povezani s povećanim rizikom za razvoj određenih stanja koja u sklopu svoje kliničke slike imaju smanjenje plodnosti (7-11) ili učestalije negativne ishode već uspostavljene trudnoće (12,13).

Iako genom jest izvor staničnih procesa, ipak na njega mogu djelovati egzogeni čimbenici okoliša. To se postiže modifikacijom epigenoma, molekularnih obrazaca koji su vezani uz kromatinsku molekulu ili post-transkripcijsku poruku i mijenjaju gensku ekspresiju bez promjene nukleotidne sekvence. I ovakve epigenetske promjene, bilo putem DNA metilacije, modifikacije histona ili posredovanjem nekodirajućih RNA, imaju učinak na pravilno odvijanje razvojnih procesa, kao i procesa gametogeneze u odrasloj dobi i nizom posrednih ili neposrednih učinaka mogu imati negativne implikacije na plodnost (14).

Cilj ovog pregleda je proučiti poznate i potencijalne genetske i epigenetske uzroke neplodnosti i smanjene plodnosti u muškaraca i žena, kako bi se bolje razumjela etiološka heterogenost ovih stanja.

## 2. Genom i genetika

### 2.1. Genetički uzroci gonadalne disgeneze

Reproduktivna sposobnost čovjeka zahtijeva pravilan razvoj njegovog reproduktivnog sustava, od anatomske strukture do fiziološke funkcije, temeljene na hormonalnoj aktivnosti i funkcionalnoj gametogenezi. Niz specifičnosti reproduktivnog sustava karakterizira oba spola, muški i ženski, i njihov jednoznačan razvoj preduvjet je za plodnost. Razvoj spola odvija se u dva koraka, gdje je prvi determinacija ili određivanje spola, a drugi spolna diferencijacija (15,16). Determinacija spola podrazumijeva odluku bipotencijalne, odnosno indiferentne gonade o razvoju u smjeru testisa ili jajnika. Ovaj je korak strogo reguliran pravovremenom ekspresijom niza gena koji potiču razvoj u smjeru jednoga spola, istovremeno kočeći signalne puteve razvoja suprotnog spola (17). Diferencijacija spola je posredovana hormonskom aktivnošću gonade u razvoju i ogleda se u razvoju fenotipskih karakteristika muškog i ženskog spola. Nepravilnosti na bilo kojem koraku razvoja spola dovest će do niza fenotipski različitih poremećaja koji se skupno nazivaju poremećajima razvoja spola (engl. *disorders of sex development*, DSD) (16). Toj skupini pripadaju i različiti tipovi gonadalne disgeneze u kojima su gonade aplastične i

njihovo je tkivo zamijenjeno fibroznim strukturama.

Razvoj gonada u čovjeka započinje proliferacijom stanica celomskog epitela tijekom 3. i 4. tjedna embrionalnog razvoja i njihovim prodiranjem u podležeci mezenhim, čime bilateralno na dorzalnoj površini celomske šupljine nastaju gonadalni grebeni (15). Ove strukture su prekursori gonada i u ovoj se fazi razvoja nalaze u indiferentnome stadiju, s mogućnošću usmjeravanja prema razvoju testisa ili jajnika. Za njihov rani razvoj zadužena je prikladna ekspresija homeobox gena *Emx2* (18) i *Lhx9* (19).

Najraniji korak u razvoju spolnih stanica zajednički je muškom i ženskom embriju, a događa se već u ranom postimplantacijskom razdoblju embriogeneze, riječ je o specifikaciji primordijalnih zametnih stanica (engl. *primordial germ cells*, PGC) (15). Kako se spomenuta specifikacija zbiva još u fazi prije gastrulacije, teško je potvrditi iz koje skupine stanica se rađaju PGC. Dosadašnja istraživanja upućuju na njihov izvor u posteriornom epiblastu, odnosno u ekstraembrionalnom mezodermu nastalom migracijom stanica epiblasta kroz posteriorni kraj primitivne pruge (20). Pokusi na miševima ukazuju da se specifikacija PGC odvija pod utjecajem signalnih molekula secerniranih iz stanica

ekstraembrionalnog ektoderma (BMP-2, BMP-4, BMP-8b) (21,22). Novija istraživanja na *cinomolgus* majmunima postuliraju o mogućem izvoru PGC u dorzalnom amnionu pod utjecajem signala secerniranih iz samog amniona i/ili ekstraembrionalnog mezoderma (23). Nakon specifikacije na E12, pluripotentne PGC nalaze se u stijenci žumanjčane vreće uz bazu alantoisa te započinju svoju migraciju kroz endodermalni epitel, prema dorzalno kroz korijen mezenterija do stražnje trbušne stijenke, zatim prema lateralno do još uvijek bipotencijalnih gonadalnih grebena, u koje se smještaju tijekom 5. tjedna nakon oplodnje (24).

U 46, XY embrija, determinacija spola započinje 42. dan nakon začeća s prolaznom indukcijom ekspresije *Sry* gena s Y kromosoma unutar somatskih stanica gonadalnih prekursora (25,26), dok vidljiva diferencijacija slijedi za nekoliko tjedana, nakon indukcije svih enzima potrebnih za proces steroidogeneze (16). Determinacijom muškog spola prvo dolazi do specifikacije Sertolijevih stanica unutar gonada, što je ujedno i ključni događaj za testikularnu diferencijaciju jer će pod njihovim utjecajem doći do razvoja svih ostalih stanica unutar testisa, uključujući i zametnih stanica. *Sry* gen djeluje poput okidača za usmjeravanje gonade prema diferencijaciji testisa, no zapravo ključne događaje razvoja

muškog spola koordinira njegova najvažnija ciljna molekula SOX9. SOX9 tako koordinira diferencijaciju i održavanje Sertolijevih stanica, kočenje molekularnih mehanizama prema razvoju jajnika, održavanje Wolffovih kanala i regresiju Müllerovih kanala (15,17). Zahvaljujući aktivnosti NR5A1 (poznat i kao SF1), koji veže i aktivira testis-specifični *enhancer of Sox9* (TES), posredovanjem njihovog kompleksa u kombinaciji sa SRY faktorom, potaknuta je ekspresija *Sox9* (27). Nakon pada ekspresije *Sry* od 53. dana nakon začeća (26), *Sox9* ekspresija održava se visokom autoregulacijom i aktivnošću FGF9, PTGDS i DMRT1 (28,29). Regulacija *Sry* ekspresije objašnjena je s četiri modula, pri čemu su tri posredovana transkripcijskim faktorima koji djeluju uzvodno od *Sry*, a četvrti je temeljen na promjenama epigenoma koje omogućuju ili priječe pristup regulatornim regijama *Sry* gena. Prvi modul indukciju *Sry* ekspresije objašnjava GATA4 proteinom, koji svoju funkciju ostvaruje stupajući u interakciju s ZFPM2 (poznat i kao FOG2) (30). Za samu aktivnost GATA4 potrebna je fosforilacija p38 proteina koji se u signalnom putu nalazi odmah nizvodno od kinaze MAP3K4, čiju aktivnost potiče GADD45 $\gamma$  (31). Modul 2 sačinjavaju TF čija je aktivnost usmjerena na regulaciju NR5A1 (SF1) koji se direktno veže na *Sry* promotor. Čak 20% slučajeva 46, XY gonadalne disgeneze uzrokovano je

mutacijama ovoga gena (Tablica 1). Ovom modulu pripada i aktivnost ostalih TF kao što su: TF CBX2, CITED2, SIX1, SIX4 i LHX9 (32). Temelj modula 3 čini najvažniji regulator *Sry* ekspresije, WT1, koji uz *Sry*, regulira i ekspresiju *Nr5a1*, *Dax1*, *Amh* (33). Modul 4 nešto je drugačiji i objašnjava regulaciju *Sry* preko metilacije njegove regulatorne regije i prisutnih histonskih PTM-a. Naime, u mišjih je embrija *Sry* promotor u vrijeme indukcije hipometiliran, dok sa padom njegove ekspresije postaje ponovno hipermetiliran (34). Dodatni epigenetski mehanizam regulacije je i aktivnost demetilaze H3K9, markera transkripcijski inaktivnog kromatina, poznate kao KDM3A (35).

U kliničkoj medicini je 46, XY gonadalna disgeneza poznata pod eponimom Swyerov sindrom, pri čemu istu kliničku sliku (fibrozni gonadalni tračci, ženski unutarnji spolni organi nastali iz Müllerovih struktura i potpuno feminizirano vanjsko spolovilo uz izostanak puberteta i razvoja sekundarnih spolnih karakteristika) generiraju mutacije nekoliko različitih gena. Otprilike 10-20% slučajeva ima etiologiju u mutacijama *Sry* gena (36). Osim kompletne, moguća je i parcijalna gonadalna disgeneza pri čemu vanjski i unutarnji spolni organi pokazuju različiti stupanj feminizacije ili virilizacije. Tablica 1 prikazuje izdvojene mutacije koje su u 46, XY embrija povezane s gonadalnom disgenezom (engl. *gonadal dysgenesis*, GD).

Tablica 1. Izdvojene mutacije povezane s GD u 46, XY ploda (prema: Baetensu i Verdinu (16))

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	<i>Knockout</i> model (miš)	Fenotip u čovjeka	Referenca
<i>Arx</i>	Xp22.13	X-vezano	Izostanak diferencijacije Leydigovih stanica, poremećena migracija neurona	GD + lizencefalija, epilepsija, intelektualne poteškoće, temperaturna nestabilnost	Kitamura i sur. (37)

<i>Atrx</i>	Xq13.3	X-vezano	Hipoplastični testisi, diskontinuirani sjemeni kanalići, odgođen početak spermatogeneze	GD + odsutnost Müllerovih struktura + disporfija lica, intelektualne poteškoće, $\alpha$ -talasemija	Reardon i sur. (38) Pask i sur. (39)
<i>Cbx2</i>	17q25	AR	Muško-ženska promjena spola	46, XY kompletna GD (Swyerov sindrom)	Biason-Lauber i sur. (40)
<i>Dhh</i>	12q13.1	AR	Poremećen razvoj testikularnih tračaka zbog nepravilnog razvoja peritubularnog tkiva	Kompletna (Swyerov sindrom) ili parcijalna GD + minifascikularna neuropatija	Umehara i sur. (41) Canto i sur. (42)
<i>Dmrt1</i>	9p24.3	AD	Gubitak Sertolijevih i zametnih stanica, nepravilan razvoj testisa	GD (Swyerov sindrom) + dismorfija lica, mikrocefalija	Raymond i sur. (43) Matson i sur. (29)
<i>Gata4</i>	8p23.1-p22	AD	Smrt embrija zbog srčanih malformacija; $Gata4^{ki/ki}$ : izostanak razvoja testikularnih tračaka	GD + dvospolno vanjsko spolovilo + kongenitalne srčane greške (ASD, VSD, TOF), dijafragmalna hernija	Lourenco i sur. (44)

<i>Zfp2</i>	8q22.3	AD	Izostanak razvoja testikularnih tračaka	GD + dvosmisleno vanjsko spolovilo + kongenitalne srčane greške (ASD, VSD, TOF), dijafragmalna hernija	Bashamboo i sur. (45)
<i>Nr5a1</i>	9q33	AD	Ageneza gonada i nadbubrežnih žlijezda; Heterozigot – hipoplastične gonade, oslabljen odgovor nadbubrežnih žlijezda na stres	46, XY GD (Swyerov sindrom) + hipospadija, mikropenis, kriptorhizam + primarna adrenalna insuficijencija	Achermann i sur. (46) Lin i sur. (47) Kohler i sur. (48)
<i>Sox8</i>	16p13.3	AD	<i>Sox8</i> <sup>-/-</sup> : smanjena plodnost <i>Sox8</i> <sup>-/-</sup> , <i>Sox9</i> <sup>-/-</sup> : različit stupanj muško-ženske promjene spola	GD (nije potvrđeno) + muška neplodnost, primarna ovarijska insuficijencija	Portnoi i sur. (49)
<i>Sox9</i>	17q24-q25	AD	Muško ženska promjena spola	GD + kampomelična displazija, Cooksov sindrom, Pierre Robinova sekvenca	Barrionuevo i sur. (50) Wagner i sur. (51)

<i>Sry</i>	Yp11.3	Y-vezano	Muško-ženska promjena spola	Komplena GD (Swyerov sindrom)	McElreavey i sur. (52) Harley i sur. (53)
<i>Wt1</i>	11p13	AD	Apoptoza stanica gonada i nadbubrežnih žlijezda <i>Wt1+KTS<sup>-/-</sup></i> : potpuna muško-ženska promjena spola, bubrežna insuficijencija <i>Wt1-KTS<sup>-/-</sup></i> : hipoplastični i displastični bubrezi, gonadalni tračci	GD u sklopu WAGR sindroma, Denys-Drash sindroma ili Frasier sindroma	Lee i sur. (54) Finken i sur. (55)

Dvije teorije objašnjavaju determinaciju ženskog spola unutar somatskih stanica indiferentnih gonadalnih prekursora. Prva teorija zagovara bazičnu programiranost fetalnih gonada za razvoj u smjeru jajnika, što je u muških embrija zaustavljeno zahvaljujući prisutnosti *Sry* gena na Y kromosomu. Prema drugoj teoriji, u somatskim stanicama budućeg jajnika prisutan je tzv. Z-faktor, koji determinira ženski spol i usporedno koči molekularne mehanizme neophodne za razvoj testisa. Z-faktor za sada je hipotetski produkt gena, međutim, njegova prisutnost mogla bi

objasniti slučajeve razvoja testisa u 46, XX embrija (17).

Iako determinacija i diferencijacija ženskog spola nisu razjašnjene onoliko dobro koliko je to slučaj za muški spol, ipak su poznati određeni geni i njihovi produkti koji su u taj proces uključeni. Jedan od gena koji se eksprimira najranije u tijeku razvoja jajnika je *Foxl2*, za kojeg je na mišjim modelima pokazano da sudjeluje i u postnatalnom održavanju jajnika, suprimirajući ekspresiju gena koji sudjeluju u testikularnoj diferencijaciji (17,56). I dvije komponente Wnt signalnog puta imaju

važnu ulogu u razvoju jajnika, to su *Wnt4* i *Rspo1*. Oni aktiviraju  $\beta$ -katenin koji se translocira u jezgru gdje regulira transkripciju gena uključenih u daljnji razvoj jajnika, poput samog *Wnt4* i *Fst* (57). Ekspresija aktivne forme  $\beta$ -katenina unutar XY gonade dostatna je za muško-žensku promjenu spola tog embrija (58).

Disgeneza jajnika javlja se kao posljedica aneuploidije spolnih kromosoma u Turnerovom sindromu (45,X0 ili 46,XX/45,X0) ili uslijed mutacija gena odgovornih za razvoj jajnika kod žena s normalnim kariotipom 46,XX (1,59). Tablica 2 prikazuje izdvojene gene čije su mutacije povezane s disgenezom jajnika u 46,XX embrija.

Tablica 2. Izdvojene mutacije povezane s GD u 46,XX ploda (prema: Baetensu i Verdinu (16))

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	<i>Knockout</i> model	Fenotip u čovjeka	Referenca
<i>Brca2</i>	13q13.1	nepoznato	<i>Drosophila</i> : nerazvijeni jajnici nepravilne strukture	Kompletna GD + mikrocefalija, akutna mijeloična leukemija, café-au-lait mrlje	Weinberg- Shukron i sur. (60)
<i>Fshr</i>	2p16.3	AR	Miš: poremećen estros ciklus, atrofični jajnici, ovulatorni defekti, uterus oblika tračka	GD + POI	Aittomaki i sur. (61) Kuechler i sur. (62)
<i>Foxl2</i>	3q22.3	AD	Miš: postnatalni KO uzrokuje transdiferencijaciju somatskih stanica jajnika u testikularne (Sertolijeve i Leydigove) stanice	Do sada nije identificiran slučaj GD u čovjeka, ali su promjene gena povezane s fenotipom POI	Pailhoux i sur. (63)



			Koza: žensko-muška promjena spola (63)		
<i>Wnt4</i>	1p36.12	AD/AR	Miš: XX gonade pokazuju testikularnu vaskularizaciju i steroidogenezu, reduciran broj oocita	aplazija Müllerovih struktura, hiperandrogenizam + SERKAL sindrom (engl. <i>46,XX sex reversal with dysgenesis of kidney, adrenal and lungs</i> )	Mandel i sur. (64)
<i>Rspo1</i>	1p34.3	AR	Miš: XX gonade pokazuju testikularnu vaskularizaciju i steroidogenezu	XX testikularno tkivo	Parma i sur. (65) Tallapaka i sur. (66)
<i>Nr5a1</i>	9q33	AD	Miš: ageneza gonada i nadbubrežnih žlijezda; Heterozigot – hipoplastične gonade, oslabljen odgovor nadbubrežnih žlijezda na stres	XX testikularno tkivo ili XX ovotestisi + POI	Bashamboo i sur. (67) Baetens i sur. (68) Igarashi i sur. (69) Swartz i sur. (70)
<i>Wt1</i>	11p13	AD	Miš: izostaje razvoj bipotencijalnih gonada	GD + klitoromegalija, aplastična ili slijepo	Gomes i sur. (71) Viot-Szoboszlai i sur. (72)

				završavajuća rodnica	
--	--	--	--	-------------------------	--

Istraživanja na životinjskim i *in vitro* modelima ukazuju kako brojni geni koji vode razvoj spola, sudjeluju i u njegovom održavanju u postnatalnom životu te od početaka svoje ekspresije pa i tijekom života, konstantno aktivno suprimiraju gene odgovorne za razvoj suprotnog spola. U jajnicima je za represiju testikularne diferencijacije odgovoran *Foxl2*, čiji proteinski produkt inhibira *Sox9 enhancer* TES (73) i antagonizirajući *Wt1-KTS* koči aktivnost *NR5A1* (74), ostvarujući tako dvojaku represiju *Sox9* ekspresije. Nadalje, delecija *Foxl2* u granulosa stanicama jajnika odrasle ženke miša dovodi do razvoja testikularnih obilježja unutar jajnika, uključujući i transdiferencijaciju granulosa stanica u Sertolijeve i teka stanica u Leydigove (73). Istraživanja upućuju kako su u zrelih XY gonadama za inhibiranje razvoja ženskog gonadalnog spola odgovorni *Fgf9* (75), *Dmrt1* i *Sox9* (29). Oni inhibiraju ekspresiju *Foxl2* i održavaju ekspresiju gena koji sudjeluju u diferencijaciji muške gonade. *Knockout* mišji modeli gena *Dmrt1* pokazuju transdiferencijaciju somatskih stanica testisa u stanice nalik na granulosa stanice te paralelno s time indukciju ekspresije *Foxl2* u tim stanicama. DMRT1 faktor k tome

sudjeluje i u supresiji aktivnosti retinoične kiseline (RA) u testisima čime se regulira ulazak zamatnih stanica u mejozu (76).

## 2.2. Genetički uzroci hipogonadotropnog hipogonadizma

Endokrina i reproduktivna funkcija spolnih žlijezda regulirane su aktivnošću osi hipotalamus-hipofiza-gonada, pri čemu se hormonalna homeostaza, i u žena pravilna fluktuacija hormona tijekom menstrualnog ciklusa, ostvaruje pomoću negativne povratne sprege kojom steroidni hormoni gonada djeluju na centralno izlučivanje polipeptidnih hormona (1). Os je aktivna još od intrauterinog života, ali ju tada, kao i u ranom postnatalnom životu, karakterizira funkcionalna nezrelost. Tijekom djetinjstva os je inaktivna, da bi se ponovno aktivirala s nastupom puberteta, ubrzo potom sazrijela i održala se funkcionalnom tijekom ostatka života (15).

Neuroni koji secerniraju GnRH nastaju iz medijalne olfaktorne plakode i migriraju u područje fetalnog hipotalamusa sa otprilike 40 gestacijskih dana (77). Adenohipofiza započinje produkciju gonadotropina FSH i LH sa 9 tjedana gestacije (78) i moguće ih je detektirati u

krvi fetusa sa 12 do 14 tjedana (79). U ovoj fazi razvoja, pa sve do 30. tjedna gestacije, sekrecija gonadotropina neovisna je o GnRH (80). Koncentracija FSH i LH u krvi fetusa maksimum dostiže sredinom gestacije, što se podudara s vremenom maksimalne serumske koncentracije testosterona (81). Tijekom druge polovice gestacije koncentracije gonadotropina progresivno opadaju zbog negativne povratne sprege potaknute visokim koncentracijama placentalnih spolnih hormona. Tijekom fetalnog razvoja koncentracije gonadotropina niže su u krvi muških fetusa (82) zbog viših koncentracija testosterona uslijed testikularne steroidogeneze, a i dominirajući gonadotropin razlikuje se između spolova. U muških fetusa prevladava LH, dok u ženskih FSH (81). Iako nezrela, aktivnost osi tijekom intrauterinog života ima fiziološku važnost za normalan razvoj oba spola. Naime, Baker i Scrimgeour (83) pokazali su da u anencefaličnih fetusa, u kojih izstaje funkcionalnost osi, testisi pokazuju značajnu redukciju broja gonocita i Leydigovih stanica. Nasuprot tome, isto istraživanje pokazuje da razvoj jajnika anencefaličnih ženskih fetusa napreduje normalno do 34. tjedna gestacije, pri čemu se oogonije dijele i diferenciraju u primarne oocite koje ulaze u mejozu i zaustavljaju se u diplotenu stadiju profaze I, okružene jednim slojem pločastih stanica, formirajući

primordijalne folikule. Međutim, za razliku od kontrolne zdrave skupine, jajnici ovih fetusa ne sadržavaju male antralne folikule, što govori o nemogućnosti napredovanja folikulogeneze, a time i maturacije oocite.

Nakon rođenja dolazi do izlučivanja placentalnih hormona iz tijala fetusa, čime se os hipotalamus-hipofiza-gonada oslobađa negativne povratne sprege i nastupa niz promjena u lučenju različitih hormona s obrascem specifičnim za svaki spol. Ovo razdoblje hormonskih promjena tijekom prvih nekoliko mjeseci života naziva se minipubertet (84). On je u dječaka obilježen dominacijom LH koji vršnu koncentraciju postiže u prvih 10 tjedana života, nakon čega opada i održava se na niskim prepubertalnim vrijednostima od 6. mjeseca života (85). Zbog ovakvog kretanja LH, tijekom prva tri mjeseca života broj Leydigovih stanica raste, testosteron postiže vršnu koncentraciju za minipubertet, a nezrele Sertollijeve stanice secerniraju AMH i inhibin B, te dolazi do blagog povećanja volumena testisa, rasta penisa i ponekad se može primijetiti pojava pubične dlakavosti i skrotalne hiperpigmentacije (84,86). Upravo u ovom periodu dolazi do diferencijacije testikularnih zametnih stanica u spermatogonije tipa A (87). U djevojčica je važnosti minipuberteta nešto nejasnija. Karakterizira ga dominacija FSH koji vršne koncentracije postiže između 1.

tjedna i 3. mjeseca i, za razliku od LH, ostaje visok do 3. ili 4. godine života. Njegov porast praćen je aktivacijom granulosa stanica, produkcijom AMH (koji se ipak održava na niskim vrijednostima tijekom cijelog djetinjstva kod djevojčica) i estrogena (čija koncentracija fluktuiraju, ali se održava visokom tijekom prvih 6 mjeseci) (88,89).

Početak puberteta dolazi do aktivacije pulsatilne sekrecije GnRH iz neurona *nucleus arcuatus* hipotalamusa, čime se postiže kontinuirano satno izlučivanje GnRH i gonadotropina, i neurona POA, koji imaju mjesečni ritam sekrecije GnRH i zaduženi su sa skok u izlučivanju LH kojim se potiče ovulacija. Za uspostavljanje zrele i funkcionalne osi tijekom puberteta neophodna je ekspresija *KISS1* gena na kojem konvergiraju različite endokrine i metaboličke poruke kojima se regulira sekrecija GnRH. Ona je potaknuta vezanjem kisspeptina za GPR54/KISS1R receptor na GnRH neuronima, a mutacije gena koji kodira taj receptor jedna su od etiologija hipotalamičkog hipogonadizma (90,91).

Hipogonadotropni hipogonadizam klinički se manifestira zakašnjelim pubertetom, jednako kao i konstitucijski zakašnjeli pubertet i hipergonadotropni hipogonadizam. Centralni hipogonadotropni hipogonadizam (HH)

može biti funkcionalan, u slučaju kroničnih bolesti, nutritivskih i stresnih čimbenika, i trajan. Trajni HH nadalje se može podijeliti u kongenitalni i stečeni (92). U kontekstu ovog pregleda zanimljiv je kongenitalni hipogonadotropni hipogonadizam (CHH) uzrokovan mutacijama gena koji kodiraju za produkte važne u funkcioniranju osi hipotalamus-hipofiza-gonada. Poznato je više od 30 različitih gena čije mutacije uzrokuju CHH, a neka od njih pronalazi se u približno 50% pacijenata s CHH (93,94). U slučaju da mutacije zahvaćaju gene važne za razvoj GnRH neurona, razvija se Kallmannov sindrom (KS), karakteriziran anosmijom, senzorneuralnim gubitkom sluha, rascjepom usne/nepca, bubrežnim anomalijama i sinkinezijom uz CHH. U slučaju da mutacije zahvaćaju gene uključene u GnRH sekreciju i funkciju, razvija se normosmični oblik, nCHH, koji se često naziva i normosmičnim idiopatskim HH (nIHH) (92,95). Tablica 3 prikazuje izdvojene gene čije su mutacije povezane s CHH, ali i neke od gena koji su povezani s konstitucionalno zakašnjelim pubertetom. Naime, uz tradicionalnu gensku analizu sekvenciranjem po Sangeru, uz ovaj potonji oblik zakašnjelog puberteta rijetko su se pronalazile mutacije gena među srodnicima. Međutim, novijom aplikacijom NGS tehnologije otkrivene su mutacije povezane i s tim fenotipom (92,93).

Tablica 3. Izdvojene mutacije s fenotipom zakašnjelog puberteta (prema:OMIM)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Produkt	Fenotip	Komentar
<i>GNRHR</i>	4q13.2	AR	<i>Gonadotropin-releasing hormone receptor</i>	nCHH Kottler i sur. (96) Costa i sur. (97)	Mutacije ovog gena odgovorne su za 40-50% nCHH
<i>KISS1R</i>	19p13.3	AR	KISS1 receptor/GPR 54 ( <i>G protein-coupled receptor 54</i> )	nCHH Seminaro i sur. (98) KS Miraoui i sur. (99)	
<i>TACR3</i>	4q24	AR	Tahikinin receptor 3 (neurokinin B receptor)	nCHH, KS Topaloglu i sur. (100)	
<i>TAC3</i>	12q13.3	AR	Tahikinin 3 (neurokinin B)	nCHH, KS Gianetti i sur. (101)	Vrlo rijetko
<i>GNRHI</i>	8p21.2	AR	<i>Gonadotropin-releasing hormone 1</i>	nCHH, KS Chan i sur. (102)	Vrlo rijetko
<i>KISS1</i>	1q32.1	AR	<i>Kiss1 metastasis suppressor (kisspeptin)</i>	nCHH, KS Topaloglu i sur. (103)	Vrlo rijetko
<i>LHB</i>	19q13.33	AR	$\beta$ lanac LH	nCHH Valdes-socin i sur. (104)	Izuzetno rijetko
<i>FSHB</i>	11p14.1	AR	B lanac FSH	nCHH -u žena primarna amenoreja i	Izuzetno rijetko

				<p>izostanak telarhe, povišen LH, nemjerljiv FSH, Layman i sur. (105)</p> <p>-u muškaraca odgođen ili normalan pubertet, nizak testosteron i zastoj spermatogeneze uz azoospermiju, Linstedt i sur. (106)</p>	
<i>ANOS1</i>	Xp22.31	X-vezano recesivno	Anosmin 1	KS Hardelin i sur. (107)	Mutacije ili intragenske mikrodelecije gena odgovorne za 10-20% KS. Penetrantnost je kompletna za anosmiju i CHH.
<i>FGFR1</i>	8p11.23	AD	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	KS, nCHH, Hartsfield sindrom, Jackson-Weiss sindroma, Pfeiffer sindrom i dr.	Nepotpuna penetrantnost i varijabilna ekspresivnost ovih mutacija.

				Dode i sur. (108) Pitteloud i sur. (109)	
<i>CHD7</i>	8q12.2	AD	<i>Chromodomain helicase DNA-binding protein 7</i>	KS, nCHH, CHARGE sindrom Kim i sur. (110)	Varijabilna ekspresivnost
<i>HS6ST1</i>	2q14.3	AD	<i>Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1</i>	nCHH, KS, konstitucijski zakašnjeli pubertet Tornberg i sur. (111)	
<i>FTO</i>	16q12.2	AR	<i>Fat mass- and obesity-associated gene</i>	Pretilost, usporen rast i razvoj, dismorfija lica (Konstitucijski zakašnjeli pubertet, Howard i sur. (112))	
<i>LIN28B</i>	6q16-q21		Homolog <i>C.elegans Lin28</i> gena, B (učinak postiže vezanjem miRNA <i>let-7</i> )	SNP povezani s dobi menarhe (113), rastom, indeksom tjelesne mase (114) i nastupom puberteta (115)	

## 2.3. Genetički uzroci defektne gametogeneze

### 2.3.1. Genetički uzroci defektne spermatogeneze

Poremećaji spermatogeneze klinički se očituju potpunom ili djelomičnom redukcijom normalnih spermija u ejakulatu, odnosno azospermijom (nepostojanjem spermija u ejakulatu), oligozoospermijom (koncentracijom spermija manjom od 15 milijuna po mL ejakulata), teratozoospermijom (abnormalnom morfologijom spermija u ejakulatu), astenozoospermijom (smanjenom pokretljivošću spermija) ili kombinacijom ovih stanja. Pri tome defekti koji zahvaćaju isključivo spermiogenezu rezultiraju uglavnom normalnim brojem, ali abnormalnih spermija. Poremećaji spermatogeneze mogu biti kongenitalni i stečeni (116). U kontekstu ovog pregleda zanimljivi su kongenitalni uzroci defektne spermatogeneze koji mogu biti uzrokovani numeričkim i strukturalnim kromosomskim aberacijama, mikrodelecijama Y kromosoma ili mutacijama pojedinih gena. Pronađene su i mutacije koje nisu povezane s poremećenim sjemenim parametrima, a imaju veću učestalost u neplodnih muškaraca (3).

Kromosomske aberacije imaju učestalost 0.7–1 % u populaciji

normozoospermnih muškaraca, 4% u populaciji muškaraca s teškom oligozoospermijom (koncentracija spermija <5 milijuna po mL ejakulata) i 15% s neopstruktivnom azospermijom (NOA) (117). One mogu biti numeričke i strukturalne. Numeričke kromosomske aberacije češće u muškaraca s azospermijom, a jedna takva, ujedno i najčešća kromosomska aberacija u neplodnih muškaraca s NOA, je Klinefelterov sindrom (47,XXY ili 46,XY/47,XXY) (118). U suprotnosti s time, u muškaraca s oligozoospermijom češće su strukturalne kromosomske aberacije autosoma ili gonosoma. Najčešće je riječ o recipročnim ili Robertsonovim translokacijama, inverzijama, delecijama i stvaranju izokromosoma (3). Primjer je De La Chapelle sindrom, poznat i kao 46,XX muški sindrom, nastao zbog translokacije kratkog kraka Y kromosoma, sa *Sry* genom, na terminalnu regiju kratkog kraka X kromosoma ili nekog autosoma. U ovih osoba se usprkos XX setu spolnih kromosoma, a upravo zbog djelovanja produkta *Sry* gena, spol determinira kao muški i dolazi do razvoja testikularnog tkiva, unutrašnjih i vanjskih muških spolnih organa. Sindrom se otkriva u adolescenciji zbog hipogonadizma ili kasnije zbog neplodnosti (seminiferni tubuli ovih testisa su hijalinizirani i obloženi isključivo



Sertolijevim stanicama, dok zametne stanice nedostaju) (119).

Drugi česti genetski uzrok muške neplodnosti su mikrodelecije dugog kraka Y kromosoma. Njihova je učestalost 3–15% u muškaraca s NOA, 6–8% s teškom oligozoospermijom i oko 0.025% u općoj populaciji (3,120). Yq mikrodelecije zahvaćaju tri regije azoospermija faktora (AZF): AZFa, AZFb, AZFc. Mikrodelecija najčešće zahvaća regiju AZFc i uzrokuje heterogene fenotipske karakteristike, od azoospermije do oligozoospermije. Posljednja klinička manifestacija omogućuje prijenos AZFc mikrodelecije na muške potomke i smanjenu plodnost ili neplodnost u idućoj generaciji. Upravo je kompletna delecija AZFc regije najčešći poznati genetski uzrok muške neplodnosti. Delecije koje zahvaćaju cijelu AZFa ili AZFb regiju kao posljedicu imaju potpuni nedostatak zrelih spermatozoa kod biopsije testisa. Kompletnom delecijom AZFa regije

gube se *Dby* i *Usp9y* geni, što rezultira potpunim gubitkom zametnih stanica i tzv. *Sertoli-only* sindromom (121). Kompletnom delecijom AZFb regije gube se *Rbmy1* i *Pry* genski klasteri, dovodeći do mejotičkog aresta u stadiju primarne spermatocite, iako su drugačiji fenotipovi također mogući (122).

Identificirani su i brojni geni na autosomima (123,124) i neki na X kromosomu (125,126) koji sudjeluju u spermatogenezi, a njihovim mutacijama dolazi do poremećaja na različitim etapama tog procesa. Tablica 4 navodi autosomne gene povezane s neuspješnom spermatogenezom (engl. *spermatogenic failure, SPGF*), iz nje se vidi genetička heterogenost SPGF-a. U tablici je izdvojeno 13 mutacija povezanih sa SPGF, međutim, identificirane su 43 različite mutacije autosoma koje dovode do defekata spermatogeneze.

Tablica 4. Geni na autosomima povezani sa SPGF (prema: OMIM)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Fenotip	Referenca
<i>SYCP2</i>	20q13	AR	SPGF1 – spermatocitni zastoj (arest) tijekom mejoze, akumulacija i degeneracija spermatocita u tubulima	Schilit i sur. (127)
	Kromosom 1, inverzije	AD	SPGF2 – arest na razini primarne spermatocite, azoospermija ili teška oligozoospermija	Bache i sur. (128)

<i>SLC26A8</i>	6p21.31	AD	SPGF3 – astenozoospermija	Dirami i sur. (129)
<i>SYCP3</i>	12q23.2	AD	SPGF4 – azoospermija ili oligozoospermija U žena: rekurentni pobačaji (130)	Miyamoto i sur. (131)
<i>AURKC</i>	19q13.43	AR	SPGF5 – makroglobularni, multiflagelarni, poliploidni spermatozoi	Dieterich i sur. (132)
<i>SPATA16</i>	3q26.31	AR	SPGF6 – globozoospermija	Dam i sur. (133)
<i>CATSPER1</i>	11q13.1	AR	SPGF7 – oligoteratoastenozoospermija	Avenarius i sur. (134)
<i>NR5A1</i>	9q33.3	AD	SPGF8 – astenozoospermija Ostalo: 46,XX promjena spola (67) 46,XY promjena spola (47) Adrenokortikalna insuficijencija POF7 (135)	Bashamboo i sur. (124)
<i>DPY19L2</i>	12q14.2	AR	SPGF9 – totalna globozoospermija	Kilani i sur. (136)
<i>SEPT12</i>	16p13.3	AD	SPGF10 – defektni anulus (prstenasta struktura na granici glavnog i srednjeg dijela repa spermija), mehanička potpora mitohondrija → teratozoospermija	Lin i sur. (137)
<i>KLHL10</i>	17q21.2	AD	SPGF11 – oligoteratoastenozoospermija	Yatsenko i sur. (138)
<i>NANOS1</i>	10q26.11	AD	SPGF12 – azoospermija ili teška oligoteratoastenozoospermija	Kusz-Zamelczyk i sur. (139)

<i>TAF4B</i>	18q11.2	AR	SPGF13 – azoospermija ili oligozoospermija	Ayhan i sur. (140)
<i>ZMYND15</i>	3p21.31	AR	Primarna cilijarna diskinezija, izolirana azoospermija	Ayhan i sur. (140)
<i>FANCA</i>	16q24.3	AR	Fanconijeva anemija, <i>Sertoli-only</i> sindrom i azoospermija	Krausz i sur. (141)
<i>DMRT1</i>	9p24.3	AD	<i>Sertoli-only</i> sindrom i azoospermija	Tewes i sur. (142)
<i>DMC1</i>	22q13.1	AR	Azoospermija i zastoj na razini primarnih spermatocita (U žena primarna ovarijska insuficijencija u ranoj dobi)	He i sur. (143)
<i>PLK1</i>	16p12.2	AD	<i>Sertoli cell -only</i> sindrom i azoospermija	Miyamoto i sur. (144)

Mutacija gena *TEX11* (Xq13.1), nasljeđuje se X-vezano recesivno i rezultira mejotičkim defektom i degeneracijom primarnih spermatocita tijekom prve mejotičke diobe. Delecija *TEX11* gena u spermatocitima ometa pravilnu sinapsu homolognih kromosoma tijekom mejoze. U slučaju izostanka sinapse između autosoma, apoptoza nastupa tijekom pahitena prve mejotičke diobe, dok u slučaju izostanka sinapse između gonosoma dioba napreduje, ali ipak ne dalje od prve mejotičke diobe (125,145).

### 2.3.2. Genetički uzroci defektne oogeneze

Za razliku od spermatogeneze koja se započinje tijekom puberteta, oogeneza

započinje još tijekom intrauterinog života. Diferencijacijom oogonija u primarne oocite, pod utjecajem retinoične kiseline (146) inducira se njihov ulazak u mejozu I, u kojoj se zadržavaju do puberteta. Pravilno odvijanje mejoze, maturacija oocite i folikulogeneza koordinirani su nizom gena, čije su mutacije povezane s apoptozom oocite i atrezijom folikula (59). Klinički se to manifestira smanjenom ovarijskom rezervom ili primarnom ovarijskom insuficijencijom (POI). Genetička podloga bolje je istražena za slučajeve POI, ali se pretpostavlja da isti geni, ali njihove manje penetrantne mutacije igraju ulogu u nastanku smanjene ovarijske rezerve. Broj folikula najveći je za vrijeme fetalnog života i od tada nadalje progresivno opada,

iznoseći oko 1-2 milijuna pri rođenju, oko 400 000 pred početak puberteta i svega 400 oocita ovulira za vrijeme reproduktivnog razdoblja života (147). Pražnjenjem ovarijske rezerve u starijoj dobi, u prosjeku sa 50 godina, nastupa menopauza. U žena s POI ovarijska rezerva isprazni se prije 40. godine života, što može biti posljedica malog folikularnog bazena pri rođenju ili ubrzane apoptoze oocita tijekom života (59).

Pravilna mejoza ovisna je o pravilnoj segregaciji kromosoma i pravilnom popravku dvolančanih lomova DNA (engl. *double-strand breaks*, DSB). Tijekom profaze I, u zigotenu, stvara se sinapsa između homolognih kromosoma, interakcijom njihovih centromera, i omogućava se rekombinacija koordinirana SPO11 proteinom koji je zadužen za stvaranje programiranih DSB DNA. Nakon rekombinacije slijedi pravilno pozicioniranje na ekvatoru stanice djelovanjem diobenog vretena i potom segregacija kromosoma (148). Zbog svojeg mejotičkog aresta oocita je podložna greškama u segregaciji kromosoma što postaje sve naglašenije sa starenjem oocita. Kao posljedica toga sa starenjem se povećava učestalost aneuploidnih jajnih stanica i embrija (149). Pretpostavlja se da u mejotičkim greškama povezanim sa starenjem sudjeluje gubitak kohezina i kohezinu sličnih proteina poput SGO2

(150). Nadalje, u plodova s mozaičnim tipom aneuploidija pronađene su varijacije gena *BUB1B* koji kodira za serin/treonin kinazu B koja djeluje na mitotičkom *checkpointu* i omogućuje daljnje napredovanje mitoze u anafazu tek kada su svi kromosomi pravilno spojeni na diobeno vreteno. Uz ove gene u pravilnu kromosomsku segregaciju uključeni su i *SYCP3*, *STAG3*, *HFM1*, *SYCE1*, *NUP107*, *PSMC3IP*, *REC8*, *SMC1B* (59).

Enzimi odgovorni za popravak DNA izuzetno su heterogena skupina čije mutacije uzrokuju široki dijapazon različitih fenotipova. Za ta stanja je karakteristična tendencija lomova kromosoma i genomska nestabilnost, zbog čega zahvaćene stanice odumiru apoptozom. Mutacije gena koji sudjeluju u popravku DNA u podlozi su mnogih sindroma (Fanconi anemija, Werner sindrom, LIG4 sindrom, Bloomov sindrom, ataksia teleangiektazija, xeroderma pigmentosum i neki drugi) koji se posljedično prezentiraju zastojem rasta, imunim deficijencijama, kožnim lezijama, razvojnim poremećajima živčanog sustava, predispozicijom za razvoj malignih tumora i gonadalnom deficijencijom. Moguće su i mutacije koje se manifestiraju nesindromskom primarnom insuficijencijom jajnika, poput onih u genima *MCM8*, *MCM9*, *XRCC4* i *MSH5* (151–153). Proteini *MCM8* i *MCM9*

dijelovi su kompleksa koji se regrutira na mjesta oštećenja DNA i sudjeluje u popravku DSB. Homozigotne mutacije gena *MCM8* i *MCM9* (151,152) pronađene su u pacijentica s primarnim hipergonadotropnim hipogonadizmom, dok su nositelji heterozigotnih mutacija zdravi i reproduktivno sposobni, iako i oni pokazuju veću učestalost kromosomskih lomova u odnosu na divlje tipove tih gena. Rezultati populacijskih cijelogenomskih analiza pokazuju najjaču asocijaciju između polimorfizma jednog nukleotida u egzonu 9 *MCM8* gena i dobi menopauze (154), što upućuje na funkciju tog gena u modulaciji trajanja reproduktivnog života, dok bi heterozigotne nositeljice mogle imati povećan rizik za razvoj POI, smanjene ovarijske rezerve i neplodnosti.

U ljudi homozigotni i heterozigotni nositelji mutacija gena čiji produkti sudjeluju u segregaciji kromosoma i popravku DNA pokazuju POI fenotip. Bouilly i sur. (155) pokazali su kako u pacijentica s primarnom i sekundarnom amenorejom prije 40. godine koje su pozitivne za mutacije povezane s POI, gotovo polovica posjeduje više od 1 mutacije. Nositeljice dvaju ili više mutacija prezentirale su se s POI u ranijoj dobi i češće s primarnom nego sa sekundarnom amenorejom. Supostojanje mutacija različitih gena može objasniti varijabilnost u POI fenotipu i nepotpunu penetrantnost mutacija koja je primjećena. Tablica 5 prikazuje gene povezane s POI fenotipom.

Tablica 5. Geni povezani s POI fenotipom (prema: OMIM)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Uloga gena	Fenotip
<i>FMR1</i>	Xq27.3	X-vezano	Odgovor DNA na oštećenja	POI1 Murray i sur. (156)
<i>DIAPH2</i>	Xq21.33	X-vezano dominantno	Regulira vezanje mikrotubula na kinetohore	POI2A Bione i sur. (157)
<i>POF1B/FLJ22792</i>	Xq21.1	X-vezano recesivno	Organizacija aktinskih filamenata, formiranje	POI2B Lacombe i sur. (158)

			čvrstih spojeva (engl. <i>tight junction</i> )	
<i>FOXL2</i>	3q22.3	AD	Diferencijacija granuloza stanica u jajniku, odgovor DNA na oštećenja	POI3 Laissue i sur. (159) Ostalo: blefarofimoza, epikantus inversus i ptoza (POI u sklopu sindroma opisali Harris i sur. (160))
<i>BMP15</i>	Xp11.22	X-vezano	Diferencijacija granuloza stanica u jajniku, ovulacija	POI4 Dixit i sur. (161) Ostalo: disgeneza jajnika (162)
<i>NOBOX</i>	7q35	AD	Folikulogeneza	POI5 Qin i sur. (163)
<i>FIGLA</i>	2p13.3	AD	Folikulogeneza	POI6 Tosh i sur. (164) Yuan i sur. (165) su identificirali recesivnu mutaciju gena
<i>NR5A1</i>	9q33.3	AD	Transkripcijski faktor koji regulira gene uključene u reprodukciju, steroidogenezu i spolni razvoj	POI7 Harrison i sur. (166) Ostalo: SPGF8, 46,XX i 46,XY promjena spola, adrenokortikalna insuficijencija (vidi tablice 1,2 i 4)
<i>STAG3</i>	7q22.1	AR	Sparivanje i segregacija kromosoma tijekom mejoze	POI8 Caburet i sur. (167)

<i>HFMI</i>	1p22.2	AR	Replikacija DNA	POI9 Wang i sur. (168)
<i>MCM8</i>	20p12.3	AR	Inicijacija replikacije DNA	POI10 AlAsiri i sur. (151)
<i>ERCC6</i>	10q11.2 3	AD	DNA popravak	POI11 Qin i sur. (169) Ostalo: povećan rizik za rak pluća i makularnu degeneraciju povezanu sa starenjem, cerebrookulofacioskeletalni sindrom (AR), Cockayne sindrom tip B (AR) i neki drugi
<i>SYCE1</i>	10q26.3	AR	Formiranje sinaptonemalnog kompleksa u mejozi	POI12 De Vries i sur. (170) Ostalo: SPGF15 (vidi tablicu 4)
<i>MSH5</i>	6p21.33	AR	Popravak DNA, rekombinacija DNA, crossing-over	POI13 Guo i sur. (171)
<i>GDF9</i>	5q31.1	AD/AR	Folikulogeneza	POI14 Bouilly i sur. (155) identificirali su bolesne heterozigotne nositeljice, a Franca i sur. (172) mutaciju koja se ispoljava u homozigotnoj varijanti
<i>FANCM</i>	14q21.2	AR	Popravak DNA	POI15 Fouquet i sur. (173)

				Ostalo: SPGF28 (vidi tablicu 4)
<i>BNC1</i>	15q25.2	AD	Regulira proliferaciju keratinocita i transkripciju rRNA, njegov produkt je nađen u velikoj količini u zametnim stanicama testisa i jajnika	POI16 Zhang i sur. (174)
<i>DMC1</i>	22q13.1	AR	Popravak DNA	POI sa sekundarnom amenorejom u homozigotnoj nositeljici, čiji se brat manifestira s NOA He i sur. (143)

Ekspanzija CGG tripleta *FMRI* gena povezana je sa smanjenom ovarijskom rezervom i POI u žena i neurodegenerativnim bolestima u odrasloj dobi u muškaraca, ali isključivo u slučaju premutacija tog gena sa 55-200 ponavljanja trinukleotidnog slijeda (59,175).

#### 2.4. Genetički uzroci malformacija reproduktivnog trakta

Determinacijom muškog spola i indukcijom *Sry* ekspresije u pre-

Sertolijevim stanicama, slijedi njihova diferencijacija prema nezrelim fetalnim Sertolijevim stanicama koje su hormonski aktivne. Jedan od glavnih hormona koji izlučuju je anti-Müllerov hormon (AMH), član obitelji TGF $\beta$  transkripcijskih faktora, koji se izlučuje sve do puberteta i marker je nezrelih Sertoli stanica (176). Njegova produkcija potaknuta je oko 8. tjedna gestacije djelovanjem transkripcijskih faktora SOX9, NR5A1, WT1 i GATA4, dok DAX1 inhibira transkripciju njegovog kodirajućeg gena (177,178). Pod utjecajem



AMH u periodu od 8. do 10. tjedna razvoja paramezonefritički Müllerovi vodovi regresiraju. Tijekom 9. i 10. tjedna razvoja iz prekursorskih stanica celomskog epitela i stanica podrijetlom iz mezonefrosa, diferenciraju se Leydigove stanice, pod parakrinim utjecajem Sertolijevih stanica. One izlučuju DHH i PDGFA koji se vežu za receptore na fetalnim Leydigovim stanicama, PTCH1 i PDGFR $\alpha$  (179). Slijedi izlučivanje testosterona čija koncentracija doseže vrhunac između 14. i 18. tjedna gestacije (180). Pod njegovim utjecajem održavaju se mezonefritički Wolffovi vodovi iz kojih se razvijaju epididimis, vas deferens i seminalne vezikule. U Leydigovim stanicama, djelovanjem 5 $\alpha$ -reduktaze, testosteron se konvertira u 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron, odgovoran za indukciju muške uretre, prostate, bulbouretralnih žlijezda, penisa i skrotuma, kao i za spuštanje testisa iz abdominalne šupljine u skrotum (15).

AMH regresiju paramezonefritičkih kanala postiže djelovanjem preko svojih receptora, poglavito receptora tipa II, AMHR-II (MISR-II), koji su eksprimirani na stanicama mezenhima u okolini paramezonefritičkih (Müllerovih) kanala (181). Vezanjem za njih potiče se mezenhimno-epitelna signalizacija (najvjerojatnije putem ekspresije *Mmp2*, koji kodira za matriks metaloproteinazu) i

inducira se regresija Müllerovih kanala (182). Ekspresija *Amhr2* održava se pak epitelno-mezenhimnim signaliziranjem putem WNT7a (183). Mutacije gena *Amh* i *Amhr2* odgovorne su za sindrom perzistentnih Müllerovih kanala u muškaraca i nasljeđuju se autosomno recesivno. Kod tih muškaraca se uz strukture nastale iz Wolffovih kanala i muško vanjsko spolovilo nalaze i jajovodi, maternica, cerviks i rodnic. Testisi su u tih muškaraca smješteni unutar *lig. latum uteri* ili unutar ingvinalnog kanala (181).

Djelovanje testosterona na mezonefritičke vodove je parakrino i omogućeno vezanjem za androgene receptore (AR) na mezenhimnim stanicama u okolini tih struktura. Razvoj triju različitih struktura (epididimisa, vas deferensa i seminalnih vezikula) iz Wolffovog kanala omogućeno je regionalno specifičnim epitelno-mezenhimnim interakcijama duž njegovog tijeka. Ona je omogućena regionalno specifičnom ekspresijom različitih faktora rasta (GDF7, FGF10 i kranio-kaudalnim rasporedom ekspresije različitih HOX proteina) (184,185). Mutacije gena *AR* (Xq12) prenose se X-vezano recesivno i zbog potpunog ili djelomičnog izostanka aktivnosti testosterona rezultiraju sindromom kompletne (engl. *androgen insensitivity syndrome*, AIS) ili parcijalne (engl. *partial*

*androgen insensitivity syndrome*, PAIS) neosjetljivosti na androgene (186–188). Fenotip AIS uključuje razvoj testisa koji zaostaju u abdomenu ili u ingvinalnom kanalu, žensko vanjsko spolovilo, slijepo završavajuću vaginu zbog izostanska razvoja sturkura iz Müllerovih kanala i ženski razvoj dojki i izostanak pubične i aksilarne dlakavosti. PAIS je poznat i kao Reifensteinov sindrom, riječ je o fenotipski heterogenom poremećaju čija prezentacija ovisi o rezidualnoj aktivnosti AR, a varira od izuzetne feminizacije vanjskog spolovila do genitalija koje nalikuju muškima. Najčešća prezentacija uključuje mikropenis, hipospadiju, bifidni skrotum sa ili bez kriptorhizma. Osim mutacija u genu koji kodira AR, i neadekvatna proizvodnja testosterona dovodi do različite razine hipomaskulinizacije vanjskog spolovila i poremećaja razvoja Wolffovih struktura. Ovakvo stanje može nastati zbog mutacija gena koji su zaduženi za steroidogenezu spolnih hormona (*AKR1C* genski klaster, *CYP5A*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP21A1*, *HSD3B2*, *HSD17B3*, *POR*, *SRD5A2*, *STAR*) (16).

Poremećaji razvoja struktura iz mezonefritičkih kanala mogu se pojaviti i izolirano od drugih reproduktivnih anomalija. Tada je najčešće riječ o kongenitalnoj bilateralnoj aplaziji vas deferensa (engl. *congenital bilateral aplasia*

*of vas deferens*, CBAVD), koja usprkos nazivu zahvaća i epididimis i seminalne vezikule. CBAVD se pripisuje 1-2% muške neplodnosti i nalazi se u čak 25% muškaraca s opstruktivnom azospermijom. U 80% muškaraca s CBAVD su homozigoti za mutaciju *CFTR* gena. Postoji i X-vezana varijanta ovog poremećaja, CBAVDX, koja nastaje zbog mutacije gena *ADGRG2* (Xp22.13). (izvor:OMIM)

Determinacijom ženskog spola i diferencijacijom jajnika, zbog nepostojanja Sry gena i njegovih nizvodnih signala, izostaje sinteza testosterona zbog čega se mezonefritički vodovi ne mogu održati te regrediraju. Suprotno tome, paramezonefritički vodovi slobodno se razvijaju, stapaju se u medijanoj liniji oko 9. tjedna gestacije i njihov jednoslojni epitel prolazi kroz regionalno specifičnu diferencijaciju formirajući jajovode, uterus, cerviks i gornju trećinu vagine. Regionalno specifični razvoj ovisan je, kao i kod muških fetusa, o regionalnoj ekspresiji *Hox* gena i *Wnt7a*. Anomalije razvoja Müllerovih struktura nalaze se u 1% žena normalne plodnosti i 3% žena s rekurentnim abortusima (189). Nekoliko gena je povezano s anomalijama Müllerovih struktura. Mutacije gena *HOXA13* nasljeđuju se autosomno dominantno i uzrokuju sindrom šaka-stopalo-uterus, u sklopu kojega se javljaju anomalije

reproduktivnog sustava (hipospadija u muškaraca i anomalije fuzije paramezonefritičkih kanala) s nepotpunom penetrantnosti i varijabilnom težinom fenotipa (190). U žena sa sporadičnim uterinim malformacijama i neplodnih žena s endometriozom identificirane su varijante *HOXA10* i *HOXA11* gena i aberantna ekspresija *HOXA11-AS1* antisense RNA (191). Nadalje, heterozigotne nositeljice mutacija *HNF1B* (192), *LHX1* (193), *WNT4* (192), *WNT7A* (194), *WNT9B* i *PBX1* (195) nalaze se s većom učestalosti u žena sa sindromskim i sporadičnim malformacijama maternice, uključujući i onih s Mayer-Rokitansky-Künster-Hauser sindromom. Neke studije spominju i mutacije *PAX2* (196), *PAX8* (197), *EMX2* (198) gena, iako su dokazi njihove povezanosti s Müllerovim anomalijama manje čvrsti.

## 2.5. Genetički uzroci neuspješne oplodnje i preimplantacijskog embrionalnog aresta

Ovulirana oocita, zaustavljena u metafazi II, okružena je glikoproteinskim omotačem zone pelucide i nekoliko slojeva stanica kumulusa kroz koje prodiru kapacitirani spermiji. Ljudska zona pelucida građena je od četiri glavna glikoproteina, ZP2, ZP3 i ZP4 koji formiraju duge filamente međusobno povezane sa ZP1. Oplodnja je omogućena prepoznavanjem

ZP3 na površini zone pelucide i proteina na površini glave spermija, čime se inducira akrosomska reakcija, a nakon nje se adhezija zone i spermija održava putem ZP2 glikoproteina. Slijede fuzija staničnih membrana gameta, blokada polispermije, aktivacija metabolizma jajne stanice i dovršenje mejotičke diobe te stapanje pronukleusa dvaju gameta (199). U razdoblju prije prve diobe (24 sata u sisavaca) i tijekom prvih nekoliko dioba nakon oplodnje, embrionalni genom transkripcijski je inaktivan i život zigote i brazdanje ovisni su o citoplazmatskim faktorima nasljeđenim od majke, koji su se u ooplazmi akumulirali tijekom maturacije oocite (200). Ti faktori uključuju RNA molekule, proteine, druge makromolekule i organele (201). Plod prolazi kroz fazu morule, formira blastocistu koja ulazi u maternicu i implantira se u njezin endometrij 6-7 dana nakon oplodnje.

Identificirani su brojni geni koji sudjeluju u fertilizaciji i ranom embrionalnom razvoju. Ukoliko su prisutne njihove patološke varijante, oplodnja će biti neuspješna ili će ubrzo nakon nje nastupiti rani embrionalni arest, u razdoblju prije nego li je moguće potvrditi trudnoću. Uz normalnu ovarijsku rezervu, normalne vrijednosti hormona i regularne cikluse, takvi slučajevi dijagnosticiraju se kao primarna idiopatska neplodnost. Procjenjuje

se da je 70% embrija dobivenih IVF-om vijabilno, dok ostalih 30% odumire u fazi brazdanja tijekom prvih nekoliko dana (202).

Zona pelucida okružuje oocitu od stadija primarnog folikula nadalje, kroz ovulaciju i oplodnju, te nakon nje, sprječavajući tako preranu implantaciju

blastociste (199). Njezin glikoproteinski matriks sintetizira sama oocita tijekom svoje maturacije unutar folikula. Zbog toga su poremećaju koji nastaju kao posljedica mutacija kodirajućih gena klasificirani kao defekti maturacije oocite (engl. *oocyte maturation defects*, OOMD). Tablica 6 prikazuje gene povezane s OOMD.

Tablica 6. Geni povezani s OOMD (prema: OMIM)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Fenotip	Komentar
<i>ZP1</i>	11q12.2	AR	OOMD1 Zhou i sur. (203)	Potpuni izostanak zone pelucide → nemogućnost oplodnje
<i>TUBB8</i>	10p15.3	AD, AR	OOMD2 Feng i sur. (204)	Gen kodira za $\beta$ -tubulin (s $\alpha$ -tubulinom tvori heterodimer koji polimerizira u mikrotubule) → defekt diobenog vretena i arrest MI oocite *gen je eksprimiran isključivo u oociti i embriju (mutacija nasljeđena od oca nema učinka na fenotip)
<i>ZP3</i>	7q11.23	AD	OOMD3 Zhou i sur. (203)	Potpuni izostanak zone pelucide i degeneracija oocite → sindrom praznog folikula * gen je eksprimiran isključivo u oociti i embriju (mutacija nasljeđena od oca nema učinka na fenotip)
<i>PATL2</i>	15q21.1	AR	OOMD4	Kodira za protein koji veže RNA i djeluje kao represor translacije,

			Maddirevula i sur. (205)	ekspresija visoka u stadiju germinalnog vezikula (GV), metafaze I i u prvom polarnom tijelu. Varijabilnost fenotipa: arest u stadiju GV ili u metafazi I, u nekih pacijentica završava se prva mejotička dioba, a u nekih razvoj napreduje i nakon oplodnje, ali nikada dalje od ranog embrionalnog stadija
<i>WEE2</i>	7q34	AR	OOMD5 Sang i sur. (206)	Kodira za tirozin kinazu koja inaktivira CDK1 i kontrolira stanični ciklus → arest oocite u metafazi II → nemogućnost oplodnje
<i>ZP2</i>	16p12.3-p12-2	AR	OOMD6 Zhou i sur. (203)	Abnormalno tanka zona pelucida i nepravilno vezanje spermija, priširen perivitelini prostor → uspješna trudnoća potencijalno moguća uz ICSI, ali češće završava arestom u preimplantacijskom razdoblju
<i>PANX1</i>	11q21	AD	OOMD7 Sang i sur. (207)	Kodira za pannexin 1, glikoprotein koji formira membranske kanale → uz mutacije smrt oocite nastupa prije ili nakon oplodnje, unutar 20-30 sati

Rani embrionalni arest povezan je i s dodatnim mutacijama. *TLE6* kodira za člana subkortikalnog membranskog kompleksa (engl. *subcortical membrane complex*, SCMC) koji je važan za progresiju zigote

iznad jednostaničnog stadija. SCMC sastoji se od Flooped (OOEP), Mater (NRLP5), *TLE6* i Filia (KHDC3L) (208). Nedostatak Flooped i/ili Mater (209), kao i mutacije gena *TLE6* (210), ne priječe oplodnju jajne

stanice, ali su povezane s defektnom formacijom zigote i nemogućnošću napredovanja iznad faze brazdanja. Mutacije gena *KHDC3L*, u homozigotnih nositeljica, povezane su s rekurentnom hidatiformnom molom (isto vrijedi i za mutacije *NLRP7*, *TOP6BL/C11ORF80*, *MEI1*) (211,212). *PADI6* kodira za enzim peptidilarginin deaminazu, koji sudjeluje u posttranslacijskim modifikacijama proteina, a njegova je ekspresija mnogo viša u oocitama nego u spermijima i somatskim stanicama. U homozigotnih i složenih heterozigotnih majki nositeljica ovih mutacija identificirana je, na razini zigote, redukcija fosforilacije RNA polimeraze II i

ekspresije gena uključenih u citokinezu, transkripciju i RNA obradu, što upućuje na poremećenu aktivaciju genoma zigote (213). Ove mutacije također ne priječe oplodnju, ali većina embrija odumire unutar prvih nekoliko dana, prije stadija blastociste. Ponekad trudnoća napreduje i do stadija implantacije, ali i u tim slučajevima prekid trudnoće nastupa prije nego li ju je moguće klinički dijagnosticirati. Geni koji kodiraju za različite majčine citoplazmatske faktore ekspimiraju se isključivo u oocitama i zbog toga su njihove mutacije povezane isključivo sa ženskim faktorom neplodnosti. (prema: *OMIM*) Tablica 7 prikazuje neke od tih gena.

Tablica 7. Geni povezani s preimplantacijskom smrću embrija (engl. *preimplantation embryonic lethality*, PREMBL) (prema: *OMIM*)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Fenotip
<i>TLE6</i>	19p13.3	AR	PREMBL1 Alazami i sur. (210)
<i>PADI6</i>	1p36.13	AR	PREMBL2 Xu i sur. (213)

## 2.6. Genetički uzroci smanjene fetalne vijabilnosti

Čak 60% oplodjenih jajnih stanica završava spontanom pobačajem ploda tijekom prvih 12 tjedana razvoja (214). Daleko najveći udio pobačaja (50-60%) nastaje kao posljedica fetalne aneuploidije, a među ostalim uzrocima su nebalansirane

translokacije kromosoma, anomalije uterusa, placentarna insuficijencija, trombofilični (poput antifosfolipidnog sindroma), imunološki ili endokrini poremećaji i brojni drugi. Zanimljivo je da su i varijante određenih gena povezane sa smanjenjem fetalne vijabilnosti (215), odnosno s povećanim rizikom rekurentnog

gubitka trudnoće u žena nositeljica tih mutacija (tablica 8). Gubitak trudnoće je pojam koji se odnosi na smrt ploda prije nego li on postane sposoban za život i uključuje spontani pobačaj (smrt fetusa koja

nastupa prije 20., odnosno 22. tjedna gestacije) i mrtvorođenje (ukoliko smrt nastupi nakon 22. tjedna).

Tablica 8. Geni povezani s povećanim rizikom ponavljanih gubitaka trudnoće (engl. *recurrent pregnancy loss, RPRGL*) (izvor: *OMIM*)

Gen	Lokus	Nasljeđivanje	Fenotip	Komentar
F5	1q24.2	AD	RPRGL1	Kodira za koagulacijski faktor V Leiden Martinelli i sur. (216) zaključili su da mutacije faktora V i protrombina nose približno 3X veći rizik od kasnog gubitka ploda
F2	11p11.1	AD	RPRGL2	Kodira za koagulacijski faktor II Pihusch i sur. (217) su povezali 20210G-A mutaciju s češćim gubitkom trudnoće u prvom tromjesečju
ANXA5	4q27	AD	RPRGL3	Kodira za aneksin 5 (formira o naponu ovisne Ca <sup>2+</sup> kanale i veže se za F-aktin i gama-aktin u aktiviranim trombocitima) Bogdanova i sur. (218)
SYCP3	12q23	AD	RPRGL4	Kodira za protein 3 sinaptonemalnog kompleksa, u muškaraca ova mutacija uzrokuje defekt spermatogeneze Bolor i sur. (130)
Pretpostavljena povezanost, ali nedostatni dokazi				
NOS3	7q36.1			Kodira za endotelnu NO sintetazu

			Tempfer i sur. (219) detektirali su veću frekvenciju <i>NOS3</i> polimorfizma u žena s idiopatskim rekurentnim pobačajima
<i>JAK2</i>	9p24.1		Kodira za janus kinazu 2 Mercier i sur. (220) pronašli su povezanost <i>JAK2</i> V617F mutacije i rizika od embrionalne ili fetalne smrti
<i>HLA-G</i>	6p22.1		Pfeifer i sur. (221) povezali su polimorfizme s <i>RPRGL</i>
<i>HLA-DRB1</i> <i>HLA-DQB1</i>	6p22.32 6p21.32		Nielsen i sur. (222) predložili su povezanost nepravilne imunološke reakcije majke na HY antigene specifične za muški spol, tijekom prve trudnoće u kojoj se nosi muški plod, i sekundarnih rekurentnih pobačaja

Život ploda ovisi o pravilnoj funkciji posteljice, organa izuzetno visoke hormonske aktivnosti, koji proizvodi i brojne proteine, enzime, citokine i druge molekule (223). Neadekvatna placentarna sinteza tvari obilježje je placentarne insuficijencije i ima negativne implikacije za trudnoću. Tako razine beta-1-glikoproteina specifičnog za trudnoću, kojeg sintetiziraju stanice sinciotrofoblasta, pokazuju korelaciju s funkcijom placente i dobrostanjem fetusa, tako da se niske razine povezuju s neželjenim ishodima trudnoće (224). Nadalje, trofoblast sintetizira i aloantigene *TLXA* (engl. *trophoblast-lymphocyte cross-reactive alloantigens*) koji su odgovorni za prepoznavanje blastociste od strane majčinih tkiva i omogućuju

toleranciju imunološki stranog fetalnog tkiva tijekom trudnoće. McIntre i sur. (225) pretpostavili su da bi njihov manjak mogao rezultirati defektnom implantacijom i spontananim pobačajem.

Geni *A4GALT* kodira enzim odgovoran za sintezu Gb3, a *B3GALT3* enzim odgovoran za sintezu Gb4 antigena. Ti antigeni na površini eritrocita određuju njihovu pripadnost krvnoj grupi P1Pk sustava. Čini se kako bi njihov nedostatak mogao biti povezan s teškim oblicima transfuzijskih reakcija i rekurentnim pobačajima (226).



## 2.7. Poligenski uzroci neplodnosti

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) najčešći je uzrok ženske neplodnosti kojemu se pripisuje čak 40% slučajeva, a vrlo je čest i u općoj populaciji žena generativne dobi gdje zahvaća njih 5-10% (1). Neplodnost je posljedica niže stope fertilizacije i više stope gubitka trudnoće

(30-50%). PCOS je fenotipski heterogena skupina poremećaja čija je etiologija multifaktorijalne prirode. Nije identificiran gen čija bi mutacija u homozigotnoj ili heterozigotnoj varijanti uzrokovala nastanak PCOS-a, međutim, identificirani su geni za koje se smatra da njihove varijacije mogu nositi povećan rizik za razvoj ovog poremećaja (tablica 8) (227).

Tablica 8. Geni čiji su polimorfizmi povezani s etiopatogenezom PCOS-a (prema: Khan i sur. (227))

Gen	Lokus	Funkcija	Referenca
<i>CYP11A</i>	15q24.1	Uključen u steroidogenezu	Diamanti-Kandarakis i sur. (228)
<i>CYP17</i>	10q24.32	Uključen u steroidogenezu	Carey i sur. (229)
<i>CYP19</i>	15q21.2	Uključen u steroidogenezu	Ito i sur. (230)
<i>AR</i>	Xq12	Modulira učinak spolnih hormona	Hickey i sur. (231) pronašli su da je epigenetičko utišavanje X kromosoma povezano s rizikom od PCOS-a
<i>SHBG</i>	17p13.1	Modulira učinak spolnih hormona	Wickham i sur. (232)
<i>INS</i>	11p15.5	Uključen u sekreciju i biološki učinak inzulina	Waterworth i sur. (233)
<i>INSR</i>	19p13.2	Uključen u sekreciju i biološki učinak inzulina	Urbanek i sur. (234)
<i>IRS1</i>	2q36.3	Uključen u sekreciju i biološki učinak inzulina	Thangavelu i sur. (235)
<i>CAPN10</i>	2q37.3	Uključen u sekreciju i biološki učinak inzulina	Saez i sur. (236)

<i>LHB</i>	19q13.33	Gonadotropin	Batista i sur. (237)
<i>FSHR</i>	2p16.3	Gonadotropinski receptor, modulacija djelovanja FSH	Wu i sur. (238)
<i>AMH</i>	19p13.3	Produkt granulosa stanica	Gorsic i sur. (239)
<i>FTO</i>	16q12.2	Kodira za alfa-ketoglutarat ovisnu diokcigenazu,	Rizwan i sur. (240)
<i>PCOS1</i>	19p13.2	Regija na kromosomu 19 povezana s rizikom od PCOS	Urbanek i sur. (234)
<i>SRD5A1</i>	5p15.31	Kodira za steroid 5 $\alpha$ -reduktazu 1	Goodarzi i sur. (241) povezali SRD5A1 s rizikom od hirsutizma, a SRD5A2 s protekcijom od hirsutizma
<i>NCOR1</i>	17p12-p11	engl. <i>nuclear receptor corepressor 1</i>	Qu i sur. (242) pronašli su 5 hipometiliranih CpG unutar promotora NCOR1 i 2 hipermetilirana CpG unutar promotora PPARG1
<i>PPARG1</i>	3p25.2	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> , uključen u diferencijaciju adipocita	

Još jedan česti ginekološki problem, s jednakom prevalencijom od 0.8-6% u općoj populaciji, je endometrioza. Ova prevalencija raste i na 20-50% unutar skupine žena sa smanjenom plodnosti (243). I u ovom slučaju je riječ o klinički heterogenom poremećaju multifaktorijalne etiologije. Na temelju blizanačkih studija zaključeno je da udio slučajeva koji se mogu

pripisati genetskim faktorima, odnosno nasljeđu, iznosi 51% (244). Na temelju rezultata cjelogenomskih analiza povezanosti (engl. *genome-wide association study*, GWAS) identificirane su regije genoma koje pokazuju povezanost s rizikom za razvoj endometrioze (tablica 9) (7).

Tablica 9. Geni čiji su polimorfizmi povezani s rizikom za razvoj endometrioze (prema: Fung i sur. (7))

Gen	Lokus	Funkcija	Referenca
<i>WNT4</i>	1p36.12	Kodira za glikoprotein bogat cisteinom koji sudjeluje u staničnom signaliziranju, sudjeluje u indukciji razvoja ženskog spola i supresiji razvoja muškog spola	Mafra i sur. (245)
<i>GREB1</i>	2p25.1	Gen osjetljiv na stimulaciju estrogenom, pretpostavlja se da igra važnu ulogu u hormonski osjetljivim tkivima	Matalliotaki i sur. (246)
<i>FNI</i>	2q35	Kodira za fibronektin 1, sudjeluje u adheziji i migraciji stanica	Matalliotaki i sur. (246)
<i>ID4</i>	6p22.3	engl. <i>inhibitor of DNA binding 4</i>	Fung i sur. (7)
Intergenski SNP na kromosomu 7		SNP rs12700667 nalazi se uzvodno od HOXA genskog klastera	Viana i sur. (247)
<i>CDKN2BAS</i>	9p21.3	Nekodirajuća antisense RNA, njezini SNP povezani su s očekivanim trajanjem zdravog života (eng. <i>healthy life expectancy</i> )	Pagliardini i sur. (248)
<i>VEZT</i>	12q22	Kodira za vezatin, važnu komponentu kadherin-kateninskog kompleksa	Holdsworth-Carson i sur. (249)
<i>IL1A</i>	2q14.1	Kodira za interleukin 1A, medijator upale i imunosti kojeg secerniraju brojne stanice (makrofazi, fibroblasti, limfociti i drugi)	Badie i sur. (250)

### 3. Epigenom i epigenetika

Epigenetika je područje biologije koje proučava molekularne modifikacije genske ekspresije, nastale bez promjene unutar DNA sekvence. Epigenom, analogno genomu, odnosi se na skup svih epigenetičkih promjena unutar jednog organizma. Međutim, dok je genom, definiran stapanjem haploidnih setova kromosoma muške i ženske gamete pri oplodnji, stabilan i jednak u svim stanicama jednog organizma, epigenetičke promjene tog genoma su reverzibilne i specifične za stanicu, tkivo ili pak određenu fazu razvoja organizma. Iako su sve stanice eukariotskog organizma svojom strukturom i osnovnim staničnim procesima koji se unutar njih zbivaju izuzetno slične, ipak unutar jednog organizma razlikujemo više od 200 različitih vrsta stanica koje se međusobno razlikuju izgledom i funkcijom. Upravo su epigenetičke promjene kromatina jedan od mehanizama regulacije genske ekspresije unutar stanice. Drugim riječima, one omogućuju promjenu fenotipa bez promjene genotipa (14).

#### 3.1. Epigenetički mehanizmi

Osnovni epigenetički mehanizmi su DNA metilacija, modifikacije histona, RNA-posredovana regulacija i reorganizacija nukleosoma (14,251).

DNA metilacija je kovalentna modifikacija DNA molekule koja ne utječe na njezin nukleotidni slijed. Metilna skupina, -CH<sub>3</sub>, dodaje se citozinskoj bazi na njezinom petom C atomu, formirajući 5-metilcitozin. Reakcija se odvija na citozinu koji je je fosfatnom skupinom povezan s gvaninom nizvodno, odnosno na CpG dinukleotidnoj sekvenci. Metilacija CpG sekvence mijenja aktivnost gena u čijem se sastavu nalazi, smanjujući njegovu ekspresiju i inaktivirajući ga (251,252). Inaktivacija se postiže višestrukim mehanizmima. Prvo, nemogućnošću vezanja specifičnih aktivatora transkripcije za metiliranu regiju. Dodatno, metilirane CpG sekvence omogućuju vezanje proteina koji potiču inaktivaciju gena, kao što je MeCP2, koji veže i histonsku deacetilazu, HDAC, te MBD1 (engl. *methyl-CpG-binding protein 1*) koji stvara kompleks s histonskom metiltransferazom, HMT (251,253). Posljednja dva mehanizma predstavljaju spojnicu između DNA metilacije i histonske modifikacije koja dovodi do stvaranja heterokromatina i utišavanja genske transkripcije. Reakciju DNA metilacije kataliziraju DNA metiltransferaze, enzimi koji prenose metilnu skupinu s molekule S-adenozilmetionina na CpG citozin. DNMT1 zadužena je za održavanje obrasca metilacije tijekom DNA replikacije tako što se veže za hemimetiliranu DNA molekulu i

prepisuje metilacijski obrazac s roditeljskog lanca. DNMT3A i DNMT3B zadužene su za de novo metilaciju DNA pa je njihova aktivnost najizraženija tijekom ranog embrionalnog razvoja (252). DNMT3L je katalitički neaktivni kofaktor, koji vezanjem za ostale DNMT3 enzime povećava njihovu aktivnost čak 15 puta (254). Budući da su epigenetičke promjene reverzibilne, postoji i mogućnost demetilacije. Ona može biti pasivna ako izostane aktivnost DNMT1 tijekom replikacije te dođe do gubitka metilacijskog obrasca na novosintetiziranom lancu uz daljnje smanjenje stupnja metilacije sa svakom idućom replikacijom. Dakle, pasivna demetilacija ovisna je o replikaciji. Dodatno, demetilacija može biti i aktivna, odnosno posredovana porodicom enzima *ten-eleven translocation* (TET), što je od izuzetne važnosti u procesu epigenetičkog programiranja tijekom rane faze razvoja embrija (255,256).

U jezgri je molekula DNA usko povezana s histonima – po dvije molekule H2A, H2B, H3 i H4 tvore oktamersku srž oko koje se DNA navija dva puta formirajući nukleosom, osnovnu funkcionalnu jedinicu kromatina. Kromatin može biti više ili manje kondenziran, što pak otežava ili olakšava pristup na DNA molekulu i tako mijenja razinu genske transkripcije (257). N-terminalni krajevi

histonskih polipeptidnih lanaca sadrže pozitivno nabijene aminokiseline, koje su usmjerene od srži nukleosoma u obliku 'histonskih repova' (engl. *histone tails*). Na histonskim repovima odvijaju se posttranslacijske modifikacije kovalentnim vezanjem različitih skupina u reakcijama metilacije, acetilacije, fosforilacije, sumoilacije, ubikvitilacije i brojnih drugih. Spomenute skupine mijenjaju elektrostatski naboj histonskih repova te tako utječu na interakciju DNA molekule i histona, što se odražava na strukturu cijele molekule kromatina uvjetujući stupanj njegove kondenziranosti (258). Jedan od mehanizama takvog remodeliranja kromatina jest histonska acetilacija, reakcija dodavanja acetilne skupine,  $-CH_3CO$ , na aminokiselinu lizin čime se neutralizira njezin pozitivni naboj (258,259). Time se interakcija histona i DNA molekule opušta, dopuštajući pristup transkripcijskih faktora te pogodujući genskoj transkripciji. Ova reakcija katalizirana je histonskim acetiltransferazama. Suprotno se događa djelovanjem histonskih deacetilaza – uklanjanjem acetilnih skupina s lizinskih ostataka, histonski repovi postaju pozitivno nabijeni i ulaze u tijesnu elektrostatsku interakciju s negativno nabijenom DNA, priječeći pristup transkripcijskih faktora i smanjujući gensku aktivnost. Upravo je visok stupanj acetilacije povezan s transkripcijski aktivnim eukromatinom, dok

je visoko kondenziran i transkripcijski neaktivan heterokromatin slabo acetiliran. I druge histonske modifikacije uzrokuju remodeliranje kromatina (251,258).

Dodatni epigenetički mehanizam je RNA interferencija koja se temelji na funkciji nekodirajućih RNA, gdje se ubrajaju lncRNA, miRNA, siRNA i piRNA molekule (260). Ove molekule mogu regulirati gensku ekspresiju utječući na transkripciju (remodulacijom kromatina), kako djeluju lncRNA, siRNA i piRNA; ili im učinak može biti posttranskripcijski (prepoznavanjem ciljane mRNA molekule i njezinom degradacijom ili blokadom translacije), kako djeluju miRNA i siRNA (260,261). miRNA su 21-25 nukleotida dugačke jednolančane nukleinske kiseline sa izuzetno važnom ulogom u regulaciji gametogeneze i embriogeneze (262). Prvi korak u njezinoj sintezi je dvosmjerna transkripcija s DNA, pri čemu nastaje primarna miRNA, pri-miRNA, koja se slaže u obliku ukosnice. Nju prerađuje enzimi Drosha i Pasha u prekursorsku miRNA, pre-miRNA, koja izlazi iz jezgre u citoplazmu gdje se dodatno procesira djelovanjem RNaza III enzima, Dicer. Time nastaje dvolančana miRNA koja se povezuje s proteinom Argonaut u miRISC (engl. miRNA-induced silencing complex) unutar kojeg se formira jednolančana miRNA

sprema za prepoznavanje sebi komplementarne mRNA (14,262).

Svaki od opisanih mehanizama promijenit će ekspresiju gena čuvajući njegovu strukturu. Valja istaknuti kako dinamičnost tih procesa nije uvjetovana isključivo intrinzičnim faktorima same stanice, već znatan doprinos daje upravo mikrookoliš u kojem se svaka pojedina stanica nalazi, a na koji utječu i vanjski faktori okoliša.

### 3.2. Epigenetička zbivanja tijekom gametogeneze

#### 3.2.1. Epigenetička zbivanja tijekom spermatogeneze

Proces formiranja zrelih haploidnih muških gameta tijesno je reguliran na svakom svom koraku genetskim i epigenetskim mehanizmima, sve sa ciljem ostvarivanja uspješne oplodnje. Proces spermatogeneze kontinuirano se počinje odvijati s pubertetom, odnosno s uspostavljanjem osi hipotalamus-hipofiza-testis (263). Međutim, formiranju inicijalne stanice spermatogeneze, spermatogonije, prethode brojni događaji koji započinju već u najranijem intrauterinom životu i nastavljaju se postnatalno tijekom djetinjstva pa sve do puberteta (256).

PGC su tijekom migracije podvrgnute drastičnim epigenetičkim promjenama, koje u ovoj fazi razvoja ne zahvaćaju niti jednu drugu populaciju stanica. Naime, neposredno nakon oplodnje, tijekom prvih dioba zigote, nastupa globalna demetilacija DNA s drastičnim promjenama kromatina (264). Ovo epigenetsko reprogramiranje dovodi do aktivacije faktora pluripotencije (geni *OCT-4*, *Nanog*, *Sox*) u embrionalnim zametnim stanicama i ključno je za konačni razvoj različitih vrsta stanica i tkiva iz samo dvije visoko diferencirane stanice, spermija i jajne stanice (265). DNA metilacija i protekcija CpG otoka uspostavljaju se tijekom implantacije, tako da stanice postimplantacijskog embrija dobivaju svoj epigenomski obrazac koji je većinski stabilan tijekom cijelog života (266). Drugačija sudbina čeka buduće spolne stanice. Naime, PGC tijekom svoje migracije u postimplantacijskom embriju podliježu dodatnom valu demetilacije, odnosno resetiranju svog epigenoma (267). Time stupanj metilacije u PGC opada sa 70% na otprilike 4%, dolazi do brisanja somatskog epigenetskog programa i aktivacije gena specifičnih za PGC (268). Demetilacija DNA se u PGC odvija aktivno i pasivno. Epigenetičkom aktivacijom transkripcijskih faktora PRDM1 i PRDM14 inhibirano je djelovanje DNMT1, koja je zadužena za održavanje metilacije, ali i

DNMT3a i DNMT3b, koje su zadužene za de novo metilaciju, što skupno dovodi do gubitka metiloma tijekom replikacija (269,270). Aktivna demetilacija posredovana TET enzimima izražena je u područjima lokusa zahvaćenih imprintingom kao što je *H19* (271). Uz ovu, TET enzimi imaju i dodatnu funkciju zaštite genoma od nepravilne remetilacije tijekom daljnjih faza diferencijacije PGC. Demetilacija genoma PGC završena je nedugo nakon njihove migracije u buduće gonade (272).

Međutim, demetilacija genoma nije jedina epigenetička promjena koja zahvaća PGC. Uz nju dolazi i do opsežne modulacije kromatina zbog promjene obrasca histonskih posttranslacijskih modifikacija. Naime, zabilježen je gubitak H3K9me<sub>2</sub>, povezan s gubitkom transkripcijske represije, ali i porast H3K27me<sub>3</sub> i H3K9me<sub>3</sub>, modifikacija vezanih uz transkripcijski inaktivni heterokromatin (273). Vrijedno je spomenuti da di- i trimetilacija H3K9, iako jesu biljezi heterokromatina, nisu u čvrstoj korelaciji s transkripcijskom represijom, tako da je te modifikacije moguće pronaći i unutar promotora transkripcijski vrlo aktivnih gena. Suprotno tome, modifikacija H3K27me<sub>3</sub> unutar promotora u čvrstoj je korelaciji s genskom inaktivnošću (274). Navedene PTM kataliziraju posebni enzimi,

SETDB1, PRMT5 i H3K9 metiltransferaze čija je ekspresija visoka sve do ponovnog uspostavljanja staničnog metiloma (273,275). Njihova aktivnost inducira kromatinske modifikacije koje štite stabilnost i integritet genoma u odsutnosti DNA metilacije.

Dolaskom u gonadalni greben tijekom 5. tjedna razvoja, PGC gube svoju sposobnost migracije i dalje se diferenciraju u smjeru prospermatogonija ili oogonija, ovisno o signalima koje primaju iz mikrookoliša u kojem se nalaze (24). Diferencijacijom prema prospermatogonijama, ove se stanice mitotički dijele i ponovno pokazuju aktivnost DNMT enzima što u mišjim gonocitima korelira sa smanjenjem ekspresije gena pluripotencije. U *de novo* metilaciji u oba spola se aktivnost DNMT3A pokazala esencijalnom, dok DNMT3B pokazuje određenu redundantnost funkcije (276). U fetalnim testisima ljudi, najveća aktivnost DNMT3A i DNMT1 zabilježena je tijekom 22. tjedna razvoja, iako se održava visokom od 21. do 23. tjedna (277). Na temelju toga se pretpostavlja da je to vrijeme kada se DNA prospermatogonija remetiliraju. Djelovanjem tih enzima se obnavlja metilom specifičan za spermije uz ponovno uspostavljanje očinskog metilacijskog obrasca unutar tri diferencijalno metilirane regije, DMR.

Budući da se metilom spermija ne razlikuje značajno od metiloma spermatogonijske stanice, zaključuje se da se metilacijski obrazac muške zametne linije uspostavlja prije početka spermatogeneze i u ljudi on zahvaća do 90% CpG dinukleotida. Uz remetilaciju DNA, uz neke promotore odvija se i metilacija histona H3K4, koja je čvrsto povezana s aktivacijom gena, i H3K27, koja je povezana s genskom represijom (278). Ovakav bivalentni obrazac karakterističan je za primordijalne zametne stanice, kojima u ovaj fazi prospermatogonije i nalikuju, iako važnost ovog otkrića nije u potpunosti jasna. Pretpostavlja se da bi ovakav obrazac PTM mogao označavati prijelaz unipotentne stanice u pluripotentnu, u pripremi za oplodnju. Nadalje, u diferenciranim prospermatogonijama prisutna je redukcija metilacije H3K9, što upućuje na opuštanje kromatina i pojačanu gensku transkripciju. H3K9me3 je biljeg heterokromatina, on veže heterokromatinski protein 1 (HP1) koji je odgovoran za formaciju i održavanje heterokromatina i transkripcijske represije. Naime, modifikacije metiloma dijelom su ovisne o postojećim PTM-a histona unutar kromatina. Tako DNMT3A svojom ADD domenom prepoznaje i veže isključivo nemetilirani H3K4, mijenja svoju konformaciju i postaje katalitički aktivna, dok prisutnost H3K4me3 koči aktivnost tog enzima (279).



Uz specifične histonske modifikacije, u spermatogenim stanicama prisutne su varijacije H2 histona, specifične za testis (TH2A, TH2B), koje su odgovorne za pravilnu regulaciju kohezije tijekom mejotičke diobe (256). Dakle, epigenetske modifikacije genoma u ovoj fazi razvoja muških gameta odgovorne su za pripremu prospermatogonija na pravilnu mejotičku diobu u budućnosti. Diferencirane prospermatogonije s obnovljenim metilomom, ulaze u G0/G1 fazu i mitotički arrest u prenatalnom razdoblju i održavaju se u njemu sve do puberteta (280). Iako je epigenom tijekom djetinjstva većinski stabilan, ipak je podložan modifikacijama, koje iako minimalne, mogu utjecati na funkcionalnost gameta i na njihovu sposobnost za oplodnu (281).

S pubertetom i uspostavljanjem osi hipotalamus-hipofiza-testis, prospermatogonije izlaze iz mitotičkog aresta, dijele se i dobivaju poticaj za diferencijaciju u spermatogonije tipa A i B, i konačno primarne spermatocite koje ulaze u profazu I. mejotičke diobe (263). Tijekom mejoze, od primarnih spermatocita do haploidnih spermatida, odvijaju se karakteristične epigenetske promjene. Iako nema promjena u staničnom metilomu, prisutne su opsežne remodelacije kromatina. Naime, zatvaraju se, odnosno postaju transkripcijski nepristupačni lokusi

specifični za mitozu, dok se lokusi specifični za mejozu otvaraju. Pojavljuju se i dodatne varijante histona specifične za testise, H1t i H3t, koje su vezane uz relaksaciju kromatinske strukture i pravilnu mejotičku transkripciju s reguliranom rekombinacijom (282,283).

Mejozom nastale haploidne spermatide nisu funkcionalne muške gamete sve dok ne prođu kroz proces spermioogeneze. Spermijacijom otpuštene pojedinačne spermatide sazrijevaju prolaskom kroz reproduktivni sustav muškarca. U ovoj fazi stanice su ponovno podvrgnute dramatičnim epigenetskim modifikacijama. Najvažnija, i za funkcionalnost spermija neizostavna, jest zamjena histonskih proteina protaminima. Riječ je o visoko bazičnim proteinima, protaminu 1 i 2, koji neutraliziraju negativan naboj DNA molekule i omogućuju izuzetno čvrstu kompakciju genoma spermija (284). Organizacijom kromatina u strukturu koja je čak 6-20 puta kompaktnija u usporedbi s onom unutar somatskih stanica, genom spermija postaje inertan. Transkripcijska aktivnost očuvana je unutar 10-15% genoma koji zadržava svoju vezanost uz histonske oktamere (285). Histonsko-protaminska tranzicija uključuje tri koraka. Prvi korak je hiperacetilacija kromatina sa stvaranjem otvorene kromatinske strukture. Slijedi zamjena histona tranzicijskim proteinima,

TP1 i TP2, koji se u posljednjem koraku zamjenjuju protaminima, PRM1 i PRM2. Nakon oplodnje protamini se zamjenjuju histonima jajne stanice, čime se omogućuje dekondezacija kromatina i formiranje očevog pronukleusa (286).

Napredovanjem kroz faze spermatogeneze mijenja se ekspresija pojedinih gena, ali i ekspresija nekodirajućih RNA, poput miRNA. One sudjeluju u regulaciji genske ekspresije i ulaze u interakciju s drugi regulatornim epigenetskim mehanizmima. Tako prisutnost miR-29a i miR-29b ometa aktivnost DNMT3A i DNMT3B i koči *de novo* metilaciju (287), dok miR-469 degradira mRNA koja kodira za tranzicijske proteine i ometa histonsko-protaminsku tranziciju (288). Ove molekule prenose se u zigotu sa oplodnjom i igraju važnu ulogu u procesima ranog razvoja. Primjerice, miR-34c, ujedno i najobilnija mRNA u spermijima, odgovorna je za smanjenje ekspresije *Bcl-2* gena u zigoti miša, čime omogućuje prvu diobu zigote (289).

### 3.2.2. Epigenetička zbivanja tijekom oogeneze

Za kvalitetu budućega embrija, njegov potencijal za život i zdravlje, neobično je važna kvaliteta jajne stanice koja će biti oplodena. Ta kvaliteta definirana

je, kako genetskim sadržajem jajne stanice, tako i sumacijom utjecaja svih egzogenih čimbenika koji su na nju djelovali cijelog njezinog života, a koja se ogleda upravo u njezinom epigenomu. Zbog činjenice da je oplodena jajna stanica ujedno i ona stanica koja je bila prisutna u fetalnom jajniku tijekom razvoja, pa stoga i izložena djelovanju različitih čimbenika za vrijeme fetalnog života, najprije će kratko biti govora o rađanju primarnih oocita čijom mejotičkom diobom nastaju jajne stanice.

Jajne stanice, analogno spermijima kod muškaraca, nastaju iz primordijalnih zametnih stanica, čiji je put od specifikacije do migracije i diferencijacije, jednak u oba spola. PGC se krajem 5. ili početkom 6. tjedna embrionalnog razvoja smještaju u prekursore gonada, gonadalne grebene, koji se u ovoj fazi svoga razvoja nalaze u indiferentnom, odnosno bipotencijalnom stadiju (15). Vrlo skoro po smještanju u gonadalne prekursore, a po nekim autorima i prije ulaska u njih, PGC privede su kraju i drugi val demetilacije, odnosno završio se proces epigenetskog reprogramiranja. PGC diferenciraju se u oogonije koje se od 2. do 5. mjeseca intenzivno dijele mitozom, a svoj maksimalni broj od 7 milijuna dostižu već u 20. tjednu razvoja (290). Stanični klonovi oogonija, nastali u periodu od 9. do 22. tjedna, isprva su povezani citoplazmatskim mostićima koji se gube sa diferencijacijom u

primarne oocite i njihovim ulaskom u prvu mejotičku diobu, u periodu od 12. do 25. tjedna razvoja. Primarne oocite napreduju kroz leptoten, zigoten, pahiten i ulaze u diktioten, u kojem se zaustavljaju sve do puberteta. Zaustavljanju staničnog ciklusa u fazi diktiotena podložne su sve primarne oocite u razdoblju od 16. do 29. tjedna razvoja (291). U trenutku svoga aresta u profazi I, primarne oocite okružene su jednim slojem pločastih stanica unutar primordijalnih folikula i gotovo su u potpunosti lišene metilacije na svojim DNA molekulama. Dakle, dok muške spolne stanice, prospermatogonije, prvo obnavljaju svoj stanični metilom i potom se zaustavljaju u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ciklusa, oocite ulaze u mejotički arest prenatalno, a obnovu metiloma započinju tek sa staničnim rastom u kasnijim fazama razvoja folikula (146). Različiti geni metilirani su u različito vrijeme, kroz cijeli period razvoja folikula od primarnog do antralnog stadija, tako da o potpuno obnovljenom metilomu možemo govoriti tek u fazi preovulatornog Graafovog folikula (292,293). Proces obnove metiloma u oociti ima specifičan obrazac i dinamiku, a isto vrijedi i za posttranslacijske modifikacije histona i histonske varijante.

Još prije uspostave metilacije u oocitama, na lokusima koji su predodređeni za metilaciju detektiraju se specifične

histonske modifikacije u pripremi za samu metilaciju DNA molekule (294). Dakle, epigenetski mehanizmi ne djeluju neovisno jedan od drugoga, već međusobno komplementarno. Te histonske modifikacije uključuju redukciju di- i trimetilacije lizina na 4. poziciji histona H3, H3K4me<sub>2</sub> i H3K4me<sub>3</sub>, dviju histonskih modifikacija koje su protektivne za metilaciju DNA, i porast trimetilacije lizina na 36. poziciji istog histona, H3K36me<sub>3</sub>, koja dopušta DNA metilaciju (295,296). Naime, pokazalo se da su mjesta djelovanja DNMT enzima na DNA molekuli određena upravo histonskim modifikacijama toga dijela kromatina, koje su pak uvjetovane transkripcijskom aktivnošću (256). Ova ovisnost DNA metilacije o transkripciji prvo je istražena u miševima na primjeru *Gnas* gena i njegovih dviju diferencijalno metiliranih regija, gDMR, a nešto detaljnije bit će razjašnjena niže.

Obnova staničnog metiloma oocite ovisna je ponajprije o aktivnosti *de novo* DNMT3 skupine enzima, dok aktivnost DNMT1 za maturaciju i funkcionalnost oocite u pogledu fertilizacije nije toliko značajna, zbog izostanka DNA replikacije između dviju mejotičkih dioba. Usprkos tome, normalna funkcija DNMT1 oocite nezaobilazna je u cijelom kontekstu plodnosti, jer oštećenje te funkcije vodi letalitetu ploda *in utero* (297), što će biti

objašnjeno u poglavlju 3.3. Iako se u oociti detektiraju DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L, ipak se čini da je aktivnost DNMT3B neobavezna i da, za razliku od obnove metiloma u spermijama, u oociti ona leži isključivo na aktivnosti DNMT3A i kofaktora DNMT3L (298). Nadalje, i sam konačni obrazac metilacije u oocitama je specifičan. Za razliku od spermija, gdje je po potpunoj obnovi metiloma 90% CpG dinukleotida metilirano, ta razina u oocitama iznosi svega 40% (299). Dodatno, zastupljenost metilnih skupina nije jednolika kroz genom, kao što je to slučaj u spermijama i u somatskim stanicama, već se opaža bimodalni obrazac metilacije s velikim blokovima hipo- (metilirano <25%) i hipermetilacije (metilirano >75%), dok je samo manji dio CpG dinukleotida djelomično metiliran, uglavnom onih u intergenskim područjima (300). Nadalje, u oociti je prisutno iznenađujuće mnogo metilnih skupina izvan CpG dinukleotida, što se označava kao CpH metilacija, a većinski je prisutna unutar CpA dinukleotida (301). Ovakva metilacija naziva se i asimetričnom jer se ne preslikava s roditeljskog lanca tijekom replikacije. Ona je karakteristika i drugih stanica s visokom aktivnosti *de novo* DNMT, kao što su embrionalne matične stanice. Budući da DNMT3A i DNMT3L ne metiliraju isključivo CpG dinukleotide, a primarna oocita nalazi se u nereplikativnom stanju, s

vremenom i s maturacijom oocite dolazi do akumulacije CpH metilacije.

Prethodno je već spomenuta ovisnost DNA metilacije o transkripciji i o histonskim PTM. Naime, istraživanja na miševima pokazuju da se *DNMT3A* i *DNMT3L* eksprimiraju početkom rasta primarne oocite kada njezin promjer dosegne 50  $\mu\text{m}$ , što odgovara prijelazu primarnog u sekundarni folikul, raste s daljnjim rastom oocite i doseže vrhunac kada je promjer stanice >70 $\mu\text{m}$ , što kod miševa odgovara oociti unutar preovulatornog folikula (302). Završetkom sazrijevanja završava se i uspostavljanje staničnog metiloma te slijede pad ekspresije *de novo* DNMT-a i kondenzacija kromatina u pripremi za dovršenje prve mejotičke diobe. Nakon njezinog dovršenja i ulaska u metafazu II, sekundarna oocita zadržava stabilan metilom uz transkripcijsku represiju sve do oplodnje.

Iako je metilacija u većini stanica povezana s utišanom transkripcijom, taj odnos u oociti nije toliko nedvosmislen. Naime, hipermetilirane domene genoma oocite povezane su s aktivnom transkripcijom, dok su hipometilirane domene transkripcijski inaktivne (293,299). Razina transkripcijske aktivnosti mnogo bolje korelira s određenim histonskim modifikacijama, u prvome redu s H3K36me3 koja je obilno zastupljena

unutar hipermetiliranih domena genoma i obilježava transkripcijski aktivna tijela gena (303,304). Čini se kako DNMT3A i DNMT3L u oociti formiraju kompleks u kojem DNMT3L služi kao kofaktor katalitičke aktivnosti enzima DNMT3A (303). Dakle, samo DNMT3A posjeduje katalitički aktivnu domenu koja vezanjem uz ADD domenu istog proteina ostaje onesposobljena za pristup na DNA molekulu. Na taj način DNMT3A zauzima autoinhibitornu alosteričku konformaciju. Do promjene konformacije dolazi nakon prepoznavanja nemetiliranog H3K4 putem ADD domene, koju osim DNMT3A posjeduje i DNMT3L (295). Vezanje samo jedne od tih domena za spomenuti lizinski ostatak dovoljno je za oslobađanje i aktivaciju katalitičke domene. DNMT3A posjeduje dodatnu domenu, PWWP, koja prepoznaje H3K36me3 (305). Spomenuto je kako je H3K36me3 uz tijela gena u korelaciji s njihovom transkripcijom i vjerojatno je kako je upravo ovo prepoznavanje spomenute modifikacije od strane DNMT3A/DNMT3L kompleksa razlog hipermetiliranosti transkripcijski aktivnih dijelova genoma oocite (299).

Uz tipičan obrazac PTM, oocite sadrže i specifičan histonski linker, H1foo, koji se eksprimira u zreloj oociti od stadija germinalnog vezikula do dvostaničnog stadija u embriju (306). Ova varijanta

histona H1 potrebna je za maturaciju oocite, iako nije poznato ima li funkciju u oogenezi, i za rani razvoj embrija kada formira dekonenzirani oblik kromatina koji omogućuje epigenetsko reprogramiranje, a ako se eksprimira duže koči diferencijaciju embrionalnih stanica i održava ih u pluripotentnima (306,307). Još jedna histonska varijanta prisutna u oociti, iako ne specifična za nju, je H3.3 koji pokazuje korelaciju s *de novo* DNA metilacijom i, možebiti, je neophodna za taj proces, budući da pristup kompleksa DNMT3A/DNMT3L na DNA molekulu ovisi o njegovoj interakciji s histonskim repom H3 (308).

Histoni primarnih oocita karakterizirani su i visokim stupnjem ukupne acetilacije, koja iako slabi s maturacijom oocite, ipak ostaje na relativno visokoj razini (309). Ukupna acetilacija upućuje na transkripcijsku aktivnost, dok je konkretna acetilacija histona H4 važna za organizaciju viših razina strukture kromatina i posredno regulaciju transkripcije. Naime, H4K16ac inhibira vezanje enzima ACF (engl. *ATP-dependent chromatin-assembly factor*), koji regulira jednolik razmak između nukleosoma i posljedično kompakciju kromatina, pridonoseći tako održavanju relaksiranog i dekonenziranog kromatina (310). Međutim, redukcijom ukupne razine acetilacije histona s maturacijom oocite,

enzim HDAC2 deacetilira H4K16 te tako omogućuje kondenzaciju kromosoma i njihovu pravilnu segregaciju, odnosno pravilni završetak prve, a kasnije i druge, mejotičke diobe (311).

Dakle, genom primarne oocite je tijekom mejotičkog aresta prvotno dekonenziran formirajući tzv. *non-surrounded nucleolus*, NSN (312). U pripremi za dovršenje prve mejotičke diobe kromocentri, mase heterokromatina građene od pericentromernih regija DNA i proteina, nakupljaju se oko nukleolusa poput prstena formirajući tzv. *surrounded nucleolus*, SN. Organiziranje genoma u SN praćeno je opsežnim PTM histona, poput spomenute deacetilacije H4K16, ali i metilacije H3K9, H3K27me3 i ubikvitinacije H2A, koje su obilježja utišane transkripcije i organizacije u heterokromatin (313).

### 3.2.3. Učinak epigenetičkih nepravilnosti tijekom gametogeneze na fertilitet

Mnogo je događaja, i mnogo različitih molekula koje u njima sudjeluju, čiji tijek kroz gametogenezu mora biti pravilno reguliran kako bi nastale gamete s normalnim epigenomom jer jedino takav omogućuje oplodnju i normalni razvoj ploda. Poneke nepravilnosti nisu od životnog značaja za plod, i takve dovode do sindromskih poremećaja ili do povećane

predispozicije za određene bolesti u odrasloj dobi. Do poremećaja epigenetičkih modifikacija mogu dovesti i endogeni i egzogeni čimbenici. O egzogenim, odnosno okolišnim čimbenicima, bit će riječ kasnije, dok će ovdje biti razjašnjene posljedice na fertilitet prouzročene nedostatnom ili pretjeranom aktivnošću pojedinih molekula koje sudjeluju u epigenomskim modifikacijama. Budući da je epigenom rezultat zajedničkog djelovanja genoma i okoliša, uključujući i mikrookoliša u kojem se stanica razvija, njegove promjene mogu biti generirane i mutacijama unutar samog genoma (294,314).

### Nepravilnosti DNA metilacije

DNMT1 enzim odgovoran je za održavanje metilacije tijekom replikacije DNA. Budući da su gamete stanice koje se ne dijele, gubitak funkcije tog enzima ne ometa sposobnost oplodnje, ali zato drastično utječe na razvoj ploda *in utero* (297). U muških miševa *knock-out* gena *Dnmt1*, ili mutacija koja rezultira gubitkom njegove funkcije, ne sprječava oplodnju, ali rezultira globalnom hipometilacijom genoma embrija s ekspresijom oba alela gena čije je utišavanje na jednom roditeljskom kromosomu neophodno za normalan razvoj (315). Nadalje, izostaje i utišavanje retrotranspozona čime se

narušava stabilnost genoma (316). Ti embriji pokazuju izuzetnu ograničenost ranog intrauterinog rasta i nisu povezani sa živorođenosti (317). Isto se događa i u ženskim *knock-out* modelima – gDMR regije oocite nisu promijenjene, iako globalna razina metilacije jest nešto manja. Razlog tome je što DNMT1o, specifična izoforma tog enzima koja se nalazi u oocitama, ima tek malu ulogu u metiliranju hemimetiliranih mjesta DNA tijekom maturacije oocite, a značajnu tek nakon fertilizacije, tijekom embrionalnog razvoja (297). Ako tada izostane aktivnost DNMT1o, diferencijalno utišavanje roditeljskih alela se ne održava i smrt nastupa u prenatalnom razdoblju.

*Knock-out* modeli za gen *Dnmt3a* karakterizirani su značajnim smanjenjem broja spermatoocita u testisima koje pokazuju gubitak očevih diferencijalno utišnutih gena (276). Nadalje, *knock-out* gena *Dnmt3a* i *Dnmt3b* rezultira dodatnim gubitkom metilacije na samo jednom lokusu, što govori o redundantnosti funkcije enzima DNMT3B (318). *Knock-out* gena *Dnmt3l* u mišjim testisima rezultira progresivnim gubitkom spermatogonija što u konačnici dovodi do azoospermije (319). Niti pretjerana ekspresija gena skupine *Dnmt3* nije bez štetnih posljedica – povezana je s razvojem embrionalnog karcinoma (320). U ženskim modelima, *knock-out* gena *Dnmt3b*

nema nikakvog utjecaja na oplodnju i razvoj ploda koji se rađa s normalnim fenotipom, dok gubitak funkcije *Dnmt3a* i *Dnmt3l* dovodi do znatnog gubitka metilacije unutar genoma oocite, s gubitkom metilacije unutar gDMR i nepravilnim utišavanjem gena u embriju što rezultira letalitetom u periodu ranog embrionalnog razvoja (E9.5-E10.5) (321). Pri tome gubitak funkcije *Dnmt3l* rezultira letalnijim fenotipom, vjerojatno kao posljedica sposobnosti DNMT3L da veže i DNMT3B i djelomično nadomjesti funkciju enzima DNMT3A, što govori u prilog redundantnosti tog enzima i u oocitama (319).

Brojni poremećaji metilacije u ljudi povezani su s defektnom spermatogenezom. Primjerice, hipermetilacija promotora gena *MTHFR* dovodi do redukcije enzimske aktivnosti njegovog produkta i nalazi se s većom učestalosti u muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom i idiopatskom neplodnosti (322). Spomenuta hipermetilacija često je u neplodnih muškaraca udružena s gubitkom metilacije utišnutog gena *H19* (323). Hipermetilacija promotora *VDAC2* gena (engl. *voltage-dependent anion-selective channel protein 2*) smanjuje pokretljivost spermija i rezultira idiopatskom astenozoospermijom (324). Neki poremećaji metilacije genoma spermija neće rezultirati njegovom nesposobnosti za oplodnju, ali su povezani s

tumorigenezom. Tako hipermetilacija promotora odgovornih za regulaciju transkripcije tumor supresor gena vodi njihovom utišavanju i razvoju testikularnih tumora zametnih stanica, dok je utišavanje promotora koji reguliraju piRNA transkripciju povezano s razvojem testikularnog karcinoma (325,326).

Metilom oocite specifičan je zbog svog bimodalnog obrasca u kojem se izmjenjuju domene hipermetilacije i hipometilacije. Takav obrazac metilacije narušen je delecijom STELLA proteina, čija je uloga zaštita genoma od metilacije (327). Gen *Stella* specifičan je za primordijalne zametne stanice, njegova se ekspresija održava u oociti tijekom njezinog rasta i u zigoti nakon oplodnje gdje regulira epigenetsko reprogramiranje (328). U zigoti se genom očevog pronukleusa selektivno demetilira, dok su majčin pronukleus i neki utišnuti geni oca zaštićeni od demetilacije STELLA proteinom. On prepoznaje i veže H3K9me2, bogat u genomu majke, i štiti 5-metilcitozin od oksidacije u 5-hidroksimetilcitozin (329). Genom oca siromašan je H3K9me2 i gusto pakiran s protaminima, zbog čega ga STELLA ne prepoznaje, osim u područjima lokusa utišnutih gena koji su obilježeni ovom histonskom modifikacijom i tako zaštićeni od rane demetilacije još u tijeku spermatogeneze. *Knock-out* gena *Stella*

rezultira globalnom hipermetilacijom genoma oocite, sa čak dvostrukom razinom metilacije u odnosu na normalnu oocitu, pri čemu je i očuvana metilacija DMR. Međutim, zbog poremećaja epigenetičkog reprogramiranja kromatina tijekom prvih nekoliko dioba, smrt ploda nastupa u stadiju blastociste (327,328).

Brojne abnormalnosti metilacije gameta neće dovesti do smrti ploda, već do različitih sindromskih stanja. Ovakav ishod najčešće se opisuje uz nepravilno utišavanje alela nasljeđenog od jednog roditelja koje je karakteristično za tzv. *imprinted* (utisnute, utišane) gene. Ti geni se obično grupiraju na kromosomu i dijele zajedničku regulatornu regiju DMR (engl. *differentially methylated region*). Abnormalna hipermetilacija očeve DMR gena *H19* i/ili hipometilacija majčinog alela *KvDMR1* rezultira Beckwith–Wiedemannovim sindromom ploda (330). S druge strane, hipometilacija očevog alela *H19-DMR* uzrokuje Silver–Russellov sindrom (331).

#### Poremećaji histonskih modifikacija

Posttranslacijske modifikacije histona drugi su bitni mehanizam epigenetičke regulacije čije nepravilnosti imaju štetne posljedice na plodnost, embrionalni razvoj i zdravlje ploda jer za



posljedicu imaju nepravilnu kondenzaciju kromatina.

U čovjeka bi gubitak aktivnosti LSD1/KDM1, histonske demetilaze specifične za H3K4 i H3K9, mogao biti povezan s apoptozom spermija i sterilitetom (332). Na mišjim modelima je pokazano da je promjena dimetilacijskog statusa H3K9 povezana s inhibicijom spermatogeneze (333), a gubitak aktivnosti MLL2, histonske metiltransferaze specifične za H3K4, s redukcijom u broju spermatoocita zbog indukcije apoptoze (334). Slično se događa i u ženskim modelima. Naime, *knock-out* gena *Mll2* u oociti rezultira izostankom njezine ovulacije i odumiranjem prije fertilizacije (335).

Za regulaciju dinamičnih promjena kromatina u tijeku spermatogeneze važna je i histonska varijanta H3.3. Naime, *knock-out* mišji modeli za gen *H3f3b*, što je samo jedan od gena koji kodira za tu histonsku varijantu, rezultirali su smanjenjem H3.3 u kromatinu, promijenjenim histonskim PTM-a i promijenjenom ekspresijom gena, uglavnom onih koji su uključeni u spermatogenezu (336). Nadalje, isto istraživanje zabilježilo je i redukciju protaminske ugradnje u kromatin, što je u kombinaciji s ostalim modifikacijama epigenoma dovelo do nekvalitetne kondenzacije kromatina u spermijima. Fenotipski su se ove modifikacije očitovale

apoptozom spermatogonija i spermatoocita, smanjenim testikularnim volumenom, abnormalnom morfologijom spermija i infertilitetom.

Histonska varijanta H3.3 važna je i za modulaciju kromatina u oocitama i njezina ekspresija korelira s DNA *de novo* metilacijom. Pretpostavka je da upravo putem histonskog repa H3.3 kompleks DNMT3A/DNMT3L pristupa na DNA molekulu (337). Oocite miševa koje ne posjeduju H3.3 *chaperone* HIRA pokazuju globalnu DNA hipometilaciju, uključujući i gubitak metilacije na DMR utisnutih gena (338). Oplodnjom takve oocite ne razvija se vijabilni plod, već smrt nastupa neposredno nakon oplodnje. Prisutnost H1foo, veznog histona specifičnog za oocitu, važna je za indukciju gena pluripotencije u zigoti. *Knock-down* gena *H1foo* u mišjim modelima inducira čvršću kromatinsku strukturu pronukleusa i ometa transkripciju gena važnih za život zigote (339).

Aberantna acetilacija H4K12 unutar promotora utisnutih gena važnih za embrionalni razvoj indikator je nekvalitetne kompaktacije kromatina u stanicama spermija (340). Naime, ona dovodi do poremećaja relaksacije kromatina u spermijima koja se održava i u zigoti i rezultira arestom već u prvoj diobi. Aberacije u histonskim modifikacijama smatraju se i mogućim uzrokom bolesti u ploda (341). Primjer za to

je Rubinstein-Taybijeve sindrom, koji u 50% slučajeva nastaje kako posljedica mutacije *CREBBP* (engl. *CREB binding protein*), čiji se produkt veže za CREB transkripcijski faktor i ima funkciju koaktivatora transkripcije, koja ovisi o njegovoj intrinzičnoj HAT domeni (342,343). Prema tome, u patogenetskoj podlozi sindroma je poremećaj epigenetskog mehanizma acetilacije histona – aktivirani transkripcijski faktor CREB, i uz njega vezani koaktivator transkripcije CREBBP, vežu se za specifične genske promotore unutar kojih HAT domena CREBBP acetilira histone, relaksira kromatinsku strukturu i tako igra ključnu ulogu u aktivaciji transkripcije.

Epigenetički mehanizmi međusobno su ovisni pa tako određene neprimjerene histonske modifikacije mogu dovesti do poremećene DNA metilacije na tom dijelu kromatina i posredno do poremećene ekspresije gena. Lokusi koji se metiliraju u kasnijim fazama maturacije oocite zahtijevaju demetilaciju H3K4me2 i H3K4me3 kako bi se omogućio pristup DNMT3A/DNMT3L kompleksa (303). Katalizatori te reakcije su demetilaze, KDM1A (H3K4me1/2 i H3K9me2 demetilaza) i KDM1B (H3K4me1/2 demetilaza), pri čemu značajniju ulogu igra KDM1B koji se eksprimira u kasnijim fazama rasta oocite (344). Izostanak njegove

aktivnosti, a u manjoj mjeri i aktivnosti KDM1A, rezultira izostankom demetilacije H3K4, blažim gubitkom metilacije na razini cijelog genoma, ali specifičnom hipometilacijom određenih lokusa. *Knock-out* modeli za gen *Kdm1a* pokazuju gubitak metilacije DMR gena *Gnas1a* i *Cdh15* u oociti i arest ploda na dvostaničnom stadiju (345). Slično se događa i u *knock-out* modelima za gen *Kdm1b*, gubi se metilacija kasno metiliranih DMR i smrt nastupa u ranom embrionalnom periodu (E10.5) (344).

Slično se događa i kao posljedica gubitka aktivnosti HDAC1 i HDAC2, što je pokazano na mišjim oocitama. Ti enzimi moduliraju kromatinsku strukturu i osiguravaju pristup na DNA molekulu, bez čega je njezina metilacija nemoguća (303). *Knock-out* modeli gena *Hdac1* i *Hdac2* pokazuju globalni gubitak metilacije i potpuni gubitak metilacije DMR svih utisnutih gena, zbog čega se oocita ne razvija i do ovulacije ne dolazi (346). *Knock-out* tih gena na razini embrionalnih matičnih stanica rezultira abnormalnostima diobenog vretena, nepravilnom kromosomskom segregacijom i apoptozom stanica (347).

SETD2 je H3K36me3 metiltransferaza, karakteristična za stanice sisavaca, koja je esencijalna za spermatogenezu i oogenezu (348).

H3K36me3 služi kao marker za HDAC enzime koji deacetiliraju histone i sprječavaju nekontroliranu transkripciju. *Knock-out* gena *Setd2* u zametnim stanicama testisa rezultira defektnom spermiogenezom, abnormalnom morfologijom akrosoma i infertilitetom (349). U oociti, deplecija H3K36me3 rezultira dramatičnom redistribucijom metilacije, tako da hipermetilirane domene postaju hipometilirane i obrnuto, a metilacija DMR se u potpunosti gubi. Takva oocita sposobna je za oplodnju, ali smrt ploda nastupa već u preimplantacijskom razdoblju (350).

Zamjena histona protaminima nije primjer histonskih PTM, ali je izuzetno važan epigenetički mehanizam regulacije genoma spermija jer upravo o tim proteinima zavisi pravilna kondenzacija kromatina u zrelih spermijima (284). Protamin 1 i protamin 2 eksprimirani su u pripližno podjednakim količinama, tako da omjer P1/P2 iznosi otprilike 1 (0.8-1.2 prema Aoki i sur. (351)) i važan je za plodnost. Abnormalno visok ili nizak omjer P1/P2 u ljudskim spermijima povezan je s većom učestalosti DNA fragmentacije i smanjenom plodnosti (352). Nadalje, redukcija u sintezi P1 i P2 uz niski P1/P2 omjer nalazi se u ejakulatu muškaraca s astenozoospermijom (353). Pokusi u miševima upućuju na to da protamini imaju

ulogu i nakon oplodnje (354). Abnormalno niske koncentracije P2, osim što uzrokuju membranske defekte, imobilnost spermija i neplodnost, dovode i do poremećaja tranzicije histona u protamine, koja korelira sa smanjenom stopom trudnoće i povezana je s embrionalnim letalitetom.

### Poremećaji ncRNA

Pravilna ekspresija miRNA i piRNA tijekom spermatogeneze potrebna je za normalan razvoj spermija (314). Naime, delecija gena *Dicer1* u zametnim stanicama rezultira smanjenjem testikularnog volumena, broja spermija i muškim sterilitetom (355). I poremećaji u ekspresiji samo jedne ili nekoliko ncRNA imaju štetne posljedice na mušku reproduktivnu funkciju. Tako pretjerana ekspresija E2F1 transkripcijskog faktora uzrokuje povećanu ekspresiju miR-449a/b čime se izaziva apoptoza spermatocita i testikularna atrofija (356). S druge strane, gubitak ekspresije miR-449a/b može uzrokovati oligoastenozoospermiju (357).

Sinteza miR-122 u spermatidama sudjeluje u post-transkripcijskoj regulaciji sinteze tranzicijskog proteina 2. U slučaju da je njezina sinteza nedostatna, spermiogeneza će biti defektna. Utišavanje ove miRNA primjećuje se u muškaraca s astenozoospermijom i

oligoastenozoospermijom, ali i onih s azoospermijom (358,359). Dodatno, cijeli je niz miRNA molekula čija je ekspresija neophodna za normalnu regulaciju spermatogeneze (miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, miR-513a-5p). Znatna redukcija tih miRNA nalazi se u muškaraca s azoospermijom, a pretjerana ekspresija u muškaraca s astenozoospermijom (359).

### 3.3. Epigenetička zbivanja tijekom starenja gameta i fertilitet

Reproduktivna sposobnost čvrsto je vezana uz neizbježni proces starenja. Ovaj odnos desetljećima se ističe u kontekstu ženskog reproduktivnog kapaciteta, što je i razumljivo s obzirom na raniji i iznenadniji gubitak te sposobnosti već nakon 35. godine života (360). Kod muškaraca, s druge strane, učinak starenja na smanjenje reproduktivne funkcije postaje vidljiv kasnije tijekom života, ima blaži tok i znatnu interindividualnu varijabilnost (361). Međutim, starenje je proces koji započinje od trenutka postizanja reproduktivne zrelosti, nastavlja se sa dobi, te vodi postepenom slabljenju i konačno slomu funkcija, a ne zaobilazi niti jednu stanicu organizma. Prošlo je više od dvadeset godina otkako je taj proces prvi puta povezan s epigenetičkim zbivanjima (362),

a ta povezanost je toliko konstantna da je konstruirano nekoliko 'epigenetičkih satova' koji omogućuju procjenu kronološke dobi na temelju epigenomskog obrasca stanica (363,364). I gamete čovjeka stare i sa starenjem akumuliraju epigenetičke alteracije koje se odražavaju na njihovu funkcionalnost, ali i na kvalitetu ploda (365,366). Prema tome, epigenetski učinci starenja u gametama jedan su od mogućih uzroka smanjene plodnosti i neplodnosti koja se opaža sa dobi.

Iako se često naglašava trend odgode majčinstva u Zapadnim društvima, isti se primjećuje i među očevima. Statistika Velike Britanije pokazala je da se u periodu od 1993. do 2003. godine udio očeva starih 35-54 godine povećao s 25% na 40% ukupno rođene djece, dok je shodno tome udio očeva <35 godina pao sa 74% na 60% sve novorođenčadi (367). Starija dob oca povezana je sa smanjenim fekunditetom i dužim vremenom do začeca, smanjenom kvalitetom sjemena, većom učestalosti kromosomskih abnormalnosti i točkastih mutacija, promjenom epigenomskog obrasca i učestalijom fragmentacijom DNA (368–370). Uz to, viša očinska dob pozitivno korelira s pojavnosti određenih neuropsihijatrijskih bolesti u potomka, u prvome redu shizofrenije (371), bipolarnog poremećaja (372) i autizma (373). Dapače, pojavnost autizma pokazuje i korelaciju s

dobi djeda, što govori u prilog transgeneracijskog nasljeđivanja epigenetskih alteracija (374). Iako se učestalost pobačaja, smrti *in utero* i prijevremenog poroda češće povezuje s faktorom majke, epidemiološke studije pokazuju njihovu korelaciju i sa starijom dobi oca (375).

Genom spermija sa starenjem zahvaćaju opsežne modifikacije na razini DNA metilacije, koje akumulacijom stvaraju metilomski obrazac u kontrastu s pomjenama primjećanim u somatskim stanicama. Naime, genom spermija sa starenjem pokazuje globalnu hipermetilaciju s lokaliziranim regijama hipometilacije (376). Jenkins i sur. (376) pronašli su da se među regijama koje pokazuju alteraciju metilacije sa starenjem, nalaze i geni vezani uz neuropsihijatrijske poremećaje (shizofrenija, bipolarni poremećaj, autizam). Tako su pokazali kako je *Drd4* gen, uključen u etiopatogenezu shizofrenije i bipolarnog poremećaja (377,378), cijeli hipometiliran u starosti. Međutim, nije jasno jesu li modifikacije metiloma i točkaste mutacije međusobno neovisne ili ovisne i, ako jesu, u kojoj mjeri. Promjene povezane sa starenjem česte su u subtelomernim regijama (379), a upravo su ove regije jedne od rijetkih koje izbjegavaju proces epigenetičko reprogramiranja nakon oplodnje i u primordijalnim zametnim

stanicama, omogućujući tako prijenos promjena stečenih starenjem na iduću generaciju (380). Metilacijske promjene povezane sa starenjem su izuzetno dosljedne i u spermijima, što je omogućilo kreiranje regresijskih modela za predikciju kronološke dobi muškarca upravo na temelju metiloma spermija, s točnošću od 94% (381).

Uz promjene metilacije, starenjem spermija uočavaju se i određene kromatinske modifikacije, iako je njihov opseg i značaj slabije razjašnjen. Pokusima u miševima, pokazalo se da starenjem opada koncentracija H2A varijante, TSEG-1, odgovorne za indukciju apoptoze spermatogenih stanica, što dovodi do nakupljanja defektnih spermija s posljedičnim smanjenjem oplodnog kapaciteta (382). Nadalje, iako tijekom spermatogeneze dolazi do opsežne zamjene histona protaminima, s ciljem kompakcije kromatina u glavi spermija, ipak 10-15% DNA ostaje vezano u nukleosomima i dostupno za transkripciju (383). Zadržavanje histona opaža se uz promotore razvojnih gena, gena koji kodiraju za miRNA i uz utisnute (engl. *imprinted*) gene. K tome, regije koje zadržavaju histone često sadrže i aktivirajuće i inaktivirajuće histonske modifikacije, H3K4me3 i H3K27me3, formirajući bivalentni kromatin (285). Cjelogenomska analiza ChIP-Seq

mišjih spermija pokazala je smanjenje H3K27me3 sa starenjem, dok je H3K4me3 modifikacija ostala jednako zastupljena (384). Ovakve promjene u spermatogonijskim zametnim stanicama za posljedicu imaju smanjenjen broj gena vezanih uz bivalentne modifikacije. Međutim, biološki učinak ove alteracije u čovjeka nije razjašnjen.

Dakle, starenjem organizma, stare i spermatogonije te nakupljaju epigenetske alteracije koje se mejozom prenose na spermije. Adekvatan epigenom spermija nužan je za njihovu funkcionalnost i oplodnu sposobnost, rani razvoj embrija i zdravlje potomka.

Viša dob majke povezana je sa smanjenom ovarijskom rezervom i lošijom kvalitetom oocita što se ogleda u većem riziku od spontanog pobačaja i mrtvorodenosti, kao i u većoj učestalosti kromosomskih aberacija i fetalnih malformacija (385,386). Ovakvi klinički ishodi uzročno se povezuju s abnormalnostima mejotičke diobe, s aberantnom homolognom rekombinacijom i segregacijom kromosoma zbog deplecije kohezina i nestabilnosti mejotičkog vretena sa starenjem (387,388). Uz to, kao stanica koja se ne dijeli, već se nalazi u mejotičkom arestu, oocita s vremenom postaje podložna akumulaciji oštećenja DNA molekule, koja bi u tijeku replikacije dovela do

zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze. Razlozi smanjene produkcije nekih proteina, uključujući i enzima, u oociti sa starenjem nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se sa otkrićem uloge epigenoma u procesu starenja, sve više ističe potencijalna uloga epigenetičkih modifikacija s učincima gubitka kohezina, disfunkcije kinetohora i smanjene produkcije enzima odgovornih za popravak DNA molekule. Literatura o epigenetskim procesima starenja oocite mnogo je siromašnija od one o spermijima, međutim, neke promjene povezane sa starenjem jesu potvrđene.

Čini se kako oocita sa starenjem, za razliku od spermija, podliježe alteraciji metiloma nalik na onoj u somatskim stanicama. Iako nedostaje definitivni dokaz usporedbe metilacije u oocitama mlađih i starijih žena, postoje dokazi koji navode na zaključak da je genom oocite sa starenjem podložan globalnoj hipometilaciji, uz moguće postojanje regija hipermetilacije, kao što je slučaj i u somatskim stanicama. Naime, u mišjim oocitama Yue i sur. (389) zabilježili su smanjenje metilacije sa starenjem, uz smanjenu ekspresiju svih DNMT enzima. Iako isto nije pokazano za čovjeka, ipak je u starijih žena pronađena smanjena ekspresija *TAP73*, za koju se zna da je regulirana upravo DNA metilacijom. U ljudskim granulosa stanicama Yu i sur. (390) pronašli su hipometilacija onih regija

koje su u mlađoj dobi slabije metilirane i hipermetilacija brojnih regija koje u mlađih žena već posjeduju gušću metilaciju. Nadalje, u mišjim oocitama pronađena je i povećana ekspresija *TET* (391), što navodi na zaključak da bi globalna hipometilacija starijih oocita mogla biti posljedica slabije metilacije i intenzivnije demetilacije.

Nadalje, sa starenjem u mišjim oocitama dolazi do smanjenja ekspresije HDAC, enzima koji sudjeluju u globalnoj deacetilaciji histona pri kraju maturacije oocite te u transkripcijskoj represiji tijekom njezinog aresta u metafazi II (392). Nadalje, potpuna inhibicija HDAC u mišjim oocitama dovodi do aneuploidije ploda (393). Uz izraženiju acetilaciju, oocite starijih miševa pokazuju i gubitak metilacije histona (H3K9me3, H3K36me2, H3K79me2, H4K20me2) (394). U teoriji, gubitak H3K9me3 u centromernim i telomernim regijama mogao bi dovesti do poremećaja kromosomske segregacije uz posljedičnu aneuploidiju ploda. Osim životinjskih dokaza, postoje potvrde promjena u histonskim PTM-a sa starenjem i kod ljudi. Naime, pokazano je starenje ima nepovoljan učinak na deacetilaciju H4K12 tijekom metafaze II te da je povezano s povećanom ekspresijom više deubikvitinaznih gena (395,396).

Tijekom maturacije oocite sintetiziraju se brojne RNA molekule, od

kojih neke oocita iskorištava za vlastite stanične procese, a neke su neophodne za rani život i razvoj zigote prije aktivacije embrionalnog genoma. Za pravodobnu translaciju genske poruke u proteine, zadužena je regulacija miRNA molekulama. One prepoznaju sebi komplementarnu mRNA molekulu i prijeće inicijaciju translacije, a među miRNA sintetiziranim u oociti su one koje kontroliraju ekspresiju gena pluripotencije i gena potrebnih tijekom ranog embrionalnog razvoja kao i onih koji kodiraju za proteine s ulogom kromatinskog remodeliranja. Battaglia i sur. (397) pokazali su da se u oociti čovjeka starenjem mijenja ekspresija 12 miRNA molekula, što uključuje i povećanu sintezu miR-29a-3p i miR-203a-3p. Povećana prisutnost tih miRNA molekula u mišjim oocitama korelira sa smanjenom ekspresijom *DNMT3A* i *DNMT3B*.

Starenjem oocita akumulira oštećenja DNA molekule (398). Za popravak tih oštećenja odgovorno je nekoliko skupina enzima, od kojih su za raspravu o epigenetskim modifikacijama bitni enzimi za popravak dvolančanih lomova DNA (engl. *DNA double strand break repair*). Pojava dvolančanih lomova DNA normalna je u tijeku mejotičke rekombinacije, nakon koje slijedi njihov popravak spomenutim enzimima. Jedan od tih enzima je i BRCA1, koji uz popravak

DNA ima dodatne uloge sudjelovanja u formiranju diobenog vretena i u kontroli segregacije kromosoma u kontrolnoj točki u metafaza-anafaza prijelazu (eng. *metaphase-to-anaphase transition, the spindle assembly checkpoint – SAC*) (399). Tendencija akumuliranja dvolančanih lomova sa starenjem povezana je sa smanjenom ekspresijom *BRCA1*, koja postaje naglašena nakon 36. godine života (400). Mehanizam smanjenja ekspresije *BRCA1*, ali i *ATM* i mnogih drugih uključenih u mehanizam popravka DNA nije u potpunosti razjašnjen, ali se epigenetski mehanizmi utišavanja nameću kao mogući posrednik (401). Naime, pokazano je kako je ekspresija *ATM* podložna modifikaciji metilacijom proksimalnog promotora tog gena (402), dok čimbenici poput hipoksije dovode do utišavanja transkripcija *BRCA1* posredovanjem histonskih PTM-a (403).

### 3.4. Promjene epigenoma inducirane egzogenim čimbenicima i fertilitet

Sa postizanjem reproduktivne zrelosti započinje se generativno razdoblje u životu čovjeka. Ključni događaj tog razdoblja je stvaranje funkcionalnih gameta. Spermiji se produciraju svakodnevno, iako im je kompletni regeneracijski period oko 72 dana, koliko traje spermatogeneza u čovjeka

(404), dok se jajna stanica stvara jednom mjesečno, rastom i sazrijevanjem primarne oocite od primordijalnog folikula nadalje. U testisima su prospermatogonije zaustavljene u G0/G1 fazi staničnog ciklusa, s kompletno obnovljenim metilomom još od prenatalnog razdoblja (405). Suprotno tome, u folikulima jajnika, još od kasnog fetalnog razdoblja nalaze se primarne oocite zaustavljene u profazi I. mejotičke diobe, u diktiotonom stadiju, i gotovo u potpunosti lišene svog staničnog metiloma koji se obnavlja tek s rastom i razvojem oocite u kasnijim stadijima folikulogeneze (406). Oba procesa, spermatogeneza i oogeneza, praćeni su i dinamičnim promjenama histonskih PTM-a. Dakle, mnogo je koraka koji moraju biti skladno i pravovremeno orkestrirani kako bi nastale gamete s normalnim epigenomom, što je preduvjet za njihovu funkcionalnost, odnosno za sposobnost oplodnje i razvoj živog ploda. Izostanak potrebnih epigenetičkih modifikacija ili pojavnost suvišnih, mijenja ekspresiju gena gameta i vodi smanjenju njihove kvalitete ili čak njihovoj potpunoj nefunkcionalnosti. Čimbenici koji dovode do promjena epigenoma mogu biti endogeni i egzogeni.

U kontekstu onoga što čovjek može učiniti za vlastito zdravlje, pa tako i zdravlje reproduktivnog sustava, treba naglasiti važnost egzogenih čimbenika na epigenom.



Upravo tako nastale epigenomske alteracije predstavljaju most između čimbenika okoliša i staničnog genoma, što će u konačnici uvjetovati funkcionalnost gameta. Uz to što se promjene staničnog epigenoma ogledaju u funkcije same stanice, epigenomske alteracije u gametama prenose se i na potomstvo i time oblikuju kvalitetu zdravlja iduće generacije, njezinu predispoziciju različitim bolestima i reproduktivnu sposobnost (407). Među najčešće spominjanim okolišnim čimbenicima s negativnim učinkom na reprodukciju su pušenje, alkohol, nedostatna tjelesna aktivnost i nepravilna prehrana, stres i toksini poput dietilstilbestrola i endokrinih disruptora (407–409).

#### 3.4.1. Pušenje

Prema Istraživanju o uporabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske iz 2015. godine (410) 31,1% stanovništva puši, od čega većina svakodnevno. Pri tome je među muškarcima 35,3% pušača, a među ženama 27,1%. Ako se učestalost pušenja promatra po dobnim skupinama, tada se primjećuje da je najviši udio pušača upravo među reproduktivno sposobnom populacijom od 25 do 44 godine, i iznosi 38,9%. Ovakva statistika Republiku Hrvatsku smješta iznad europskog prosjeka.

Povezanost pušenja i smanjene plodnosti konstantna je kroz literaturu i statistički značajna, iako u većini studija snaga dokaza nije vrlo jaka, a i specifičnost je nesigurna zbog nedostatka kontrole nad čimbenicima zabune (411). Međutim, brojne studije su pokazale da je spomenuti učinak ovisan o dozi, tako da učestalije pušenje korelira s progresivnim slabljenjem reproduktivne funkcije (412,413), što podržava i podatak o reverzibilnosti tog učinka s prestankom pušenja (414).

Pušenje majke povezano je s oslabljenim fekunditetom, tako da je udio žena s odgodom do koncepcije iznad 12 mjeseci čak 54% veći u skupini pušačica nego nepušačica (415). Nadalje, izgledno je da pušenje ubrzava i depleciju ovarijskih folikula, što je podržano podacima da menopauza kod pušačica nastupa u prosjeku 1-4 godine ranije nego kod nepušačica (416) te da žene koje puše imaju niže koncentracije AMH i zahtijevaju više doze gonadotropina za ovarijsku stimulaciju u tijeku asistirane reprodukcije (417). Ne samo što pušenje smanjuje mogućnost uspješne oplodnje, već ima i negativne posljedice na sami tijek i ishod trudnoće. Naime, ono je povezano s učestalijim spontanom pobačajima u ranom tijeku trudnoće (418), s placentalnom insuficijencijom (419), restrikcijom embrionalnog i fetalnog rasta te smrti *in*

*utero* (420). Pušenje korelira i s pojavom bakterijske vaginoze koja se pak dovodi u vezu s pobačajem u tijeku drugog trimestra i s prijevremenim porodom (421), te s povećanom incidencijom ektopične trudnoće (422,423). Pušenje majke pokazuje dodatni negativni učinak na muški plod, dočim kod oca pušača spomenuti efekt izostaje. Naime, danska epidemiološka studija (424) povezala je poremećaj sjemenih parametara, u prvome redu smanjenje broja spermija i gustoće sperme muške djece čije su majke pušile više od 10 cigareta na dan.

Kod muškaraca je pušenje povezano sa smanjenom kvalitetom sjemena – padom gustoće spermija, smanjenim motilitetom, životnim vijekom i antioksidativnom aktivnosti te potencijalnim štetnim djelovanjem na morfologiju spermija. Ovaj učinak ovisan je o dozi, a povezuje se s aktivnim i pasivnim pušenjem (425).

Cigaretni dim sadrži preko 7000 različitih kemijskih spojeva, od kojih je 69 poznatih kancerogena. Mnogi od tih spojeva (nikotin, policiklički aromatski ugljikovodici, teški metali) povezani su sa štetnim djelovanjem na stanice, uključujući i gamete (426). Mehanizmi njihovog djelovanja na različite aspekte reprodukcije nisu u potpunosti razjašnjeni i izgledno je da jesu multipli, a vrlo vjerojano i međusobno povezani. Epigenetičke modifikacije gameta

i somatskih stanica unutar gonada su mogući konačni cilj djelovanja različitih endokrinih, parakrinih i autokrinih signalnih putova pokrenutih sastojcima iz duhanskog dima (425). Te modifikacije mnogo su bolje ispitane za spermije, tako da će o tim dokazima ovdje i biti riječ.

Metilom spermija je karakteriziran hipometilacijom gena čiji produkti sudjeluju u spermatogenezi i ranom embrionalnom razvoju (427). Predložene su dvije teorije za objašnjenje nastanka metilacijskih promjena kao posljedica pušenja (428). Prva teorija temelji se na regrutiranju DNA metiltransferaza na mjesta oštećenja DNA molekule nastala zbog direktnog vezanja sastojaka cigaretnog dima, a druga alteraciju DNA metilacije dovodi u vezu s hipoksijom uzrokovanom ugljikovim monoksidom iz cigaretnog dima.

Joubert i sur. (429) proveli su meta-analizu povezanosti pušenja majke u tijeku trudnoće i DNA metilacije u novorođenčadi, kroz 13 kohorti, i identificirali gotovo 3000 CpG dinukleotida unutar gena čiji se metilacijski status u novorođenčadi majki koju su pušile tijekom trudnoće razlikuje od onih koje nisu. Među genima koji su pokazali promjenu metilacije u vezi s pušenjem majke su *BMP4*, vezan uz orofacijalne rascjepe, *PRDM8*, H3K9-specifična metiltransferaza, *DLGAP2*, uključen u organizaciju sinapsi i

molekularne signalne putove unutar neurona, i još 24 druga gena.

Usporedba metilacijskog statusa kontrolnih regija *SNRPN* i *H19* gena plodnih i neplodnih muškaraca pokazala je da povezanost promjena njihove metilacije s neplodnošću (430). Upravo je pušenje predloženo kao rizični faktor za hipometilaciju *H19* i hipermetilaciju *SNRPN* pronađenu u skupini neplodnih muškaraca. Cjelogenomska analiza koju su proveli Jenkins i sur. (431) pokazala je asocijaciju pušenja i globalnog porasta metilacije u genomu spermija, a istom analizom su Laqqan i sur. (432) pronašli značajnu razliku u metilaciji nekoliko CpG dinukleotida između pušača i nepušača, od kojih se neke nalaze unutar gena *TKR* i *MAPK8IP3*, koji su povezani sa spermatogenezom. Istraživanje na miševima (433) pokazalo je da izloženost cigaretnom dimu uzrokuje porast metilacije uz transkripcijsko startno mjesto *Pebp1* gena, što smanjuje njegovu ekspresiju i uzrokuje nizvodnu inaktivaciju ERK signalnog puta s posljedičnim defektom spermatogeneze. Nije isključeno niti da pušenje posreduje hipometilaciju u spermijima. Naime, u mišjim testisima nikotin dovodi do povećane ekspresije gena za profilin 1 koji sudjeluje u regulaciji citoskeleta, a njegova hiperekspresija je povezana s

polimerizacijom aktina i promjenom pokretljivosti spermija (434).

Vrlo važan epigenetski događaj u tijeku spermiogeneze je zamjena većine histona protaminima, P1 i P2. Pušenje pokazuje korelaciju s abnormalnom zamjenom histona i s promjenom ekspresije mRNA za oba protamina u tijeku spermatogeneze (435). Pokazano je da pušenje ima negativan utjecaj na razinu P2 sa posljedičnim povećanjem P1/P2 omjera u skupini pušača, što ima negativne reperkusije na funkcionalnost muške gamete (436). Nadalje, omjer H2B prema ukupnim jezgrinim proteinima (histonima i protaminima) je u skupini neplodnih pušača viši nego u skupini neplodnih nepušača, a razina mRNA molekula čiji se kodovi transliraju u P1 i P2 značajno su niži u pušača (437). Ovi nalazi upućuju na ometanu zamjenu histona protaminima u pušača.

Pušenje mijenja i ekspresiju nekodirajućih RNA molekula, ncRNA. Dapače, nekodirajuće miRNA molekule smatraju se potencijalnim biomarkerima bolesti i stanja vezanih uz pušenje, a pridonose i procjeni faktora muške neplodnosti (438). Koristeći *miRNA microarray* analizu pronađena je različita ekspresija nekoliko miRNA kod pušača u odnosu na nepušače (358,439,440), pri čemu je ekspresija nekih bila povećana, a

nekih smanjena. Pri tome razina miRNA pokazuje negativnu korelaciju s razinom sebi komplementarnih mRNA molekula, što navodi na zaključak da pušenjem inducirana promjena u sastavu staničnih miRNA uzrokuje promjenu ekspresije mRNA u pušača. Mnoge od diferencijalno eksprimiranih miRNA u pušača pokazuju regulatornu ulogu u putovima odgovornim za normalnu kvalitetu spermija i rani embrionalni razvoj.

#### 3.4.2. Pretilost

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost veliki su javnozdravstveni problem modernog doba koji se povezuje s razvojem mnogih bolesti – kardiovaskularnih (uključujući infarkt miokarda i moždani udar koji su među vodećim uzrocima smrti), dijabetesa, mnogih malignih tumora, muskuloskeletnih bolesti, ali i s narušenjem mentalnog i reproduktivnog zdravlja (441). Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da više od 1,9 milijardi odraslih osoba pati od prekomjerne tjelesne težine i pretilosti. Situacija u Hrvatskoj nije ništa bolja nego u ostatku svijeta, već je, dapače, jedna od gorih u Europi. Od prekomjerne tjelesne mase i debljine u Republici Hrvatskoj boluje 57,4% odraslog stanovništva, 63% ukupne muške i 54% ženske populacije RH. Jasno je da je zbog

kombinacije jačine učinka i opsega zahvaćenosti globalni teret ove bolesti iznimno visok (442).

Usporedno porastu prevalencije pretilosti tijekom protekli desetljeća, prati se i progresivna redukcija kvalitete sjemenih parametara muškaraca (443). Smanjena sposobnost oplodnje u muškaraca s prekomjernom tjelesnom težinom i pretilosti povezana s većom prevalencijom oligozoospermije (koncentracija spermija u ejakulatu <15 milijuna po mL) i azoospermije (444). U usporedbi s muškarcima prikladne tjelesne težine, pretili muškarci imaju tri puta veću vjerojatnost oligozoospermije. Uz to i volumen ejakulata pokazuje negativnu korelaciju s indeksom tjelesne mase (445). Ovo je posljedica kompleksnih interakcija na razini cijelog organizma koje moduliraju aktivnost hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine. Naime, porast tjelesne težine praćen je hipertrofijom i hiperplazijom adipocita s posljedičnom povećanom produkcijom brojnih hormona i citokina. Povećava se koncentracija serumskog estradiola, što je posljedica konverzije testosterona djelovanjem enzima aromataze u masnome tkivu, i peptidnog hormona leptina (446). Oba hormona djeluju na KISS1 neurone *nucleus arcuatus* u hipotalamusu čija je funkcija sekrecija kisspeptina koji stimulira sekreciju GnRH (447). Estradiol na

spomenute neurone djeluje negativnom povratnom spregom, dok leptin potiče lučenje kisspeptina iz neurona *nucleus arcuatus*. Ti neuroni osim što imaju projekcije na GnRH neuronima, potičući njihovu sekreciju, imaju ih i na NPY neuronima, kočeci njihovu sekreciju i tako neuropeptidom Y posredovanu inhibiciju GnRH (448). Međutim, u pretilih ljudi razvija neosjetljivost na leptin, što također u konačnici dovodi do smanjenog lučenja kisspeptina i GnRH. Veći dio literature temeljen na opažajnim dokazima u ljudi i eksperimentalnim studijama na životinjama, povezanost pretilosti sa smanjenom plodnosti objašnjava upravo kroz djelovanje hormona leptina (449).

Dodatno, masa proupalnih citokina sintetiziranih u masnom tkivu negativno utječe na steroidogenezu u Leydigovim stanicama testisa, zbog ometanja aktivnost steroidogenog akutnog regulatornog proteina, StAR, koji je zadužen za unos molekula kolesterola u mitohondrije (450). U pretilih muškaraca promjenjena je i razina brojnih adipokina osim leptina. Primjerice, koncentracija serumskog adiponektina je u pretilih muškaraca povišena i recipročno povezana s koncentracijom serumskog kolesterola (451). Oreksin (hipokretin) jedan je od aktivatora enzima steroidogeneze u Leydigovim stanicama i stimulator produkcije testosterona (452), a

njegova je koncentracija u pretilih muškaraca snižena. Osim peptida secerniranih iz masnog tkiva, promjenjena je i sekrecija neuropeptida grelina iz probavnog sustava, koja je također povezana s poremećajem steroidogeneze i niskom koncentracijom serumskog testosterona (453). Istom učinku pridonosi i hiperinzulinemija usljed inzulinske rezistencije jer dovodi do smanjenja koncentracije SHBG (454).

Sve navedene promjene pridonose hormonskoj neravnoteži unutar pretilog organizma i rezultiraju promjenom mikrookoliša svih stanica pa tako i spermatogenih stanica unutar testisa. Ovakav mikrookoliš karakteriziran je visokom razinom upale i oksidativnog stresa, što vodi poremećaju kvalitete spermija koji se u njemu razvijaju. Spermiji pretilih muškaraca tako gomilaju veću količinu oštećenja DNA (455), nepravilno kondenziraju svoj kromatin (456) u tijeku spermatogeneze i posljedično imaju kompromitiran integritet genoma. Neki od gena koje zahvaćaju epigenetičke modifikacije u slučaju očeve pretilosti su *Meg3*, *Ndn*, *Snrpn* i *Sgce/Peg10*, koji reguliraju fetalni razvoj i rast tumora (457). Osim što takvi spermiji nose rizik za nepovoljni ishod oplodnje i trudnoće, povećavaju i rizik oboljenja potomka od pretilosti i metaboličkog sindroma,

neuroloških poremećaja i malignih tumora u odrasloj dobi, govoreći u prilog nasljeđivanja epigenomskih modifikacija stečenih u gametama pod utjecajem okolišnih čimbenika.

Klinički učinci pretilosti na reproduktivnu funkciju žena također su većinski posredovani modulacijom aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-jajnik i hiperinzulinemije (458,459). Iako određeni nalazi upućuju na mogućnost sudjelovanja epigenetike u promjeni kvalitete jajne stanice, ipak mogući mehanizmi nisu dovoljno istraženi. Primjerice, u pretilih žena također je promjenjen mikrookoliš u kojem sazrijeva oocita, što se vidi po povećanoj koncentraciji inzulina, triglicerida i markera upale kao što su laktat i CRP, u folikularnoj tekućini prilikom asistirane reprodukcije (460). Uz redukciju kvalitete oocite, i embriji dobiveni postupkom *in vitro* oplodnje pokazuju slabiji razvojni uspjeh (461). Naime, oocite žena prekomjerne tjelesne mase u tijeku IVF-a daju manji broj embrija koji se razvijaju nakon fertilizacije, a oni koji se razvijaju do stadija blastociste ipak pokazuju slabije preuzimanje glukoze u stanice, što ima negativan učinak na njihov rast i razvoj u ranoj embriogenezi. Nadalje, djeca pretilih žena imaju veći rizik oboljevanja od pretilosti, metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i

kardiovaskularnih bolesti u odrasloj dobi (462). Jedan od rijetkih podataka o mogućim specifičnim epigenetičkim modifikacijama povezanih s pretilosti je povećanje globalne razine metilacije u stanicama posteljice pretilih žena (463).

### 3.4.3. Struktura prehrane

Sam prehrambeni sastav igra bitnu ulogu u epigenetičkim modifikacijama genoma gameta (409). Taj učinak, međutim, nije direktan, već posredovan modulacijom aktivnosti enzima koji provode epigenetičke modifikacije DNA molekule i histona. Najupečatljiviji primjer toga je uloga folata u prehrani u prekonceptijskom i perikonceptijskom razdoblju (464). Naime, folna kiselina služi kao donor metilne skupine te igra esencijalnu ulogu u remetilaciji homocisteina u metionin, osiguravajući time dostatnu količinu S-adenozilmetionina, primarnog donora metilne skupine u većini bioloških reakcija metilacije. Uslijed nedostatka folata u razdoblju oko fertilizacije, zbog nedostatka metilnog donora SAM, dolazi do hipometilacije u području diferencijalno metilirane regije (DMR) *IGF2* gena, koji je nasljeđen od majke normalno metiliran i utišan (465). Nadalje, i kronično gladovanje majke za vrijeme trudnoće vodi hipokalorijskoj prehrani fetusa s

nedostatnom opskrbom hranjivim tvarima, što za posljedicu ima povećanu predispoziciju različitim bolestima u odrasloj dobi (koronarna bolest srca, hiperlipidemija, pretilost i druge) (466).

Epigenom oca također može biti moduliran prehranom i imati utjecaj na zdravlje budućih potomaka (467). Naime, niskokalorična prehrana oca još u djetinjstvu povezana je s nižim mortalitetom potomaka od kardiovaskularnih bolesti, dok je kalorijski suvišak čak i u prehrani djedova tijekom njihovog djetinjstva povezan s višim mortalitetom od te skupine bolesti (468). Sastav prehrane također igra bitnu ulogu. Dugotrajna prehrana bogata mastima u spermatidama miševa dovodi do značajnog smanjenja ekspresije *Sirt6* gena, koji kodira za NAD-ovisnu proteinsku deacetilazu, sirtuin 6 (469). Nadalje, prehrana muških miševa siromašna proteinima rezultirala je rađanjem potomaka s većom ekspresijom gena uključenih u sintezu lipida i kolesterola, što je dodatni dokaz za prijenos okolišem uzrokovanih epigenomskih modifikacija na potomstvo (470).

#### 3.4.4. Endokrini disruptori

Endokrini disruptori su kemijski spojevi koji ulaskom u organizam interferiraju s normalnom produkcijom,

sekrecijom i djelovanjem hormona, čime narušavaju homeostazu organizma (471). Toj skupini spojeva pripadaju bisfenol A (BPA), ftalati, poliklorirani bifenili (PCB), perklorat, ali i organoklorni i organofosfatni pesticidi i različiti zagađivači zraka, te brojni drugi. S obzirom na raširenu uporabu tih spojeva u različitim granama industrije i u agrikulturi, čovjek je njihovom djelovanju izložen na svakodnevnoj bazi. Drugim riječima, endokrini disruptori sastavni su dio okoliša u kojem čovjek živi i on ih unosi u organizam hranom, vodom, transdermalnim prijenosom i inhalacijom nanočestica iz onečišćenog zraka. Zabrinjavajuća je činjenica da je danas komercijalno dostupno preko 84 000 različitih kemijskih spojeva, od kojih njih 95% nema adekvatno ocijenjenu biosigurnost i učinak na reproduktivnu funkciju., a procjenjuje se da ih čak 70% nikada i neće biti ocijenjeno (472).

Endokrini disruptori povezani su s negativnim učinkom na reproduktivnu funkciju (473,474). U muškaraca su povezani s lošijom kvalitetom sjemena, smanjenom koncentracijom i brojem spermija, većom učestalosti morfoloških nepravilnosti, manjim udjelom viabilnih spermija. K tome pesticidi oštećuju i funkciju akcesornih spolnih žlijezda reducirajući tako volumen ejakulata i mijenjajući normalni pH prema više

alkalnim vrijednostima (475). Nadalje, djelovanje ovih spojeva povezuje se i s većom učestalosti kriptorhizma i testikularnog karcinoma (476).

Kod žena je reprotoksičnost endokrinih disruptora posljedica poremećene folikulogeneze (477). Izloženost žena BPA povezana je s razvojem sindroma policističnih jajnika (478) i endometrioze (479), a u postupku potpomognute oplodnje te žene pokazuju slabiji odgovor jajnika s razvojem manjeg broja antralnih folikula i oocita i nižim vrijednostima koncentracija estradiola kao odgovor na hiperstimulaciju s hCG (480). Ovakav odgovor jajnika rezultira manjom vjerojatnošću oplodnje i implantacije, a primijećeni su i učestaliji spontani pobačaji, prijevremeni porod i razvojne abnormalnosti fetusa.

Za većinu endokrinih disruptora poznato je kako interferiraju s hormonskom ravnotežom. To je prvenstveno djelovanje na receptore spolnih hormona estrogena i testosterona, koje može biti agonističko ili antagonističko, i izravna inhibicija enzima steroidogeneze. Međutim, opisani su i mehanizmi koji objašnjavaju kako djelovanjem tih spojeva dolazi do modifikacije genske ekspresije, riječ je o epigeneti modifikacijama DNA molekule koje su pokazane na razini genoma spermija.

Isti dokazi nedostaju za oocitu zbog njezine nedostupnosti (472).

Endokrini disruptori u organizmu generiraju slobodne radikale kisika i induciraju oksidativni stres unutar stanica, što na razini DNA molekule uzrokuje fragmentaciju, oksidaciju baza i stvaranje adukata (481). Baza najosjetljivija na oksidaciju je gvanin, pri čemu najčešće nastaje 8-oksogvanozin. Međutim, ona zahvaća i citozin, stvarajući 5- i 5,6-hidroksilcitozin, i metilcitozin. Oksidacijom metilcitozina nastaju 5-hidroksimetilcitozin i 5-formilcitozin, iste baze koje nastaju i procesom aktivne demetilacije TET enzimima. Dakle, oksidacija nemetiliranih CpG dinukleotida ometa metilaciju DNMT enzimima, dok oksidacija metiliranih CpG zapravo predstavlja demetilaciju (472). U svakom slučaju, oksidativni stres i oksidacija remete DNA metilaciju i regulaciju transkripcije. Potomci muškaraca čiji je metilom izmjenjen u smjeru hipometilacije oboljevaju od metaboličkog sindroma i dijabetesa u odrasloj dobi (468). Ovakav obrazac epigenetskih modifikacija genoma spermija zabilježen je u muškaraca s visokim koncentracijama ftalata u urinu (482). Pokusi na ženskim štakoricama, potvrđuju oštećenje ovarijske funkcije uz endokrine disruptore. Nadalje, istraživanja na štakorskom modelu pokazala su da izlaganje pesticidu metoksikloru (MXC) u



fetalnom i neonatalnom razdoblju oštećuje ovarijsku rezervu kroz hipermetilaciju CpG otoka unutar promotora *ERβ* gena u stanicama jajnika odraslih jedinki (483).

Navedeno upućuje na nepravilnosti DNA metilacije pod utjecajem endokrinih disruptora i oksidativnog stresa u muškim i

ženskim gametama, sa posljedičnim prijenosom epigenomskih modifikacija na potomstvo koje pokazuje veću tendenciju oboljevanja od pretilosti, dijabetesa, sindroma policističnih jajnika, poremećaja u nastupu puberteta i tumorigeneze.

#### 4. Zahvale

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc.Ani Katušić-Bojanac i Dajani Krsnik, mag.biol.exp. na pomoći u snalažnju ovom zanimljivom temom.

## 5. Literatura

1. Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM, ur. Williams Gynecology: Evaluation of the Infertile Couple. 3.izd. New York: McGraw-Hill Education; 2016
2. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem. 2018;62(March):2–10.
3. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. Andrologia. 2020;(March):1–15.
4. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Obstet Gynecol Surv. 1993;48(3):200–2.
5. Spingart C, Frapsauce C, Veau S, Barthélémy C, Royère D, Guérif F. Semen variation in a population of fertile donors: Evaluation in a French centre over a 34-year period. Int J Androl. 2012;35(3):467–74.
6. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. Environ Health Perspect. 2000;108(10):961–6.
7. Fung JN, Rogers PAW, Montgomery GW. Identifying the Biological Basis of GWAS Hits for Endometriosis1. Biol Reprod. 2015;92(4):1–12.
8. Jiang L, Jin J, Wang S, Zhang F, Dai Y, Shi L, et al. CFTR gene mutations and polymorphism are associated with non-obstructive azoospermia: From case-control study. Gene [Internet]. 2017;626:282–9. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.044>
9. Ren ZJ, Zhang Q, Ren PW, Yang B, Liu SZ, Liao J, et al. TP53 gene Arg72Pro polymorphism and male infertility risk: A meta-analysis. Andrologia. 2018;50(10):1–10.
10. Ren ZJ, Zhang YP, Ren PW, Yang B, Deng S, Peng ZF, et al. Contribution of MTR A2756G polymorphism and MTRR A66G polymorphism to the risk of idiopathic male infertility. Med (United States). 2019;98(51).
11. Ren ZJ, Ren PW, Yang B, Liao J, Liu SZ, Fang K, et al. The SPO11-C631T gene

- polymorphism and male infertility risk: A meta-analysis. *Ren Fail* [Internet]. 2017;39(1):299–305. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/0886022X.2016.1274661>
12. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*. 2017;91(2):265–84.
  13. Liew SC, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2015;58(1):1–10. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.10.004>
  14. Turnpenny PD, Ellard S, ur. Emeryeve osnove medicinske genetike. 7. izd. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2012
  15. Mäkelä J-A, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev*. 2019;40(4):857–905.
  16. Baetens D, Verdin H, De Baere E, Cools M. Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2019;33(3):101271. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.04.005>
  17. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014;10(11):673–83. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.163>
  18. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*. 1997;124(9):1653–64.
  19. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, et al. <Nature 2000 Akashi.pdf>. 2000;403(February).
  20. Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*. 1991;113(3):891–911.
  21. Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, et al. Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2015;17(2):178–94. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.014>
  22. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol*. 2000;14(7):1053–63.

23. Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y. The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. 39.
24. Barton LJ, LeBlanc MG, Lehmann R. Finding their way: themes in germ cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;42:128–37.
25. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, et al. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev.* 2000;91(1–2):403–7.
26. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development.* 1995;121(6):1603–14.
27. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008;453(7197):930–4.
28. Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development.* 2009;136(11):1813–21.
29. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* [Internet]. 2011;476(7358):101–5. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10239>
30. Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development.* 2002;129(19):4627–34.
31. Warr N, Carre GA, Siggers P, Faleato JV, Brixey R, Pope M, et al. Gadd45 $\gamma$  and Map3k4 Interactions Regulate Mouse Testis Determination via p38 MAPK-Mediated Control of Sry Expression. *Dev Cell.* 2012;23(5):1020–31.
32. de Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Malclès M-H, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Steroidogenic Factor-1 Contributes to the Cyclic-Adenosine Monophosphate Down-Regulation of Human SRY Gene Expression. *Biol Reprod.* 2001;64(3):775–83.
33. Hossain A, Saunders GF. The Human Sex-determining Gene SRY Is a Direct Target of WT1. *J Biol Chem.* 2001;276(20):16817–23.

34. Nishino K, Hattori N, Tanaka S, Shiota K. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22306–13.
35. Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, et al. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science* (80-). 2013;341(6150):1106–9.
36. King TFJ, Conway GS. Swyer syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(6):504–10.
37. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, et al. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet*. 2002;32(3):359–69.
38. Reardon W, Gibbons RJ, Winter RM, Baraitser M. Male pseudohermaphroditism in sibs with the  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome. *Am J Med Genet*. 1995;55(3):285–7.
39. Pask A, Renfree MB, Marshall Graves JA. The human sex-reversing ATRX gene has a homologue on the marsupial Y chromosome, ATRY: Implications for the evolution of mammalian sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(24):13198–202.
40. Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, deBeaufort C, Schoenle EJ. Ovaries and Female Phenotype in a Girl with 46,XY Karyotype and Mutations in the CBX2 Gene. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009;84(5):658–63. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.016>
41. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T, et al. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46, XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2000;67(5):1302–5.
42. Canto P, Söderlund D, Reyes E, Méndez JP. Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4480–3.
43. Raymond CS, Murphy MW, O’Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*. 2000;14(20):2587–95.
44. Lourenço D, Brauner R, Rybczyńska M, Nihoul-Fékété C, McElreavey K, Bashamboo

- A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1597–602.
45. Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, et al. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum Mol Genet*. 2014;23(14):3657–65.
  46. Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans [1]. *Nat Genet*. 1999;22(2):125–6.
  47. Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):991–9.
  48. Miné, Manuèle; Chen J, Desguerre I, Marchant D, Abitbol M, Ricquier D, Lonlay P De, et al. RAPID COMMUNICATION A Large Genomic Deletion in the PDHX Gene Caused by the Retrotranspositional Insertion of a Full-Length LINE-1 Element. *Hum Mutat*. 2006;0(August 2007):1–6.
  49. Aguila, Monica;Bevilacqua, Dalila;McCulley C. Mutations involving the SRY-related gene SOX8 are associated with a spectrum of human reproductive anomalies. 2013;44(0):1–39.
  50. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, et al. Homozygous Inactivation of Sox9 Causes Complete XY Sex Reversal in Mice<sup>1</sup>. *Biol Reprod*. 2006;74(1):195–201.
  51. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 1994;79(6):1111–20.
  52. McElreavey KD, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, Richaud F, et al. XY Sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics*. 1992;13(3):838–40.
  53. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, et al. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*

- (80- ). 1992;255(5043):453–6.
54. Lee DG, Han DH, Park KH, Baek M. A novel WT1 gene mutation in a patient with Wilms' tumor and 46, XY gonadal dysgenesis. *Eur J Pediatr.* 2011;170(8):1079–82.
  55. Finken MJJ, Hendriks YMC, Van Der Voorn JP, Veening MA, Lombardi MP, Rotteveel J. WT1 deletion leading to severe 46,XY gonadal dysgenesis, wilms tumor and gonadoblastoma: Case report. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(3):211–6.
  56. Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, et al. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet.* 2005;14(14):2053–62.
  57. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, et al. Activation of  $\beta$ -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet.* 2008;17(9):1264–77.
  58. Maatouk DM, Dinapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of  $\beta$ -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet.* 2008;17(19):2949–55.
  59. Yatsenko SA, Rajkovic A. Genetics of human female infertility. *Biol Reprod.* 2019;101(3):549–66.
  60. Weinberg-Shukron A, Rachmiel M, Renbaum P, Gulsuner S, Walsh T, Lobel O, et al. Essential Role of BRCA2 in Ovarian Development and Function. *N Engl J Med.* 2018;379(11):1042–9.
  61. Aittomäki K, Dieguez Lucena J, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell.* 1995;82(6):959–68.
  62. Kuechler A, Hauffa BP, Köninger A, Kleinau G, Albrecht B, Horsthemke B, et al. An unbalanced translocation unmasks a recessive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene and causes FSH resistance. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(6):656–61.
  63. Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Serval N, Taourit S, Furet JP, et al. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet.* 2001;29(4):453–8.



64. Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, et al. SERKAL Syndrome: An Autosomal-Recessive Disorder Caused by a Loss-of-Function Mutation in WNT4. *Am J Hum Genet.* 2008;82(1):39–47.
65. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006;38(11):1304–9.
66. Tallapaka K, Venugopal V, Dalal A, Aggarwal S. Novel RSP01 mutation causing 46,XX testicular disorder of sex development with palmoplantar keratoderma: A review of literature and expansion of clinical phenotype. *Am J Med Genet Part A.* 2018;176(4):1006–10.
67. Bashamboo Anu, Donohoue Patricia, Vilain Eric, Rojo Sandra, Calvel Pierre SS. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum Mol Genet.* 2016;25:3446–53.
68. Baetens D, Stoop H, Peelman F, Todeschini AL, Rosseel T, Coppieters F, et al. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. *Genet Med.* 2017;19(4):367–76.
69. Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, et al. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum Mutat.* 2017;38(1):39–42.
70. Swartz JM, Ciarlo R, Guo MH, Abrha A, Weaver B, Diamond DA, et al. A 46,XX Ovotesticular Disorder of Sex Development Likely Caused by a Steroidogenic Factor-1 (NR5A1) Variant. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(3):191–5.
71. Gomes NL, de Paula LCP, Silva JM, Silva TE, Lerário AM, Nishi MY, et al. A 46,XX testicular disorder of sex development caused by a Wilms' tumour Factor-1 (WT1) pathogenic variant. *Clin Genet.* 2019;95(1):172–6.
72. Viot-Szoboszalai G, Amiel J, Doz F, Prieur M, Couturier J, Zucker JN, et al. Wilms' tumor and gonadal dysgenesis in a child with the 2q37.1 deletion syndrome. *Clin Genet.* 1998;53(4):278–80.
73. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, et al. Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell.*

- 2009;139(6):1130–42.
74. Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, Takagi M, Morio T, Asahara H, et al. FOXL2 transcriptionally represses Sfl expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J.* 2014;28(5):2020–8.
  75. Jameson SA, Lin YT, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol* [Internet]. 2012;370(1):24–32. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.009>
  76. Minkina A, Matson CK, Lindeman RE, Ghyselinck NB, Bardwell VJ, Zarkower D. DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation. *Dev Cell* [Internet]. 2014;29(5):511–20. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.017>
  77. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PMG, Hardelin JP, Petit C. Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol.* 1996;366(3):547–57.
  78. Hagen C, McNeilly AS. The gonadotrophins and their subunits in foetal pituitary glands and circulation. *J Steroid Biochem.* 1977;8(5):537–44.
  79. Clements JA, Reyes FI, Winter JSD, Faiman C. Studies on human sexual development IV. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;44(2):408–13.
  80. Guimiot F, Chevrier L, Dreux S, Chevenne D, Caraty A, Delezoide AL, et al. Negative fetal FSH/LH regulation in late pregnancy is associated with declined kisspeptin/KISS1R expression in the tuberal hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):2221–9.
  81. Beck-Peccoz P, Padmanabhan V, Baggiani AM, Cortelazzi D, Buscaglia M, Medri G, et al. Maturation of hypothalamic-pituitary-gonadal function in normal human fetuses: Circulating levels of gonadotropins, their common  $\alpha$ -subunit and free testosterone, and discrepancy between immunological and biological activities of circulating follicle-stimu. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(3):525–32.
  82. Debieve F, Beerlandt S, Hubinont C, Thomas K. Activin A in Human Fetal Serum from Midpregnancy. 2015;85(1):270–4.

83. Baker TG, Scrimgeour JB. Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil.* 1980;60(1):193–9.
84. Bizzarri C, Cappa M. Ontogeny of Hypothalamus-Pituitary Gonadal Axis and Minipuberty: An Ongoing Debate? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11(April):1–12.
85. Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato MG, Gottlieb S, et al. Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4092–8.
86. Boas M, Boisen KA, Virtanen HE, Kaleva M, Suomi AM, Schmidt IM, et al. Postnatal penile length and growth rate correlate to serum testosterone levels: A longitudinal study of 1962 normal boys. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(1):125–9.
87. Hadziselimovic F, Hadziselimovic NO, Demougin P, Krey G, Oakeley E. Piwi-pathway alteration induces LINE-1 transposon derepression and infertility development in cryptorchidism. *Sex Dev.* 2015;9(2):98–104.
88. Chellakooty M, Schmidt IM, Haavisto AM, Boisen KA, Damgaard IN, Mau C, et al. Inhibin A, inhibin B, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and sex hormone-binding globulin levels in 473 healthy infant girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3515–20.
89. Eugster E. Serum Levels of Anti-Müllerian Hormone as a Marker of Ovarian Function in 926 Healthy Females from Birth to Adulthood and in 172 Turner Syndrome Patients. *Yearb Endocrinol* [Internet]. 2011;2011:342–4. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yend.2010.12.007>
90. De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972–6.
91. Shahab M, Lippincott M, Chan YM, Davies A, Merino PM, Plummer L, et al. Discordance in the Dependence on Kisspeptin Signaling in Mini Puberty vs Adolescent Puberty: Human Genetic Evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(4):1273–6.
92. Festa A, Umamo GR, Miraglia del Giudice E, Grandone A. Genetic Evaluation of Patients With Delayed Puberty and Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: Is it

- Worthy of Consideration? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11(May):1–11.
93. Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, Binart N, Bouligand J, et al. Genetic counseling for congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome: New challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(3):R55–80.
  94. Topaloğlu AK. Update on the Genetics of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(Suppl 2):113–22.
  95. Cassatella D, Howard SR, Acierno JS, Xu C, Papadakis GE, Santoni FA, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(4):377–88.
  96. Kottler ML, Counis R, Bouchard P. Mutations of the GnRH receptor gene: A new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch Med Res*. 1999;30(6):481–5.
  97. Costa EMF, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJP, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2680–6.
  98. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614–27.
  99. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2013;92(5):725–43. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.04.008>
  100. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*. 2009;41(3):354–8.
  101. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin- releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2857–67.

102. Chan YM, De Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(28):11703–8.
103. Topaloglu a. K, Tello J a., Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism. *N Engl J Med*. 2012;366(7):629–35.
104. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, Gaillard RC, Quatresooz P, Tebeu PM, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2619–25.
105. Layman LC, Porto ALA, Xie J, Da Motta LACR, Da Motta LDC, Weiser W, et al. FSH $\beta$  gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3702–7.
106. Lindstedt G, Nyström E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSH $\beta$  gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(8):663–5.
107. Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-bertelletto JP, et al. Heterogeneity in the mutations responsible for x chromosome-linked kallmann syndrome. *Hum Mol Genet*. 1993;2(4):373–7.
108. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):463–5.
109. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing A, Eliseenkova A V., Ma J, Ibrahimi OA, et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6281–6.
110. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, Encoding a Chromatin-Remodeling Protein, Cause Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008;83(4):511–9.
111. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, et al. Heparan sulfate

- 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11524–9.
112. Howard SR, Guasti L, Poliandri A, David A, Cabrera CP, Barnes MR, et al. Contributions of function-Altering variants in genes implicated in pubertal timing and body mass for self-limited delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):649–59.
  113. Perry JRB, Stolck L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nat Genet*. 2009;41(6):648–50.
  114. Ong KK, Elks CE, Wills AK, Wong A, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Associations between the pubertal timing-related variant in LIN28B and BMI vary across the life course. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):125–9.
  115. Tommiska J, Wehkalampi K, Vaaralahti K, Laitinen EM, Raivio T, Dunkel L. LIN28B in constitutional delay of growth and puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):3063–6.
  116. Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2012;14(1):40–8.
  117. Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: From research to clinic. *Reproduction*. 2015;150(5):R159–74.
  118. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics*. 2013;68(SUPPL. 1):39–60.
  119. Gunes S, Asci R, Okten G, Atac F, Onat OE, Ogur G, et al. Two Males with SRY-Positive 46,XX Testicular Disorder of Sex Development. *Syst Biol Reprod Med*. 2013;59(1):42–7.
  120. Abur U, Gunes S, Ascı R, Altundag E, Akar OS, Ayas B, et al. Chromosomal and Y-chromosome microdeletion analysis in 1,300 infertile males and the fertility outcome of patients with AZFc microdeletions. *Andrologia*. 2019;51(11):1–8.
  121. Foresta C. 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.
122. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2018;15(6):369–84. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
  123. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet*. 2011;88(3):351–61.
  124. Bashamboo A, Ferraz-De-Souza B, Loureno D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet*. 2010;87(4):505–12.
  125. Adelman CA, Petrini JHJ. ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. *PLoS Genet*. 2008;4(3).
  126. Borgmann J, Tüttelmann F, Dworniczak B, Röpke A, Song HW, Kliesch S, et al. The human RHOX gene cluster: Target genes and functional analysis of gene variants in infertile men. *Hum Mol Genet*. 2016;25(22):4898–910.
  127. Schilit SLP, Menon S, Friedrich C, Kammin T, Wilch E, Hanscom C, et al. SYCP2 Translocation-Mediated Dysregulation and Frameshift Variants Cause Human Male Infertility. *Am J Hum Genet*. 2020;106(1):41–57.
  128. Bache I, Van Assche E, Cingoz S, Bugge M, Tümer Z, Hjorth M, et al. An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(12):993–1000.
  129. Dirami T, Rode B, Jollivet M, Da Silva N, Escalier D, Gaitch N, et al. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia. *Am J Hum Genet*. 2013;92(5):760–6.
  130. Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, et al. Mutations of the SYCP3 Gene in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009;84(1):14–20. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.12.002>
  131. Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*. 2003;362(9397):1714–9.
  132. Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, et al. The Aurora

- Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet.* 2009;18(7):1301–9.
133. Dam AHDM, Kosciński I, Kremer JAM, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet.* 2007;81(4):813–20.
  134. Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LLH, Kahrizi K, et al. Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2009;84(4):505–10. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.004>
  135. Domenice S, Zamboni Machado A, Moraes Ferreira F, Ferraz-de-Souza B, Marcondes Lerario A, Lin L, et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2016;108(4):309–20.
  136. Kilani Z, Ismail R, Ghunaim S, Mohamed H, Hughes D, Brewis I, et al. Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers. *Fertil Steril.* 2004;82(5):1436–9.
  137. Lin YH, Wang YY, Chen HI, Kuo YC, Chiou YW, Lin HH, et al. SEPTIN12 genetic variants confer susceptibility to teratozoospermia. *PLoS One.* 2012;7(3).
  138. Yatsenko AN, Roy A, Chen R, Ma L, Murthy LJ, Yan W, et al. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL 10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Hum Mol Genet.* 2006;15(23):3411–9.
  139. Kusz-Zamelczyk K, Sajek M, Spik A, Glazar R, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, et al. Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *J Med Genet.* 2013;50(3):187–93.
  140. Ayhan Ö, Balkan M, Guven A, Hazan R, Atar M, Tok A, et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet.* 2014;51(4):239–44.
  141. Krausz C, Riera-Escamilla A, Chianese C, Moreno-Mendoza D, Ars E, Rajmil O, et al.



- From exome analysis in idiopathic azoospermia to the identification of a high-risk subgroup for occult Fanconi anemia. *Genet Med* [Internet]. 2019;21(1):189–94. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-018-0037-1>
142. Tewes AC, Ledig S, Tüttelmann F, Kliesch S, Wieacker P. DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility. *Fertil Steril*. 2014;102(3).
  143. He W Bin, Tu CF, Liu Q, Meng LL, Yuan SM, Luo AX, et al. DMC1 mutation that causes human non-obstructive azoospermia and premature ovarian insufficiency identified by whole-exome sequencing. *J Med Genet*. 2018;55(3):198–204.
  144. Miyamoto T, Bando Y, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Iijima M, et al. A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome. *Andrology*. 2016;4(1):75–81.
  145. Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, et al. TEX 11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse . *EMBO Mol Med*. 2015;7(9):1198–210.
  146. Feng CW, Bowles J, Koopman P. Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2014;382(1):488–97. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.026>
  147. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: Primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2005;10(2):182–91. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60939-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60939-X)
  148. Baudat F, Imai Y, De Massy B. Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2013;14(11):794–806. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3573>
  149. Babariya D, Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. The incidence and origin of segmental aneuploidy in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2017;32(12):2549–60.
  150. Tsutsumi M, Fujiwara R, Nishizawa H, Ito M, Kogo H, Inagaki H, et al. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. *PLoS One*. 2014;9(5).
  151. AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, et al. Exome

- sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest*. 2015;125(1):258–62.
152. Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2014;95(6):754–62. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002>
  153. Mandon-Pépin B, Touraine P, Kuttenn F, Derbois C, Rouxel A, Matsuda F, et al. Genetic investigation of four meiotic genes in women with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(1):107–15.
  154. Chen CTL, Liu CT, Chen GK, Andrews JS, Arnold AM, Dreyfus J, et al. Meta-analysis of loci associated with age at natural menopause in African-American women. *Hum Mol Genet*. 2014;23(12):3327–42.
  155. Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Azibi K, Fagart J, et al. Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(12):4541–50.
  156. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, Ennis S, MacPherson JN, Jones M, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet Med*. 2014;16(1):19–24.
  157. Bione S, Sala C, Manzini C, Arrigo G, Zuffardi O, Banfi S, et al. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: Evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet*. 1998;62(3):533–41.
  158. Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, Muller JM, Nelson SF, et al. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):113–9.
  159. Laissue P, Lakhal B, Benayoun BA, Dipietromaria A, Braham R, Elghezal H, et al. Functional evidence implicating FOXL2 in nonsyndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet*. 2009;46(7):455–7.
  160. Harris SE. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature

- ovarian failure. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(8):729–33.
161. Dixit H, Rao LK, Padmalatha V V., Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 2006;119(4):408–15.
  162. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):106–11.
  163. Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):576–81.
  164. Tosh D, Rani HS, Murty US, Deenadayal A, Grover P. Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. *Menopause.* 2015;22(5):520–6.
  165. Yuan P, He Z, Sun S, Li Y, Wang W, Liang X, et al. Bi-allelic recessive loss-of-function mutations in FIGLA cause premature ovarian insufficiency with short stature. *Clin Genet.* 2019;95(3):409–14.
  166. Harrison SM, Campbell IM, Keays M, Granberg CF, Villanueva C, Tannin G, et al. Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure. *Am J Med Genet Part A.* 2013;161(10):2487–94.
  167. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med.* 2014;370(10):943–9.
  168. Wang, J., Zhang, W., Jiang, H., Wu B-L. Mutations in HFM1 in Recessive Primary Ovarian Insufficiency. *N Engl J Med.* 2014;(370):972–4.
  169. Qin Y, Guo T, Li G, Tang TS, Zhao S, Jiao X, et al. CSB-PGBD3 Mutations Cause Premature Ovarian Failure. *PLoS Genet.* 2015;11(7):1–14.
  170. De Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):E2129–32.
  171. Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, et al. Mutations in MSH5 in primary

- ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet.* 2017;26(8):1452–7.
172. Franca, M. M., Funari, M. F. A., Nishi, M. Y., Narcizo, A. M., Domenice, S., Costa, E. M. F., Lerario, A. M., Mendonca BB. Identification of the first homozygous 1-bp deletion in. *Clin Genet.* 2018;93:408–11.
  173. Fouquet B, Pawlikowska P, Caburet S, Guigon C, Mäkinen M, Tanner L, et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *Elife.* 2017;6:1–17.
  174. Zhang D, Liu Y, Zhang Z, Lv P, Liu Y, Li J, et al. Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency. Vol. 27, *Human Molecular Genetics.* 2018. 3787–3800 p.
  175. Lekovich J, Man L, Xu K, Canon C, Lilienthal D, Stewart JD, et al. CGG repeat length and AGG interruptions as indicators of fragile X–associated diminished ovarian reserve. *Genet Med.* 2018;20(9):957–64.
  176. Aksglaede L, Sørensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, et al. Changes in Anti-Müllerian Hormone (AMH) throughout the life span: A population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(12):5357–64.
  177. Ostrer H, Huang HY, Masch RJ, Shapiro E. A cellular study of human testis development. *Sex Dev.* 2007;1(5):286–92.
  178. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 1998;93(3):445–54.
  179. Yao HHC, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(11):1433–40.
  180. Troisi R, Potischman N, Roberts JM, Harger G, Markovic N, Cole B, et al. Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(5):452–6.
  181. Josso N, Belville C, di Clemente N, Picard JY. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):351–6.

182. Roberts LM, Visser JA, Ingraham HA. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. *Development*. 2002;129(6):1487–96.
183. Miller C, Sassoon DA. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*. 1998;125(16):3201–11.
184. Snyder EM, Small CL, Bomgardner D, Xu B, Griswold MD, Hinton BT. deferens during Embryonic Development of the Mouse. 2011;239(9):2479–91.
185. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH, ur. Larsen's Human Embryology. 5.izd. London: Churchill Livingstone; 2015.
186. Wang H, Zhu H, Wang N, Cheng T, Han B, Zhao S, et al. Somatic mosaicism of androgen receptor gene in an androgen insensitivity syndrome patient conceived through assisted reproduction technique. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(10):1–4.
187. Wang S, Xia P, Cacalano NA, Xu H, Li D. Complete androgen insensitivity syndrome caused by c.1769-1G > C mutation and activation of a cryptic splice acceptor site in the androgen receptor gene. *Steroids* [Internet]. 2018;137(71):64–9. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.05.012>
188. Boehmer ALM, Brüggewirth H, Van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MCT, Niermeijer MF, et al. Genotype Versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4151–60.
189. Mullen RD, Behringer RR. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sex Dev*. 2014;8(5):281–96.
190. Goodman FR, Bacchelli C, Brady AF, Brueton LA, Fryns JP, Mortlock DP, et al. Novel HOXA13 mutation and the phenotypic spectrum of hand-foot-genital syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000;67(1):197–202.
191. Wang M, Hao C, Huang X, Bao H, Qu Q, Liu Z, et al. Aberrant Expression of lncRNA (HOXA11-AS1) and Homeobox A (HOXA9, HOXA10, HOXA11, and HOXA13) Genes in Infertile Women With Endometriosis. *Reprod Sci*. 2018;25(5):654–61.
192. Williams LS, Eksi DD, Ph D, Shen Y, Ph D, Lossie AC, et al. Genetic Analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome (MRKH) Through Ascertainment of a

- Large Cohort of Families. *Fertil Steril*. 2017;108(1):145–51.
193. Zhang W, Zhou X, Liu L, Zhu Y, Liu C, Pan H, et al. Identification and functional analysis of a novel LHX1 mutation associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Oncotarget*. 2017;8(5):8785–90.
  194. Timmreck LS, Pan HA, Reindollar RH, Gray MR. WNT7A Mutations in Patients with Müllerian Duct Abnormalities. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2003;16(4):217–21.
  195. Ma W, Li Y, Wang M, Li H, Su T, Li Y, et al. Associations of polymorphisms in WNT9B and PBX1 with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in Chinese Han. *PLoS One*. 2015;10(6):1–15.
  196. Xu Z, Wu S, Xing Q, Wang X, Xiang H, Xu Y, et al. Genetic association between PAX2 and müllerian duct anomalies in Han Chinese females. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2017;34(1):125–9. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0807-0>
  197. Ma D, Marion R, Punjabi NP, Pereira E, Samanich J, Agarwal C, et al. A de novo 10.79 Mb interstitial deletion at 2q13q14.2 involving PAX8 causing hypothyroidism and müllerian agenesis: A novel case report and literature review. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):1–6.
  198. Liu S, Gao X, Qin Y, Liu W, Huang T, Ma J, et al. Nonsense mutation of EMX2 is potential causative for uterus didelphysis: First molecular explanation for isolated incomplete müllerian fusion. *Fertil Steril* [Internet]. 2015;103(3):769-774.e2. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.030>
  199. Gupta SK. The Human Egg's Zona Pellucida. *Curr Top Dev Biol*. 2018;130:379-411. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.01.001
  200. Svoboda P. Mammalian zygotic genome activation. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;84:118–26. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.006>
  201. Zhang K, Smith GW. Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(6):880–96.
  202. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: A feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):367–82.
  203. Zhou Z, Ni C, Wu L, Chen B, Xu Y, Zhang Z, et al. Novel mutations in ZP1, ZP2, and

- ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum Genet* [Internet]. 2019;138(4):327–37. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-019-01990-1>
204. Feng R, Sang Q, Kuang Y, Sun X, Yan Z, Zhang S, et al. Mutations in TUBB8 and Human Oocyte Meiotic Arrest. *N Engl J Med*. 2016;374(3):223–32.
205. Maddirevula S, Coskun S, Alhassan S, Elnour A, Alsaif HS, Ibrahim N, et al. Female Infertility Caused by Mutations in the Oocyte-Specific Translational Repressor PATL2. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2017;101(4):603–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.009>
206. Sang Q, Li B, Kuang Y, Wang X, Zhang Z, Chen B, et al. Homozygous Mutations in WEE2 Cause Fertilization Failure and Female Infertility. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2018;102(4):649–57. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.015>
207. Sang Q, Zhang Z, Shi J, Sun X, Li B, Yan Z, et al. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death. *Sci Transl Med*. 2019;11(485).
208. Bebbere D, Masala L, Albertini DF, Ledda S. The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016;33(11):1431–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0788-z>
209. Li L, Baibakov B, Dean J. A Subcortical Maternal Complex Essential for Preimplantation Mouse Embryogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(3):416–25.
210. Alazami AM, Awad SM, Coskun S, Al-Hassan S, Hijazi H, Abdulwahab FM, et al. TLE6 mutation causes the earliest known human embryonic lethality. *Genome Biol* [Internet]. 2015;16(1):1–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0792-0>
211. Fallahian M, Sebire NJ, Savage PM, Seckl MJ, Fisher RA. Mutations in NLRP7 and KHDC3L Confer a Complete Hydatidiform Mole Phenotype on Digynic Triploid Conceptions. *Hum Mutat*. 2013;34(2):301–8.
212. Nguyen NMP, Ge ZJ, Reddy R, Fahiminiya S, Sauthier P, Bagga R, et al. Causative Mutations and Mechanism of Androgenetic Hydatidiform Moles. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2018;103(5):740–51. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.10.007>
213. Xu Y, Shi Y, Fu J, Yu M, Feng R, Sang Q, et al. Mutations in PADI6 Cause Female

- Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016;99(3):744–52. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.024>
214. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: The “black box” of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):333–43.
215. Pereza N, Ostojić S, Kapović M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 2017;107(1):150-159.e2.
216. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa M V., et al. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med*. 2000;343(14):1015–8.
217. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: Prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol*. 2001;46(2):124–31.
218. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, Croucher PJP, Nebel A, Bohring A, et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet*. 2007;16(5):573–8.
219. Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2001;16(8):1644–7.
220. Mercier E, Lissalde-Lavigne G, Gris JC. JAK2 V617F mutation in unexplained loss of first pregnancy [14]. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1984–5.
221. Pfeiffer KA. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(4):373–8.
222. Nielsen HS, Steffensen R, Varming K, Van Halteren AGS, Spierings E, Ryder LP, et al. Association of HY-restricting HLA class II alleles with pregnancy outcome in patients with recurrent miscarriage subsequent to a firstborn boy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(9):1684–91.
223. Costa MA. The endocrine function of human placenta: An overview. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2016;32(1):14–43. Dostupno na:



<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>

224. Pihl K, Larsen T, Laursen I, Krebs L, Christiansen M. First trimester maternal serum pregnancy-specific beta-1-glycoprotein (SP1) as a marker of adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2009;31(10):1256–61.
225. McIntyre, J. A., Faulk, W. P., Verhulst, S. J., Colliver JA. Human Trophoblast-Lymphocyte Cross-Reactive (TLX) Antigens Define a New Alloantigen System. *Science* (80- ). 1983;(December):1135–7.
226. Hellberg Å, Ringressi A, Yahalom V, Säfwenbergh J, Reid ME, Olsson ML. Genetic heterogeneity at the glycosyltransferase loci underlying the GLOB blood group and collection. *Br J Haematol.* 2004;125(4):528–36.
227. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic basis of polycystic ovary syndrome (PCOS): Current perspectives. *Appl Clin Genet.* 2019;12:249–60.
228. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Bergiele AT, Tsianateli TC, Kouli CR. Microsatellite polymorphism (tttta)(n) at -528 base pairs of gene CYP11 $\alpha$  influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(4):735–41.
229. Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, et al. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet.* 1994;3(10):1873–6.
230. Ito Y, Fisher CR, Conte FA, Grumbach MM, Simpson ER. Molecular basis of aromatase deficiency in an adult female with sexual infantilism and polycystic ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11673–7.
231. Hickey TE, Legro RS, Norman RJ. Brief Report: Epigenetic modification of the X chromosome influences susceptibility to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2789–91.
232. Wickham EP, Ewens KG, Legro RS, Dunaif A, Nestler JE, Strauss JF. Polymorphisms in the SHBG gene influence serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(4):719–27.
233. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S i sur. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary

- syndrome. *Lancet* [Internet]. 1997;349(9057):986–90. Dostupno na: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed7&NEWS=N&AN=27149802>
234. Urbanek M, Woodroffe A, Ewens KG, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS, Strauss JF, et al. Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6623–9.
  235. Thangavelu M, Godla UR, Paul SFD, Maddaly R. Single-nucleotide polymorphism of INS, INSR, IRS1, IRS2, PPAR-G and CAPN10 genes in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *J Genet.* 2017;96(1):87–96.
  236. Sáez ME, González-Sánchez JL, Ramírez-Lorca R, Martínez-Larrad MT, Zabena C, González A, et al. The CAPN10 gene is associated with insulin resistance phenotypes in the spanish population. *PLoS One.* 2008;3(8).
  237. Batista MCP, de Fatima Duarte E, dos Reis Borba MD, Zingler E, Mangussi-Gomes J, dos Santos BTA, et al. Trp28Arg/Ile35Thr LHB gene variants are associated with elevated testosterone levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gene* [Internet]. 2014;550(1):68–73. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.017>
  238. Wu XQ, Xu SM, Liu JF, Bi XY, Wu YX, Liu J. Association between FSHR polymorphisms and polycystic ovary syndrome among Chinese women in north China. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(3):371–7.
  239. Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, Sisk R, Legro RS, Hayes MG, et al. Pathogenic anti-Müllerian hormone variants in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(8):2862–72.
  240. Rizwan S, Ghazanvi S, Rasheed N, Ullah M. Association of FTO Common RS9939609 Polymorphism with Obesity and Polycystic Ovarian Syndrome in Pakistani Women. *J Med Res Biol Stud.* 2018;1(1):101.
  241. Goodarzi MO, Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Guo X, Azziz R. Variants in the 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycystic ovary syndrome and the severity of hirsutism in affected women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4085–91.
  242. Qu F, Wang FF, Yin R, Ding GL, El-prince M, Gao Q, et al. A molecular mechanism

- underlying ovarian dysfunction of polycystic ovary syndrome: Hyperandrogenism induces epigenetic alterations in the granulosa cells. *J Mol Med*. 2012;90(8):911–23.
243. Parazzini F, Esposito G, Tozzi L, Noli S, Bianchi S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2017;209:3–7. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.04.021>
244. Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, Martin NG. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril*. 1999;71(4):701–10.
245. Mafra F, Catto M, Bianco B, Barbosa CP, Christofolini D. Association of WNT4 polymorphisms with endometriosis in infertile patients. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(9):1359–64.
246. Matalliotaki C, Matalliotakis M, Rahmioglu N, Mavromatidis G, Matalliotakis I, Koumantakis G, et al. Role of FN1 and GREB1 gene polymorphisms in endometriosis. *Mol Med Rep*. 2019;20(1):111–6.
247. Viana PCS, Mendes ACDM, Delgado LF, Tostes G, Gonçalves L, Gonçalves Júnior H, et al. Association between Single Nucleotide Polymorphisms and Endometriosis in a Brazilian Population. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2020;42(3):146–51.
248. Pagliardini L, Gentilini D, Vigano P, Panina-Bordignon P, Busacca M, Candiani M, et al. An Italian association study and meta-analysis with previous GWAS confirm WNT4, CDKN2BAS and FN1 as the first identified susceptibility loci for endometriosis. *J Med Genet*. 2013;50(1):43–6.
249. Holdsworth-Carson SJ, Fung JN, Luong HTT, Sapkota Y, Bowdler LM, Wallace L, et al. Endometrial vezatin and its association with endometriosis risk. *Hum Reprod*. 2016;31(5):999–1013.
250. Badie A, Saliminejad K, Salahshourifar I, Khorram Khorshid HR. Interleukin 1 alpha (IL1A) polymorphisms and risk of endometriosis in Iranian population: a case-control study. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2020;36(2):135–8. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1631790>
251. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33(3S):245–54.
252. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation

- Patterns in Plants and Animals. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):204–20.
253. Bogdanović O, Veenstra GJC. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: Developmental requirements and function. *Chromosoma.* 2009;118(5):549–65.
  254. Chédin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):16916–21.
  255. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 2011;25(23):2436–52.
  256. Wasserzug-Pash P, Klutstein M. Epigenetic changes in mammalian gametes throughout their lifetime: the four seasons metaphor. *Chromosoma.* 2019;128(3):423–41.
  257. Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics.* 2005;2(5):719–29.
  258. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* [Internet]. 2011;21(3):381–95. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>
  259. Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA. Profile of Histone Lysine Methylation across Transcribed Mammalian Chromatin. *Mol Cell Biol.* 2006;26(24):9185–95.
  260. Prasanth K V., Spector DL. Eukaryotic regulatory RNAs: An answer to the “genome complexity” conundrum. *Genes Dev.* 2007;21(1):11–42.
  261. Prévost K, Desnoyers G, Jacques JF, Lavoie F, Massé E. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev.* 2011;25(4):385–96.
  262. Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Hoelker M, Tholen E, Hailay T, Tesfaye D. The role of micrnas in mammalian fertility: From gametogenesis to embryo implantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2).
  263. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis.* 2014;4(2):e996025.
  264. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 2002;241(1):172–82.
  265. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature.*

- 2015;517(7534):321–6.
266. Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet* [Internet]. 2010;42(12):1093–100. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.708>
  267. Eguizabal C, Herrera L, De Oñate L, Montserrat N, Hajkova P, Izpisua Belmonte JC. Characterization of the Epigenetic Changes During Human Gonadal Primordial Germ Cells Reprogramming. *Stem Cells*. 2016;34(9):2418–28.
  268. Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, et al. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Res*. 2013;23(4):616–27.
  269. Grabole N, Tischler J, Hackett JA, Kim S, Tang F, Leitch HG, et al. Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation. *EMBO Rep*. 2013;14(7):629–37.
  270. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev*. 2008;22(12):1617–35.
  271. Kawasaki Y, Lee J, Matsuzawa A, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Sci Rep*. 2014;4:1–7.
  272. Hill PWS, Leitch HG, Requena CE, Zhiyi S, Amouroux R, Roman-Trufero M, et al. Epigenetic reprogramming enables the primordial germ cell-to-gonocyte transition Europe PMC Funders Group. *Nature* [Internet]. 2018;555(7696):392–6. Dostupno na: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)
  273. Ng JH, Kumar V, Muratani M, Kraus P, Yeo JC, Yaw LP, et al. In Vivo Epigenomic Profiling of Germ Cells Reveals Germ Cell Molecular Signatures. *Dev Cell* [Internet]. 2013;24(3):324–33. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.011>
  274. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*. 2007;129(4):823–37.
  275. Liu S, Brind'Amour J, Karimi MM, Shirane K, Bogutz A, Lefebvre L, et al. Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous

- retroviruses in primordial germ cells. *Genes Dev.* 2014;28(18):2041–55.
276. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto H, Li E, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature.* 2004;429(6994):900–3.
277. Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol.* 2007;307(2):368–79.
278. Sin HS, Kartashov A V., Hasegawa K, Barski A, Namekawa SH. Poised chromatin and bivalent domains facilitate the mitosis-to-meiosis transition in the male germline. *BMC Biol [Internet].* 2015;13(1):1–15. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-015-0159-8>
279. Zhang Y, Jurkowska R, Soeroes S, Rajavelu A, Dhayalan A, Bock I, et al. Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(13):4246–53.
280. Western PS, Miles DC, van den Bergen JA, Burton M, Sinclair AH. Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):339–47.
281. Urduingio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, Toraño EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1014–28.
282. Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI. Normal Spermatogenesis in Mice Lacking the Testis-Specific Linker Histone H1t. *Mol Cell Biol.* 2000;20(6):2122–8.
283. Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, et al. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep [Internet].* 2017;18(3):593–600. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.065>
284. Steger K, Balhorn R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2018;47(4):273–9.
285. Ben Maamar M, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK. Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered Sperm Histone Retention Sites. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–10. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23612->

y

286. Borghol N, Blachère T, Lefèvre A. Transcriptional and epigenetic status of protamine 1 and 2 genes following round spermatids injection into mouse oocytes. *Genomics*. 2008;91(5):415–22.
287. Cicchini C, Nonno V De, Battistelli C, Cozzolino AM, Puzzonia DS, Brocker C, et al. Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4 $\alpha$  impacts DNMT3s through miRs-29. 2019;1849(8):919–29.
288. Dai L, Tsai-Morris CH, Sato H, Villar J, Kang JH, Zhang J, et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: Implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44306–18.
289. Liu WM, Pang RTK, Chiu PCN, Wong BPC, Lao K, Lee KF, et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):490–4.
290. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc London, Ser B*. 1963;
291. Larose H, Shami AN, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud SS. Gametogenesis: A journey from inception to conception [Internet]. 1st ed. Vol. 132, *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2019. 257–310 p. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.006>
292. Smallwood SA, Tomizawa SI, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, et al. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* [Internet]. 2011;43(8):811–4. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.864>
293. Veselovska L, Smallwood SA, Saadeh H, Stewart KR, Krueger F, Maupetit Méhouas S, et al. Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape. *Genome Biol* [Internet]. 2015;16(1):1–17. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0769-z>
294. Sendžikaitė G, Kelsey G. The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte.

- Essays Biochem. 2019;63(6):691–705.
295. Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007;448(7154):714–7.
  296. Rondelet G, Dal Maso T, Willems L, Wouters J. Structural basis for recognition of histone H3K36me3 nucleosome by human de novo DNA methyltransferases 3A and 3B. *J Struct Biol* [Internet]. 2016;194(3):357–67. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.013>
  297. Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev*. 2008;22(12):1607–16.
  298. Lucifero D, La Salle S, Bourc'his D, Martel J, Bestor TH, Trasler JM. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev Biol*. 2007;7:1–14.
  299. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish Oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet*. 2012;8(1).
  300. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, et al. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation Dynamics during Early Human Development. *PLoS Genet*. 2014;10(12).
  301. Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, et al. Mouse Oocyte Methylomes at Base Resolution Reveal Genome-Wide Accumulation of Non-CpG Methylation and Role of DNA Methyltransferases. *PLoS Genet*. 2013;9(4).
  302. Lucifero D, Mann MRW, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet*. 2004;13(8):839–49.
  303. Stewart KR, Veselovska L, Kim J, Huang J, Saadeh H, Tomizawa SI, et al. Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes. *Genes Dev*. 2015;29(23):2449–62.
  304. Weinberg DN, Papillon-Cavanagh S, Chen H, Yue Y, Chen X, Rajagopalan KN, et al. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA



- methylation landscape. *Nature* [Internet]. 2019;573(7773):281–6. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1534-3>
305. Dhayalan A, Rajavelu A, Rathert P, Tamas R, Jurkowska RZ, Ragozin S, et al. The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *J Biol Chem*. 2010;285(34):26114–20.
  306. Hayakawa K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. *Epigenetics*. 2012;7(9):1029–36.
  307. Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, Kusumoto D, et al. H1foo has a pivotal role in qualifying induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2016;6(6):825–33. dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.015>
  308. Guo X, Wang L, Li J, Ding Z, Xiao J, Yin X, et al. Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. *Nature* [Internet]. 2015;517(7536):640–4. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13899>
  309. Gu L, Wang Q, Sun QY. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1942–50.
  310. Zhang R, Erler J, Langowski J. Histone Acetylation Regulates Chromatin Accessibility: Role of H4K16 in Inter-nucleosome Interaction. *Biophys J*. 2017;112(3):450–9.
  311. Ma P, Schultz RM. Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Regulates Chromosome Segregation and Kinetochores Function via H4K16 Deacetylation during Oocyte Maturation in Mouse. *PLoS Genet*. 2013;9(3).
  312. Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Grousse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev*. 1993;36(1):59–74.
  313. Bonnet-Garnier A, Feuerstein P, Chebrou M, Fleuret R, Jan HU, Debey P, et al. Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10–12):877–87.
  314. Ge SQ, Lin SL, Zhao ZH, Sun QY. Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: Implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget*. 2017;8(32):53804–18.

315. Jenkins TG, Carrell DT. The paternal epigenome and embryogenesis: Poising mechanisms for development. *Asian J Androl* [Internet]. 2011;13(1):76–80. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.61>
316. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96–9.
317. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915–26.
318. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2007;16(19):2272–80.
319. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* (80- ). 2001;294(5551):2536–9.
320. Almstrup K, Høi-Hansen CE, Nielsen JE, Wirkner U, Ansorge W, Skakkebaek NE, et al. Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br J Cancer*. 2005;92(10):1934–41.
321. Kaneda M, Hirasawa R, Chiba H, Okano M, Li E, Sasaki H. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with Zp3-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. *Genes to Cells*. 2010;15(3):169–79.
322. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhaneh M, Pujol P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: The role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2361–4.
323. Rotondo JC, Selvatici R, Di Domenico M, Marci R, Vesce F, Tognon M, et al. Methylation loss at H19 imprinted gene correlates with methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples from infertile males. *Epigenetics*. 2013;8(9):990–7.
324. Xu A, Hua Y, Zhang J, Chen W, Zhao K, Xi W, et al. Abnormal hypermethylation of the VDAC2 promoter is a potential cause of idiopathic asthenospermia in men. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August):1–9. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37836>
325. Tvrdá E, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its Role in Male Infertility. *Handb*

- Fertil Nutr Diet, Lifestyle Reprod Heal. 2015;411–22.
326. Ferreira HJ, Heyn H, Muro XG del, Vidal A, Larriba S, Muñoz C, et al. Epigenetic loss of the piwi/pirna machinery in human testicular tumorigenesis. *Epigenetics*. 2014;9(1):113–8.
  327. Li Y, Zhang Z, Chen J, Liu W, Lai W, Liu B, et al. Stella safeguards the oocyte methylome by preventing de novo methylation mediated by DNMT1. *Nature* [Internet]. 2018;564(7734):136–40. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0751-5>
  328. Han L, Ren C, Zhang J, Shu W, Wang Q. Differential roles of Stella in the modulation of DNA methylation during oocyte and zygotic development. *Cell Discov* [Internet]. 2019;5(1):4–7. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41421-019-0081-2>
  329. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9(1):64–71.
  330. Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, et al. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(9):1025–32.
  331. Abu-Amero S, Wakeling EL, Preece M, Whittaker J, Stanier P, Moore GE. Epigenetic signatures of Silver - Russell syndrome. *J Med Genet*. 2010;47(3):150–4.
  332. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004;119(7):941–53.
  333. Xiong J, Wang H, Guo G, Wang S, He L, Chen H, et al. Male germ cell apoptosis and epigenetic histone modification induced by *tripterygium wilfordii* hook f. *PLoS One*. 2011;6(6).
  334. Glaser S, Lubitz S, Loveland KL, Ohbo K, Robb L, Schwenk F, et al. The histone 3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics and Chromatin*. 2009;2(1):1–16.
  335. Andreu-Vieyra C V., Chen R, Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart Francis A, et al. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol*. 2010;8(8):53–4.

336. Yuen BTK, Bush KM, Barrilleaux BL, Cotterman R, Knoepfler PS. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Dev.* 2014;141(18):3483–94.
337. Li BZ, Huang Z, Cui QY, Song XH, Du L, Jeltsch A, et al. Histone tails regulate DNA methylation by allosterically activating de novo methyltransferase. *Cell Res.* 2011;21(8):1172–81.
338. Nashun B, Hill PWS, Smallwood SA, Dharmalingam G, Amouroux R, Clark SJ, et al. Continuous Histone Replacement by Hira Is Essential for Normal Transcriptional Regulation and De Novo DNA Methylation during Mouse Oogenesis. *Mol Cell* [Internet]. 2015;60(4):611–25. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.010>
339. Funaya S, Ooga M, Suzuki MG, Aoki F. Linker histone H1FOO regulates the chromatin structure in mouse zygotes. *FEBS Lett.* 2018;592(14):2414–24.
340. Paradowska AS, Miller D, Spiess AN, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, et al. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics.* 2012;7(9):1057–70.
341. Ausió J, Levin DB, de Amorim G V., Bakker S, Macleod PM. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin Genet.* 2003;64(2):83–95.
342. Coupry I, C Roudaut, M Stef, M-A Delrue, M Marche, I Burgelin, L Taine, C Cruaud, D Lacombe BA. Molecular analysis of the CBP gene in 60 patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *J Med Genet.* 2002;39(2):415–21.
343. Murata T, Kurokawa R, Kronen A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, et al. Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001;10(10):1071–6.
344. Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, et al. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature.* 2009;461(7262):415–8.
345. Wasson JA, Simon AK, Myrick DA, Wolf G, Driscoll S, Pfaff SL, et al. Maternally provided LSD1/KDM1A enables the maternal-to-zygotic transition and prevents defects that manifest postnatally. *Elife.* 2016;5(JANUARY2016):1–25.

346. Ma P, Pan H, Montgomery RL, Olson EN, Schultz RM. Compensatory functions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 regulate transcription and apoptosis during mouse oocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8).
347. Jamaladdin S, Kelly RDW, O'Regan L, Dovey OM, Hodson GE, Millard CJ, et al. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9840–5.
348. Sun XJ, Wei J, Wu XY, Hu M, Wang L, Wang HH, et al. Identification and characterization of a novel human histone H3 lysine 36-specific methyltransferase. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35261–71.
349. Zuo X, Rong B, Li L, Lv R, Lan F, Tong MH. The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice. *J Biol Chem*. 2018;293(24):9188–97.
350. Xu Q, Xiang Y, Wang Q, Wang L, Brind'Amour J, Bogutz AB, et al. SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development. *Nat Genet*. 2019;51(5):844–56.
351. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl*. 2006;27(6):890–8.
352. García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, et al. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril*. 2011;95(1):105–9.
353. Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(SUPPL. 1):109–13.
354. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice<sup>1</sup>. *Biol Reprod*. 2003;69(1):211–7.
355. Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conne B, Grey C, Weier M, et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and

- spermiogenic defects. *PLoS One*. 2011;6(10).
356. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, et al. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011;13(6):693–701. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2241>
357. Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and Infertility in Mice Deficient for miR-34b/c and miR-449 Loci. *PLoS Genet*. 2014;10(10).
358. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril*. 2013;99(5).
359. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem*. 2011;57(12):1722–31.
360. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum Reprod*. 2008;23(3):538–42.
361. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2015;19:22–33. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2014.10.007>
362. Villeponteau B. The heterochromatin loss model of aging. *Exp Gerontol*. 1997;32(4–5):383–94.
363. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2018;19(6):371–84. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
364. Voisin S, Harvey NR, Haupt LM, Griffiths LR, Ashton KJ, Coffey VG, et al. An epigenetic clock for human skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;(November 2019):1–12.
365. Yatsenko AN, Turek PJ. Reproductive genetics and the aging male. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(6):933–41.

366. Chamani IJ, Keefe DL. Epigenetics and Female Reproductive Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(August):1–7.
367. Bray I, Gunnell D, Smith GD. Advanced paternal age: How old is too old? *J Epidemiol Community Health*. 2006;60(10):851–3.
368. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, de Mouzon J, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online [Internet]*. 2008;17(3):392–7. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60223-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60223-4)
369. Pino V, Sanz A, Valdés N, Crosby J, Mackenna A. The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation. *J Bras Reprod Assist*. 2020;24(1):82–6.
370. De La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; Results of a multicentre European study. *Hum Reprod*. 2002;17(6):1649–56.
371. Naserbakht M, Ahmadkhaniha HR, Mokri B, Smith CL. Advanced paternal age is a risk factor for schizophrenia in Iranians. *Ann Gen Psychiatry*. 2011;10:1–6.
372. Dalman C. Advanced paternal age increases risk of bipolar disorder in offspring. *Evid Based Ment Health*. 2009;12(2):59.
373. Idring S, Magnusson C, Lundberg M, Ek M, Rai D, Svensson AC, et al. Parental age and the risk of autism spectrum disorders: Findings from a Swedish population-based cohort. *Int J Epidemiol*. 2014;43(1):107–15.
374. Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, Långström N, Lichtenstein P, McGrath JJ, et al. Autism risk across generations: A population-based study of advancing grandpaternal and paternal age. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(5):516–21.
375. Andersen AMN, Hansen KD, Andersen PK, Smith GD. Advanced paternal age and risk of fetal death: A cohort study. *Am J Epidemiol*. 2004;160(12):1214–22.
376. Jenkins TG, Aston KI, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Age-Associated Sperm DNA Methylation Alterations: Possible Implications in Offspring Disease Susceptibility. *PLoS Genet*. 2014;10(7).
377. Lung FW, Tzeng DS, Shu BC. Ethnic heterogeneity in allele variation in the DRD4 gene

- in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2002;57(2–3):239–45.
378. Serretti A, Mandelli L. The genetics of bipolar disorder: Genome “hot regions,” genes, new potential candidates and future directions. *Mol Psychiatry.* 2008;13(8):742–71.
379. Hu H, Li B, Duan S. The alteration of subtelomeric DNA methylation in aging-related diseases. *Front Genet.* 2019;10(JAN):1–8.
380. Guibert S, Forne T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* 2012;22(4):633–41.
381. Jenkins TG, Aston KI, Cairns B, Smith A, Carrell DT. Paternal germ line aging: DNA methylation age prediction from human sperm. *BMC Genomics.* 2018;19(1):1–10.
382. Gu C, Tong Q, Zheng L, Liang Z, Pu J, Mei H, et al. TSEG-1, a novel member of histone H2A variants, participates in spermatogenesis via promoting apoptosis of spermatogenic cells. *Genomics* [Internet]. 2010;95(5):278–89. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.02.005>
383. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* [Internet]. 2009;460(7254):473–8. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08162>
384. Kanatsu-Shinohara M, Yamamoto T, Toh H, Kazuki Y, Kazuki K, Imoto J, et al. Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(33):16404–9.
385. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology.* 2001;55(6):1303–22.
386. Klein J, Sauer M V. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(3):758–70.
387. Cheng JM, Liu YX. Age-related loss of cohesion: Causes and effects. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1–14.
388. Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human female meiosis revised: New insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update.* 2017;23(6):706–22.



389. Yue MX, Fu XW, Zhou G Bin, Hou YP, Du M, Wang L, et al. Abnormal DNA methylation in oocytes could be associated with a decrease in reproductive potential in old mice. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(7):643–50.
390. Yu B, Russanova VR, Gravina S, Hartley S, Mullikin JC, Ignezweski A, et al. DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links age-related changes in gene expression to gene body methylation and 3'-end GC density. *Oncotarget.* 2015;6(6):3627–43.
391. Qian Y, Tu J, Tang NLS, Kong GWS, Chung JPW, Chan WY, et al. Dynamic changes of DNA epigenetic marks in mouse oocytes during natural and accelerated aging. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2015;67:121–7. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.005>
392. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, et al. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet.* 2004;13(19):2263–78.
393. Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7339–44.
394. Manosalva I, González A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology* [Internet]. 2010;74(9):1539–47. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.024>
395. Van Den Berg IM, Eleveld C, Van Der Hoeven M, Birnie E, Steegers EAP, Galjaard RJ, et al. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1181–90.
396. Grøndahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod.* 2010;25(4):957–68.
397. Battaglia R, Vento ME, Ragusa M, Barbagallo D, La Ferlita A, Di Emidio G, et al. MicroRNAs Are Stored in Human MII Oocyte and Their Expression Profile Changes in

- Reproductive Aging. *Biol Reprod.* 2016;95(6):131–131.
398. Carroll J, Marangos P. The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front Genet.* 2013;4(JUN):1–9.
  399. Xiong B, Li S, Ai J-S, Yin S, OuYang Y-C, Sun S-C, et al. BRCA1 Is Required for Meiotic Spindle Assembly and Spindle Assembly Checkpoint Activation in Mouse Oocytes1. *Biol Reprod.* 2008;79(4):718–26.
  400. Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(172).
  401. Titus S, Stobezki R, Oktay K. Impaired DNA Repair as a Mechanism for Oocyte Aging: Is It Epigenetically Determined? *Semin Reprod Med.* 2015;33(6):384–8.
  402. Kim WJ, Vo QN, Shrivastav M, Lataxes TA, Brown KD. Aberrant methylation of the ATM promoter correlates with increased radiosensitivity in a human colorectal tumor cell line. *Oncogene.* 2002;21(24):3864–71.
  403. Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermarck U, Jasin M, Pierce AJ, et al. Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res.* 2005;65(24):11597–604.
  404. Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, et al. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. *Biol Reprod.* 2013;89(3):1–10.
  405. Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, et al. The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes to Cells.* 2000;5(8):649–59.
  406. Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5285–9.
  407. Nilsson EE, Sadler-Riggelman I, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenetics.* 2018;4(2):1–13.
  408. Pouresmaeili F. Epigenetics and fertility. *Urol Nephrol Open Access J.* 2019;7(3):45–8.
  409. Das L, Parbin S, Pradhan N, Kausar C, Patra SK. Epigenetics of reproductive infertility.

- Front Biosci - Sch. 2017;9(4):509–35.
410. Dečković-Vukres V, Ivičević Uhernik A, Mihel S. Istraživanje o uporabi duhana u odrasloj populaciji Republike Hrvatske. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2016;12(45):19
  411. Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Gitlin S, et al. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(4):611–8.
  412. Asare-Anane H, Bannison SB, Ofori EK, Ateko RO, Bawah AT, Amanquah SD, et al. Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reprod Health* [Internet]. 2016;13(1):1–6. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s12978-016-0207-z>
  413. Suonio S, Saarikoski S, Kauhanen O, Metsäpelto A, Terho J, Vohlonen I. Smoking does affect fecundity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1990;34(1–2):89–95.
  414. Hughes EG, Lamont DA, Beecroft ML, Wilson DMC, Brennan BG, Rice SC. Randomized trial of a “stage-of-change” oriented smoking cessation intervention in infertile and pregnant women. *Fertil Steril*. 2000;74(3):498–503.
  415. Hull MGR, North K, Taylorb H, Farrow A, Christopher L Ford W. Delayed conception and active and passive smoking. *Fertil Steril*. 2000;74(4):725–33.
  416. Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Miller MM, Malek A, London S. The effect of smoking on oogenesis, fertilization, and implantation. *Semin Reprod Endocrinol*. 1989;7(4):291–304.
  417. Freour T, Masson D, Mirallie S, Jean M, Bach K, Dejoie T, et al. Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2008;16(1):96–102. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60561-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60561-5)
  418. George L, Granath F, Johansson ALV, Annerén G, Cnattingius S. Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*. 2006;17(5):500–5.
  419. Pintican D, Poienar AA, Strilciuc S, Mihiu D. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2019;58(4):454–9. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.05.004>
  420. Gupta PC, Subramoney S. Smokeless tobacco use and risk of stillbirth: A cohort study

- in Mumbai, India. *Epidemiology*. 2006;17(1):47–51.
421. Llahí-Camp JM, Rai R, Ison C, Regan L, Taylor-Robinson D. Association of bacterial vaginosis with a history of second trimester miscarriage. *Hum Reprod*. 1996;11(7):1575–8.
  422. Saraiya M, Berg CJ, Kendrick JS, Strauss LT, Atrash HK, Ahn YW. Cigarette smoking as a risk factor for ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(3):493–8.
  423. Nio-Kobayashi J, Abidin HBZ, Brown JK, Iwanaga T, Horne AW, Duncan WC. Cigarette smoking alters sialylation in the Fallopian tube of women, with implications for the pathogenesis of ectopic pregnancy. *Mol Reprod Dev*. 2016;83(12):1083–91.
  424. Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Spanô M, Andersen CY, Frydenberg M, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? *Epidemiology*. 2003;14(3):278–86.
  425. Gunes S, Metin Mahmutoglu A, Arslan MA, Henkel R. Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *Andrologia*. 2018;50(9):1–17.
  426. Esakky P, Moley KH. Paternal smoking and germ cell death: A mechanistic link to the effects of cigarette smoke on spermatogenesis and possible long-term sequelae in offspring. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2016;435:85–93. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.015>
  427. Camprubí C, Cigliano RA, Salas-Huetos A, Garrido N, Blanco J. What the human sperm methylome tells us. *Epigenomics*. 2017;9(10):1299–315.
  428. Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet*. 2013;4(JUL):1–11.
  429. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet*. 2016;98(4):680–96.
  430. Dong H, Wang Y, Zou Z, Chen L, Shen C, Xu S, et al. Abnormal Methylation of Imprinted Genes and Cigarette Smoking: Assessment of Their Association with the Risk of Male Infertility. *Reprod Sci*. 2016;24(1):114–23.
  431. Jenkins TG, James ER, Alonso DF, Hoidal JR, Murphy PJ, Hotaling JM, et al. Cigarette

- smoking significantly alters sperm DNA methylation patterns. *Andrology*. 2017;5(6):1089–99.
432. Laqqan M, Tierling S, Alkhaled Y, Porto C Lo, Solomayer EF, Hammadeh ME. Aberrant DNA methylation patterns of human spermatozoa in current smoker males. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2017;71:126–33. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.05.010>
433. Xu W, Fang P, Zhu Z, Dai J, Nie D, Chen Z, et al. Cigarette Smoking Exposure Alters *Pebp1* DNA Methylation and Protein Profile Involved in MAPK Signaling Pathway in Mice Testis1. *Biol Reprod*. 2013;89(6):1–11.
434. Dai J, Zhan C, Xu W, Wang Z, Nie D, Zhao X, et al. Nicotine elevates sperm motility and induces *Pfn1* promoter hypomethylation in mouse testis. *Andrology*. 2015;3(5):967–78.
435. Yu B, Ding Q, Zheng T, Jiang L, Li Q, Sun X, et al. Smoking attenuated the association between  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  rs696 polymorphism and defective spermatogenesis in humans. *Andrologia*. 2014;47(9):987–94.
436. Hamad MF, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M, Hammadeh ME. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology*. 2014;2(5):666–77.
437. Hamad M, Shelko N, Montenarh M, Hammadeh ME. The impact of cigarette smoking on protamines 1 and 2 transcripts in human spermatozoa. *Hum Fertil* [Internet]. 2017;22(2):104–10. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1382733>
438. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril* [Internet]. 2014;102(4):989–997.e1. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.001>
439. Metzler-Guillemain C, Victorero G, Lepoivre C, Bergon A, Yammine M, Perrin J, et al. Sperm mRNAs and microRNAs as candidate markers for the impact of toxicants on human spermatogenesis: an application to tobacco smoking. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(3):139–49.
440. Marczylo EL, Amoako AA, Konje JC, Gant TW, Marczylo TH. Smoking induces

- differential miRNA expression in human spermatozoa: A potential transgenerational epigenetic concern? *Epigenetics*. 2012;7(5):432–9.
441. AIHW. Impact of overweight and obesity as a risk factor for chronic conditions: Australian Burden of Disease Study [Internet]. Vol. 11, Australian Burden of Disease Study series. 2017. 68 p. Dostupno na: <https://www.aihw.gov.au/getmedia/f8618e51-c1c4-4dfb-85e0-54ea19500c91/20700.pdf.aspx?inline=true%0Ahttp://www.aihw.gov.au/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=60129559169>
442. Musić Milanović S, Bukal D. Epidemiologija debljine – javnozdravstveni problem. *Medicus*. 2018;27(1):7–13.
443. Sengupta P, Dutta S, Krajewska-Kulak E. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. *Am J Mens Health*. 2017;11(4):1279–304.
444. Sermondade N, Dupont C, Faure C, Boubaya M, Cédric-Durnerin I, Chavatte-Palmer P, et al. Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian J Androl*. 2013;15(5):626–9.
445. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*. 2004;82(4):863–70.
446. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril*. 2008;90(4):897–904.
447. Wolfe A, Hussain MA. The emerging role(s) for kisspeptin in metabolism in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(APR):1–10.
448. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, et al. Minireview: The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology*. 2006;147(3):1166–74.
449. Almabhouh FA, Md Mokhtar AH, Malik IA, Aziz NAAA, Durairajanayagam D, Singh HJ. Leptin and reproductive dysfunction in obese men. *Andrologia*. 2020;52(1):1–15.
450. Leisegang K, Henkel R. The in vitro modulation of steroidogenesis by inflammatory cytokines and insulin in TM3 Leydig cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):1–11.

451. Page ST, Herbst KL, Amory JK, Coviello AD, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men. *J Androl*. 2005;26(1):85–92.
452. Zheng D, Zhao Y, Shen Y, Chang X, Ju S, Guo L. Orexin A-mediated stimulation of  $3\beta$ -HSD expression and testosterone production through MAPK signaling pathways in primary rat Leydig cells. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(3):285–92.
453. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, et al. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1669–75.
454. Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol [Internet]*. 2010;7(3):153–61. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.6>
455. Agarwal A, Cho CL, Esteves SC. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016;28(3):164–71.
456. Gut P, Verdin E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*. 2013;502(7472):489–98.
457. Soubry A, Guo L, Huang Z, Hoyo C, Romanus S, Price T, et al. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clin Epigenetics [Internet]*. 2016;8(1):1–11. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-016-0217-2>
458. Tortoriello D V., McMinn J, Chua SC. Dietary-Induced Obesity and Hypothalamic Infertility in Female DBA/2J Mice. *Endocrinology*. 2004;145(3):1238–47.
459. Schulte MMB, Tsai JH, Moley KH. Obesity and PCOS: The effect of metabolic derangements on endometrial receptivity at the time of implantation. *Reprod Sci*. 2015;22(1):6–14.
460. Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1533–40.

461. Carrell DT, Jones KP, Peterson CM, Aoki V, Emery BR, Campbell BR. Body mass index is inversely related to intra-follicular HCG concentrations, embryo quality and IVF outcome. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2001;3(2):109–11. Dostupno na: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61977-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61977-3)
462. Van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Buckley M, et al. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes* [Internet]. 2015;39(1):85–97. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2014.34>
463. Shrestha D, Ouidir M, Workalemahu T, Zeng X, Tekola-Ayele F. Placental DNA methylation changes associated with maternal prepregnancy BMI and gestational weight gain. *Int J Obes* [Internet]. 2020;44(6):1406–16. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-020-0546-2>
464. McGee M, Bainbridge S, Fontaine-Bisson B. A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes. *Nutr Rev*. 2018;76(6):469–78.
465. Tserga A, Binder AM, Michels KB. Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of IGF2/H19 and 1-carbon metabolism. *FASEB J*. 2017;31(12):5149–58.
466. Fall CH. Fetal malnutrition and long-term outcomes Europe PMC Funders Group. *Nestle Nutr Inst Work Ser*. 2013;74:11–25.
467. Hart K, Tadros NN. The role of environmental factors and lifestyle on male reproductive health, the epigenome, and resulting offspring. *Panminerva Med*. 2019;61(2):187–95.
468. Li J, Tsuprykov O, Yang X, Hocher B. Paternal programming of offspring cardiometabolic diseases in later life. *J Hypertens*. 2016;34(11):2111–26.
469. Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(7):929–39.
470. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* [Internet]. 2010;143(7):1084–96. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.008>



471. Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2017;51:56–70. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>
472. Menezo Y, Dale B, Elder K. The negative impact of the environment on methylation/epigenetic marking in gametes and embryos: A plea for action to protect the fertility of future generations. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(10):1273–82.
473. Rehman S, Usman Z, Rehman S, AlDraihem M, Rehman N, Rehman I, et al. Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. *Transl Androl Urol*. 2018;7(3):490–503.
474. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho S mei, Hunt P, et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*. 2008;90(4):911–40.
475. Perry MJ, Venners SA, Chen X, Liu X, Tang G, Xing H, et al. Organophosphorous pesticide exposures and sperm quality. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2011;31(1):75–9. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.08.006>
476. Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Jørgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012;355(2):221–30. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.048>
477. Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AME, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol*. 2006;191(3):549–58.
478. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, et al. Endocrine disruptors and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(3):480–4.
479. Buck Louis GM, Peterson CM, Chen Z, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, et al. Bisphenol A and phthalates and endometriosis: The Endometriosis: Natural History, Diagnosis and Outcomes Study. *Fertil Steril* [Internet]. 2013;100(1):162-169.e2. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.026>

480. Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Ye X, Calafat AM, et al. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2012;27(12):3583–92.
481. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS One.* 2013;8(1).
482. Wu H, Estill MS, Shershebnv A, Suvorov A, Krawetz SA, Whitcomb BW, et al. Preconception urinary phthalate concentrations and sperm DNA methylation profiles among men undergoing IVF treatment: A cross-sectional study. *Hum Reprod.* 2017;32(11):2159–69.
483. Zama AM, Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology.* 2009;150(10):4681–91.

## 6. Životopis

Rođena sam 6.2.1996. u Zagrebu. Pohađala sam prirodoslovno-matematičku V. gimnaziju u Zagrebu i po završetku, 2014. godine, sam upisala Medicinski fakultet u Zagrebu.