

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

MASTER RAD

Uloga nutrigenetike i epigenetike u dijagnozi i lečenju muške neplodnosti

Mentor:  
prof. dr Vladimir Živković

Student:  
Duška Radanović

Kragujevac, 2025.

## PODACI I INFORMACIJE O STUDENTU

Ime i prezime: Duška Radanović

Datum i mesto rođenja: 21.5.1994.

Osnovne studije: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Molekularna biologija

## INFORMACIJE O MASTER RADU

Naziv studija: Master studije ishrane i suplementacije

Naslov rada: „Uloga nutrigenetike i epigenetike u dijagnozi lečenju muške neplodnosti”

Fakultet: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

## OCENA I ODBRANA MASTER RADA

Datum prijave rada: 20.08.2024.

Datum prihvatanja teme: 15. 09. 2024.

Mentor: prof. dr Vladimir Živković

Komisija za ocenu rada:

Komisija za odbranu rada:

Lektor: Autolektura

Datum odbrane:

Univerzitet u Kragujevcu

Fakultet medicinskih nauka

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Uvod.....</b>                                              | <b>1</b>  |
| 1.1. Značaj istraživanja muške neplodnosti.....                  | 1         |
| 1.2. Ciljevi i hipoteze rada.....                                | 2         |
| 1.3. Organizacija rada.....                                      | 2         |
| <b>2. Spermatogeneza.....</b>                                    | <b>2</b>  |
| 2.1. Biologija spermatogeneze.....                               | 2         |
| 2.2. Hormonska regulacija plodnosti.....                         | 3         |
| 2.3. Genetski faktori koji utiču na spermatogenezu.....          | 4         |
| 2.3.1. Promene u broju hromozoma.....                            | 5         |
| 2.3.2. Promene u strukturi hromozoma.....                        | 5         |
| 2.3.3. Promene u pojedinačnim genima.....                        | 5         |
| Kalmanov sindrom.....                                            | 5         |
| Mutacije koje utiču na strukturu i funkciju spermatozoida.....   | 6         |
| Mutacije koje utiču na testise i izvodne kanale.....             | 7         |
| Mutacije vezane za Y hromozom.....                               | 8         |
| <b>3. Infertilitet muškaraca.....</b>                            | <b>8</b>  |
| 3.1. Medicinska stanja koja utiču na plodnost muškaraca.....     | 8         |
| 3.1.1. Varikokela.....                                           | 8         |
| 3.1.2. Hipogonadizam.....                                        | 9         |
| 3.1.3. Retrogradna ejakulacija.....                              | 9         |
| 3.1.4. Antispermatozoidna antitela.....                          | 9         |
| 3.1.5. Infekcije.....                                            | 10        |
| 3.1.6. Kriptorhizam.....                                         | 10        |
| 3.2. Uticaj ishrane na plodnost.....                             | 10        |
| 3.2.1. Obrazac ishrane i njegova uloga u neplodnosti.....        | 11        |
| 3.2.2. Ugljeni hidrati, masti i proteini.....                    | 11        |
| 3.3. Značaj fizičke aktivnosti na plodnost.....                  | 14        |
| 3.4. Dijagnostički postupci metode.....                          | 17        |
| 3.4.1. Analiza spermograma.....                                  | 18        |
| 3.4.2. Antispermatozoidna antitela.....                          | 19        |
| 3.4.3. Genetski skrining testovi.....                            | 19        |
| 3.4.4. Hormonski status.....                                     | 20        |
| 3.4.5. Leukociti u spermi.....                                   | 22        |
| 3.4.6. Analiza urina nakon ejakulacije.....                      | 22        |
| 3.4.7. Ultrazvuk.....                                            | 22        |
| 3.4.8. Biopsija testisa.....                                     | 22        |
| 3.4.9. Vazografija.....                                          | 23        |
| 3.4.10. Kompjuterski potpomognuta analiza sperme (CASA).....     | 23        |
| 3.4.11. Test vezivanja hijalurona (HBA).....                     | 23        |
| 3.4.12. Postkoitalni test penetracije cervikalne sluzi.....      | 23        |
| 3.4.13. Test reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS).....             | 24        |
| 3.4.14. Test reakcije akrozoma.....                              | 24        |
| 3.4.15. Testovi integriteta/fragmentacije DNK spermatozoida..... | 24        |
| 3.5. Trenutne terapije i njihova ograničenja.....                | 25        |
| <b>4. Nutrigenetika i plodnost.....</b>                          | <b>26</b> |
| 4.1. Osnove nutrigenetike.....                                   | 26        |
| 4.2. Uticaj ishrane na genetske markere plodnosti.....           | 27        |
| 4.3. Geni značajni za plodnost muškaraca.....                    | 28        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.1. Geni uključeni u metabolizam makronutrijenta i drugih bioaktivnih sastojaka hrane.....             | 28        |
| CD36 (Cluster of differentiation 36): rs1761667.....                                                      | 28        |
| TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2): rs7903146, rs12255372.....                                        | 28        |
| NOS3 (Nitric Oxide Synthase 3): rs1799983.....                                                            | 29        |
| FADS (Fatty Acid Desaturase).....                                                                         | 29        |
| APOA2 (Apolipoprotein A2): rs5082.....                                                                    | 30        |
| PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma): rs1801282.....                        | 31        |
| GLUT2 (Glucose transporter 2): rs5400.....                                                                | 31        |
| HLA (Human leukocyte antigens): rs2395182, rs7775228, rs2187668, rs4639334, rs7454108, rs4713586...<br>32 |           |
| CYP1A2 (Cytochrome P450 1A2 ): rs7662551; rs2472300.....                                                  | 32        |
| MCM6 (Minichromosome Maintenance Complex Component 6) rs4988235 i LCT (Lactase).....                      | 33        |
| 4.3.2. Geni uključeni u metabolizam mikronutrijenata.....                                                 | 34        |
| BCMO1 (Beta-Carotene Oxygenase 1): rs11645428.....                                                        | 34        |
| FUT2 (Fucosyltransferase 2): rs602662, rs601338.....                                                      | 34        |
| MTHFR (Methylenetetrahydrofolate reductase): rs1801133.....                                               | 35        |
| GSTT1 (Glutathione S-transferase theta 1): insercija ili delecija.....                                    | 35        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu vitamina D.....                                                         | 36        |
| GC (GC Vitamin D Binding Protein): rs7041; rs4588.....                                                    | 38        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu vitamina E.....                                                         | 38        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu koenzima Q10.....                                                       | 39        |
| GSTM1 (Glutathione-S-transferaze M1).....                                                                 | 39        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu holina.....                                                             | 40        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu betaina.....                                                            | 40        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu gvožđa.....                                                             | 40        |
| ACE (Angiotensin-converting enzyme) rs4343.....                                                           | 41        |
| Geni koji učestvuju u metabolizmu selena.....                                                             | 42        |
| SLC39 i SLC30: (Solute-carrier genes).....                                                                | 42        |
| 4.4. Različiti režimi ishrane i njihov uticaj na zdravlje spermatozoida.....                              | 43        |
| 4.4.1. Mediteranska ishrana.....                                                                          | 43        |
| 4.4.2. Dijeta sa povećanim unosom proteina.....                                                           | 45        |
| <b>5. Šta je epigenetika i kako može uticati na plodnost?.....</b>                                        | <b>45</b> |
| 5.1. Osnove epigenetike.....                                                                              | 45        |
| 5.2. Epigenetske modifikacije u kontekstu plodnosti.....                                                  | 46        |
| 5.3. Metilacija DNK.....                                                                                  | 46        |
| 5.4. Uticaj ishrane i suplementacije na epigenetske promene.....                                          | 47        |
| <b>6. Kliničke implikacije i preporuke.....</b>                                                           | <b>48</b> |
| 6.1. Primena nutrigenetike u kliničkoj praksi.....                                                        | 48        |
| 6.2. Preporuke za ishranu i suplementaciju u kontekstu poboljšanja plodnosti muškaraca.....               | 49        |
| 6.3. Budući pravci i ispitivanja.....                                                                     | 49        |
| <b>7. Zaključak:.....</b>                                                                                 | <b>50</b> |

# 1. Uvod

## 1.1. Značaj istraživanja muške neplodnosti

Neplodnost u svetu danas pogađa preko 186 miliona ljudi i smatra se da je u proseku polovina uzrokovana neplodnošću muškaraca. U poslednjih četrdeset godina došlo je do pada koncentracije spermatozoida i njihovog ukupnog broja, a broj parova koji se bore sa sterilitetom raste iz godine u godinu. Andrologija se u nauci prvi put pominje kroz časopis osnovan je 1969. Od tada do danas, došlo se do veoma značajnih saznanja i podataka za unapređenje muškog reproduktivnog zdravlja. Međutim u nekim kulturama neplodnost muškaraca i dalje nailazi na prepreke (Calogero i dr., 2023) Infertilitet je oduvek bio tema o kojoj se nerado govorilo. Prateći istorijske tokove, ukoliko se osvrnemo na kasni 19. vek i saznanja koja su usledila nakon otkrića mikroskopa, primetićemo da je prikupljanje uzoraka sperme bilo ometano od strane uplita i uticaja religije. S toga je istoričarka Christina Benninghaus sa Univerziteta u Kembridžu zaključila da su „Medicinski i religiozni prigovori protiv masturbacije ozbiljno su ometali prikupljanje sperme. Muškarcima je bilo teško da prihvate dijagnozu koja je uništila njihove nade da će imati decu i izgledalo je kao da to ugrožava njihovo telesno iskustvo moći.”( University of Cambridge, 2014). Pojedine klinike za biomedicinski potpomognutu oplodnju nemaju stručnjake koji se bave muškim reproduktivnim zdravljem, već se to smatra „problemom žena“. Slična situacija je i u Srbiji, gde u kliničkim timovima ne postoje urolozi, androlozi, genetičari koji bi doprineli otkrivanju i/ ili otklanjanju uzroka neplodnosti. Mnogo veći broj studija bavi se ženskim reproduktivnim zdravljem i ispitivanjem neplodnosti kod žena. Čak su i društveni mediji i savremeni načini informisanja poput društvenih mreža, podkasta, emisija, online portali, video platforme i striming servisi lišeni informacija o muškoj neplodnosti iz iskustvenog muškog ugla, dok je žensko iskustvo znatno zastupljenije. Kao rezultat svega ovoga imamo temu koja se i dalje smatra tabuom, sa kojom muškarci i kada se susretnu ne mogu da se poistovete, niti da nađu krug podrške u zajednici onih koji se susreću sa problemom neplodnosti. (Carson, 2015)

Konvencionalna analiza sperme ostala je do danas rutinski dijagnostički test od kog se polazi. Međutim postoje sve veći zahtevi za razumevanjem različitih uzroka neplodnosti i za implementiranjem multidisciplinarnosti. Značajan uzor neplodnosti je svakako i genetska uslovljenost. Smatra se da 15% muškaraca koji se bore sa neplodnošću imaju neku vrstu genetskog opterećenja, koja direktno utiče na plodnost. Genetika muške neplodnosti je vrlo složena zbog samog podatka da u spermatogenezi učestvoje više od 2300 gena. To govori da trenutni testovi za procenu neplodnosti nisu potpuno dovoljni za precizno određivanje dijagnoze, te se traga za daljim rešenjima. (Calogero, 2023) Drugi uzroci neplodnosti tiču se različitih medicinskih stanja, mogu postojati i udruženi komorbiditeti, ali svakako da životni stil i faktori životne sredini nisu ni malo

zanemarljivi. Ishrana, fizička aktivnost, suplementacija, zagađenost vode, vazduha i namirnica, pesticidi u hrani i mikroplastika koja je sve prisutnija u ekosistemima su teme koje već decenijama interesuju naučnike širom sveta kada je tema plodnosti u pitanju, a biće svakako i tema ovog rada kroz razumevanje povezanosti genetike, ishrane i suplementacije.

## 1.2. Ciljevi i hipoteze rada

Cilj ovog preglednog rada je da kroz dostupne naučne podatke iz literature zaključim kako različiti makro i mikronutrijenti u ishrani utiču na plodnost muškaraca. Da li suplementacija pojedinačna i/ili kombinovana utiče na kvalitet reproduktivnog materijala muškaraca? Kako ishrana utiče na ekspresiju gena i epigenetske modifikacije u kontekstu plodnosti?

Hipoteze od kojih polazim su:

Poboljšanje ishrane i doziranje fizičke aktivnosti doprinosi plodnosti, naročito kod muškaraca sa idiopatskom ili sekundarnom neplodnošću.

Personalizovana suplementacija utiče na poboljšanje kvaliteta reproduktivnog materijala.

Epigenetske promene utiču na spermatogenezu, kvalitet i pokretljivost spermatozoida.

## 1.3. Organizacija rada

Ovaj pregledni rad organizovan je u pet celina koje obuhvataju biologiju spermatogeneze, uzroke infertiliteta, trenutne dijagnostičke pristupe i terapije, kao i uticaj ishrane i fizičke aktivnosti na plodnost. Poseban fokus stavljen je na primenu nutrigenetike u svrhu istraživanja plodnosti, kao i istraživanje koliko ishrana i suplementacija igraju ulogu u epigenetičkim mehanizmima.

# 2. Spermatogeneza

## 2.1. Biologija spermatogeneze

Spermatogeneza je složen sled molekularnih događaja koji u proseku traju 74 dana i za to vreme počinje proliferacija spermatogonijalnih matičnih ćelija, a rezultira njihovom konačnom diferencijacijom u zrele spermatozoide. Sastoji se od tri faze: mitoze spermatogonije, mejotičke podele spermatocita i spermiogeneze. (Du i sar., 2021) Spermatogeneza započinje mitotskom deobom spermatogonija u pubertetu. Postoje dve vrste spermatogonija: spermatogonijalne matične ćelije koje su tamne i svetle spermatogonije. Spermatogonije tipa A nizom deoba stvaraju dovoljan broj tamnih A ćelija za reprodukciju. Sledećom mitotičkom deobom tamne A spermatogonije daju svetle A spermatogonije koje nastavljaju dalje sa svojom procesom mitoze dajući niz kćerki ćelija koje su povezane tankim citoplazmatskim vezama poput perli na ogrlici. Nakon nekoliko deoba od A spermatogonija nastaju B spermatogonije koje dalje prelaze u drugu fazu ciklusa. Otpočinjanjem

mejoze odnosno redukcijom diploidnog broja hromozoma i razmenom genetičkog materijala između homologih hromozoma, obezbeđuje genetsku varijabilnost u jedinstvenost svakog budućeg spermatozoida. Primarni spermatociti nastaju još jednom mejotičkom deobom B spermatogonija nakon čega dolazi do replikacije odnosno udvajanja genetskog materijala i pripreme za mejozu. Sledeći korak u formiranju zrelih spermatozoida otpočinje mejotičkom deobom. Nakon prve nastaju sekundarni spermatociti, dok drugom dobijamo mlade spermatide koje se tokom spermiogeneze formiraju akrozom, kondenzuju jedra i formiraju flagelu uz značajno smanjenje citoplazme obrazujući ćelijsku formu spermatozoida kakvu poznajemo. Konačnu maturaciju i fertilnost spermatozoidi stiču kretanjem kroz smene kanaliće, efemerne kanaliće i epididimis, podležući brojnim morfološkim i funkcionalnim promenama. (Nikolić i sar., 2018)

Faktori koji ometaju bilo koji od ovih procesa dovode do neplodnosti koja se manifestuje kroz smanjen broj spermatozoida u ejakulatu (azoospermija, oligospermija), poremećaj u pokretljivosti ( astenozoospermija ) ili kroz morfološke abnormalnosti spermatozoida (teratozoospermija). (Sun i dr., 2022)

## 2.2. Hormonska regulacija plodnosti

Testosteron se smatra glavnim muškim hormonom odgovornim za seksualnu i reproduktivnu funkciju. Međutim ne treba zanemariti uticaj i na zdravlje kostiju, ponašanje i sastav tela. Jedna od najčešće diskutovanih interakcija u literaturi je patološki odnos između deficita testosterona i razvoja metaboličkih poremećaja uslovljenim delimično načinom života. Nekoliko studija je pokazalo jasnu povezanost između metaboličkih bolesti i postojanja hipogonadizma. Ustanovljeno je da disregulacija lučenja hormona menja propustljivost pora - akvaporina, specifičnih kanala značajnih za propustljivost vode i rastvorenih materija poput glicerola koji je ključan za pojedine ćelijske funkcije. Smatra se da akvagliceroporini, koji pripadaju podfamiliji ovih transmembranskih pora, imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida, modulišući lipolizu i lipogenezu. Za stvaranje spermatozoida kroz sve njegove faze je važna pravilna difuzija vode i glicerola posredovana ovim kanalima. Da bismo razumeli značaj holesterola važno je da razumemo metabolički put geneze. Testosteron pripada određenoj klasi steroidnih hormona koje zovemo androgeni. Sintetišu se u nadbubrežnim žlezdama i gonadama bivajući odgovorni su za razvoj polnih karakteristika. Aromatizacijom testosteron i drugi androgeni mogu da učestvuju u procesu stvaranja 17- $\beta$  estradiola, još jednog ključnog hormona u muškom reproduktivnom sistemu. Njegova uloga ogleda se u modulaciji libida, erektilne funkcije i spermatogeneze.

Smatra se da je osovina hipotalamus - hipofiza - gonade koja je regulisana sistemom negativne povratne sprege najodgovornija za mušku plodnost, zbog čega je važno prilikom uspostavljanja dijagnoze utvrditi postojili bilo kakav prekid ili ometanje rada ove ose. (Nunes i sar., 2023)

Stimulusi iz spoljašnje i unutrašnje sredine dospevaju u centralni nervni sistem i stimulišu hipotalamus koji potom podstiče proces integracije svih dospelih signala. Kao rezultat ovoga imamo ekspresiju kisspeptina, proteina u hipotalamusu, koji su odgovorni za regulaciju sekrecije gonadotropin - oslobađajućeg hormona (GnRH) u hipotalamusu. (Pinilla i dr., 2008) Prednji režanj hipofize koji biva stimulisan ovim hormonom počinje sa proizvodnjom folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) koji ulaze u sistemsku cirkulaciju delujući na endokrine ćelije koje se nalaze u gonadama. U njima podstiču lučenje testosterona i 17-β estradiola. Gore pomenuti luteinizirajući hormon (LH) smatra se glavnim hormonom odgovornim za diferencijaciju i proliferaciju Lejdigovih ćelija. Nakon toga testosteron difunduje u seminiferne tubule gde se odvija spermatogeneza. (Basaria S., 2014) Folikulostimulirajući hormon (FSH) sa druge strane zadužen je spermatogenezu od puberteta i u odraslom dobu, kao i za očuvanje veličine testisa i broja živih spermatozoida. FSH i testosteron vezuju se za receptore na površini Sertolijevih ćelija koje obezbeđuju odgovarajuću nutritivnu sredinu za stvaranje spermatozoida i obezbeđivanje integriteta krvno-testisne barijere. (Nunes i sar., 2023) Testosteron u cirkulaciju ulazi vezan sa albuminom u serumu odnosno globulinom koji vezuje polne hormone. (Lamm i sar., 2016) Njegovo delovanje posredovano je konverzijom u dihidrotestosteron (DHT) pomoću 5-α-reduktaze ili u 17-β estradiol pomoću aromataze, ili direktno, preko njenog vezivanja za androgene receptore. Sa druge strane, estradiol se vezuje za estrogenske receptore, inhibirajući neurone koji proizvode kisspeptin, čime se zaustavlja proizvodnja FSH i LH blokiranjem delovanja GnRH, zatvarajući ciklus stvaranja hormona. (Skorupskaite i dr., 2014.)

Iz svega pomenutog može se zaključiti da je spermatogeneza jedan vrlo složen hormonalni kaskadni sistem i kada na bilo kom njegovom delu postoji opstrukcija, održavanje muške reproduktivne i seksualne funkcije je ugroženo. Ono što je veoma zanimljivo je to da se u literaturi mogu pronaći podaci koji ukazuju na to da lučenje metaboličkih hormona kao što je leptin, takozvani hormon sitosti, jedan od disruptora lučenja gonadotropin oslobađajućeg hormona i dovodi do inhibicije steroidogeneze, što je veoma zanimljivo za dalje istraživanje. (Nunes i sar., 2023)

### 2.3. Genetski faktori koji utiču na spermatogenezu

Značajan udeo u neplodnosti muškaraca je svakako genetski faktor o kom se još uvek nedovoljno govori u Srbiji, niti se genetika nosilaca mutacija detaljno ili na vreme ispituje. Obično su nemogućnost održavanja zdrave trudnoće i spontani gubici ploda indikacija za ispitivanje uzroka neplodnosti kod parova. Važno je istaći da se preventivnim genetičkim savetovanjem mogu utvrditi brojni uzroci neplodnosti koji mogu usmeriti lekare za dalju primenu metoda biomedicinski potpomognute oplodnje. Promene u naslednom materijalu se odnose na brojne hromozomske numeričke i strukturne aberacije, pojedinačne nukleotidne polimorfizme, parcijalne gubitke

genetskog materijala, promene u genima vezanim za X hromozom, mikrolecije i mikroduplikacije, kao i fragmentacija DNK, odnosno jednostruko ili dvostruko prekidanje lanca DNK lanca koji dovode do promena genetskom materijalu.

#### 2.3.1. Promene u broju hromozoma

Testom aneuploidije sperme može se ustanoviti poremećaj u broju hromozoma, bilo da je taj broj ispod ili iznad uobičajenog. Na ovaj način nastaju dobro poznati sindromi u autozomima Daunov, Patau i Edvardsov sindrom. Pored numeričkih autozomalnih hromozomskih aberacija postoje i abnormalnosti polnih hromozoma Turnerov sindrom kod žena sa manjkom X hromozoma i Klinefelterov kod muškaraca koji u višku imaju X hromozom. Nosioци ovih mutacija imaju različite anatomske i fiziološke promene. Neke od ovih sindroma prati i mentalna retardacija i smanjena plodnost.

#### 2.3.2. Promene u strukturi hromozoma

Strukturne hromozomske aberacije ne podrazumevaju gubitak u broju hromozoma već promene u redosledu gena uzrokovane prekidom na takozvanim fragilnim mestima. Javljaju se u vidu duplikacija koje predstavljaju udvajanja segmenta DNK, delecija koje predstavljaju nedostatak dela hromozoma, insercija odnosno umetanje segmenta DNK u deo hromozoma gde inače ne pripada i translokacija tj. premeštanje dela hromozoma na drugi hromozom. (World Health Organisation, 2021) Ukoliko se dva hromozoma prelome i premeste deo naslednog materijala sa jednog na drugi hromozom, bez gubljenja materijala, reč je o recipročnoj translokaciji. Ukoliko pak usled preloma dolazi do gubitka i viška genetskog materijala na nekom drugom hromozomu reč je o nebalansiranim translokacijama. Oba tipa mogu uzrokovati promene u genetskom materijalu potomaka, a nosioci balansiranih translokacija su smanjeno fertilni iako praktično nema ni gubitka ni viška genetskog materijala.

#### 2.3.3. Promene u pojedinačnim genima

Pored navedenih promena strukturnih i numeričkih na nivou hromozoma, postoje i promene na nivou jednog gena koje takođe mogu uticati na plodnost muškaraca. Poremećaji u samo jednom genu mogu da uzrokuju neplodnost muškaraca. Nekoliko autozoma i polni hromozomi kao i promene na njima su od suštinskog značaja za plodnost.

### **Kalmanov sindrom**

Kalmanov sindrom je rezultat nefunkcionisanja veze između hipofize i hipotalamusa. Karakteriše ga kongenitalni hipogonadotropni hipogonadizam i sekundarni hipogonadizam. Geni koji su odgovorni za nastanak ovog sindroma, odnosno promene u njima su gen *ANOS1* (*anosmin-1*) takođe poznat kao *KAL1*, zatim *FGFR1* (Fibroblast growth factor receptor 1) poznatiji i kao (*KAL2*), *PROKR2* (prokineticin receptor 2) i *PROK2* (prokineticin 2).

- *SRY* gen (sorcin) je član grupe gena koja određuju sudbinu bipotencijalne gonade, određujući pol, samim tim promene u njeu mogu uticati i na seksualnu i reproduktivnu funkciju. (Jedidi i dr., 2018)

### **Mutacije koje utiču na strukturu i funkciju spermaozoida**

Mutacije utiču na funkcionalnu sposobnost spermatozoida, njihovu morfologiju i/ili na njihovu primarnu proizvodnju. Primer stanja gde mutacija dovodi do promene u morfološkom obliku spermatozoida, te samim tim utiče na njegovu sposobnost da izvrši oplodnju je globozoospermija. Pacijenti sa ovakvim poremećajem proizvode spermatozoide čije su glave ovalnog oblika, bez akrozoma sa nedekvano organizovanim središnjim delom koji se manifestuje kao višak zaostale citoplazme.

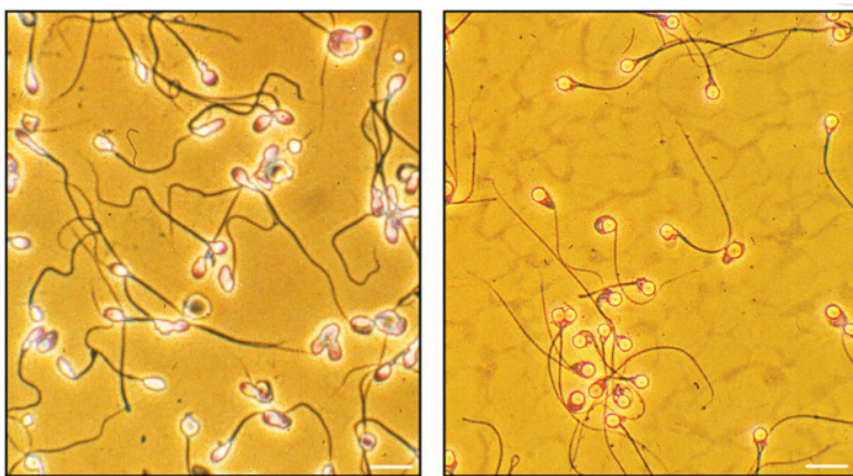


Figura 1: Mikrografija ljudske sperme. Na levoj slici je prikazan je normalan izgled sperme, dok se na desnoj slici jasno vide morfološke promene u spermatozoidima u vidu globozoospermije. (Aiken i Baker, 2020)

Ono što je karakteristično za globozoospermiju je da spermatozodi imaju razvijene flagele i pokretljivost, međutim ono što ometa oplodnju je nemogućnost vezivanja za zonu pelucidu na jajnoj ćeliji zbog nepostojanja akrozoma. Parovi koji imaju problem sa globozoospermijom imaju znatno nižu stopu oplodnje koja se može prevazići intracitoplazmatskom injekcijom spermatozoida (ICSI). Ovakvim spermatozoidima nedostaje fosfolipaza C zeta (PLC $\zeta$ ) koja upravlja aktivacijom oocite. Ovakvo stanje je uzrokovano je promenama u tri gena: *SPATA16* (spermatogenesis associated 16), *PICK1* (Protein interacting with C kinase-1), *DPY19L2* (dpy-19 like2). Promene u *DPY19L2* su dominantne i u najvećem broju slučajeva jer ih uzrokuju ih nealelne hromozomske rekombinacije između LCR (low copy repeats) sekvenci. (Aiken i Baker, 2020)

Makrozoospermija je još jedan poremećaj uzrokovan promenama u genima i to mutacijom *AURKC* gena (aurora kinaza C). Karakteriše se uvećanim glavama i višestrukim flagelama. Ova mutacija je

mного prisutnija u populaciji Severne Afrike nego u drugim delovima sveta. Makrozoospermija je zastupljena kod ljudi koji su homozigotni recesivni nosioci mutacije.

Morfologija spermatozoida može biti narušena i defektima glave koji se označavaju kao acefalični spermatozoidi. Mutacije koje dovode do ovog fenotipa uzrokovne su mutacijama u genu *PMFBP1* (Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1), *TSGA10* (testis specific 10). Promene u *SUN5* (SUN domain- containing protein 5) genu su najčešće u humanoj populaciji i ujedno se najlakše prevezilazi ICSI tehnikom biomedicinski potpomognute oplodnje, dok druge mutacije poput *TSGA10* i *CEP112* (centrosomal protein 12) prave oštećenja u centriolama spermatozoida. Ova oštećenja su veoma značajna jer su centriole muškaraca zadužene za organizaciju deobe budućeg embriona. Iako dođe do vantelesne oplodnje nazalost dalje pravilno razvijanje embriona do stadijuma blastociste biće onemogućeno. (Aiken i Baker, 2020)

Funkcionalnost spermatozoida može biti upitna zbog defekta repa koji je takođe uzrokovan mutacijama u genima koje dovode do astenozoospermije. Mutacije u nekoliko gena kandidata uključujući *CCDC40* (coiled-coil domen 40), *DNAH1*, *DNAH7*, *DNAH5*, *DNAH11* (*Dynein* axonemal heavy chain 1, 7, 5, 11), *DNAH1* (*Dynein* axonemal intermediate chain 1), *LRRC6* (Leucine Rich Repeat Containing 6), *ZMIND10* (Zinc Finger MYND-Type Containing 10), *ARMC4* (Armadillo repeat containing 4) i *TTC12* (Tetratricopeptide Repeat Domain 12) uzrokuju primarne cilijarne diskinezije. Ove diskinezije utiču na sve cilijarne strukture u telu, ne samo na spermatozoide. Najreprezentativniji primer cilijarnih diskinezija je Kartegenov sindrom koji se karakteriše potpunim odsustvom pokretljivosti spermatozoida, ali i nemogućnošću embrionalnih cilija da pomeri srce na levu stranu. Ova bolest se nasleđuje na autozomano recesivan način, uz učestće više od 40 gena, te mutacija u svakom od njih može potencijalno da dovede do problema sa začećem koji se može prevazići korišćenjem različitih tehnika biomedicinski potpomognute oplodnje. (Aitke i sar., 1983)

### **Mutacije koje utiču na testise i izvodne kanale**

Azoospermija je potpuni nedostatak spermatozoida je u 30% slučajeva uzrokovan opstrukcijom ekskuzivnih kanala koja je najčešće uzrokovana infekcijom, traumom ili operativnim zahvatima. Glavni uzrok ovakvog stanja je mutacija u *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genu, regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze koja dovodi do abnormalnog formiranja semevoda ili potpunog odsustva formiranja semevoda. Kod preostalih 70% pacijenata javlja se primarni neuspeh u spermatogenezi koji može biti uzrokovan i kancerogenim stanjima testisa. (Lissens i sar., 1996)

## Mutacije vezane za Y hromozom

Y hromozom nema svog homologa para nasleđenog od drugog roditelja, što je slučaj kod drugih hromozoma, pa i samog X hromozoma kod ženskog pola, te su i mogućnosti popavljanja oštećenja na molekulu DNK ograničena. Geni na Y hromozomu nalaze se u nekoliko kopija kako bi održali stabilnost. Upravo te kopije amortizuju, nastanak neravnoteže koja bi bila uzrokovana nagomilavanjem štetnih spontanijih mutacija. Umesto homologe (interhromozomske) rekombinacije koja je prisutna kod svih ostalih parova hromozoma, u Y hromozomu dešava se intrahromozomska rekombinacija koja je zasnovana na konverziji gena tako što se ciljani gen može rekombinovati palindromskom kopijom samog sebe. Nažalost, prisustvo palindromskih i retrvirusnih komponenti Y hromozomu dovode do lakšeg stvaranja delecija, odnosno gubitaka genetskog materijala kao posledica rekombinacije. Tri najpoznatije delecije Y hromozoma zovu se mikrolekcije faktora azoospermije (AZF) i označavaju se kao *AZF<sub>a</sub>*, *AZF<sub>b</sub>*, *AZF<sub>c</sub>*. Brisanje *AZF<sub>a</sub>* i *AZF<sub>b</sub>* dovode do potpune azoospermije koja nema mogućnost da se leči na bilo koji način. Međutim brisanje u genu *AZF<sub>c</sub>* karakterišu se teškom oligospermijom koja se uspešno prevazilazi izdavanjem pojedinačnih spermatozoida iz ejakulata ili biopsijom testisa u svrhu biomedicinski potpomognute oplodnje.

## 3. Infertilitet muškaraca

Infertilitet muškaraca može biti urokovao različitim faktorima, već smo pomenuli genetski faktor koji nije ni mao zanemarljiv. Međutim, pošto je genetika vrlo kompleksna i nepristupačna i dalje u punom kapacitetu, potrebno je tokom uspostavljanja dijagnoze neplodnosti otkloniti sumnje na brojna druga medicinska stanja koja takođe nezavisno ili udruženo mogu doprineti razvoju neplodnosti.

### 3.1. Medicinska stanja koja utiču na plodnost muškaraca

#### 3.1.1. Varikokela

Varikokela je vaskularna bolest koja pogađa 35-40% muškaraca. Karakteriše se uvećanjem vena u testisu i u najvećem broju slučajeva javlja se sa leve strane i to u čak 85% slučajeva. (Fang i dr., 2021.) Kod muškaraca sa varikokelom krv teče unazad u unutrašnju spermatičnu venu što dovodi do dilatacije krvnog suda. Ovo se dešava najčešće zbog urođenog nedostatka venskih zalistaka ili njihovog nedovoljnog razvijanja. Za ovo stanje ne postoje jasni klinički simptomi i najčešće se varikokela otkriva upravo u trenucima planiranja trudnoće, kada do nje spontano ne dolazi. (Abdulmassih Wood i dr., 2023) Opservacione studije ukazuju na veći broj spermatozoida sa fragmentovanim DNK, manjim ukupnim brojem spermatozoida, smanjenom pokretljivošću, i većim udelom spermatozoida koji imaju abnormalan oblik. (Franco i dr., 2023) Varikokela povećava unutrašnju temperaturu skrotuma i može uzrokovati smanjenje sinteze testosterona u Leidigovim ćelijama, smanjenje funkcije Sertolijevih ćelija i oštećenje germinalnih ćelija. Sertolijeve ćelije su takođe glavno mesto proizvodnje inhibina-B (Inh-B) koji deluje kao cirkulišući

modulator povratne sprege lučenja FSH od strane hipofize. Mnoge studije su pokazale inverznu korelaciju između cirkulišućih Inh-B i FSH kod plodnih i neplodnih muškaraca što bi objasnilo porast nivoa FSH kod muškaraca sa varikokelom. (Belastela i dr., 2022)

### 3.1.2. Hipogonadizam

Jedan od najčešćih endokrinoloških poremećaja je muški hipogonadizam čija se dijagnoza uspostavlja na osnovu simptoma i jutarnjeg nivoa testosterona. Obično se manifestuje erektilnom disfunkcijom, smanjenjem libida i ređim jutarnjim erekcijama, smanjenjem maljavosti, umorom, razdražljivošću i poremećajem sna.

### 3.1.3. Retrogradna ejakulacija

Da bismo razumeli fenomen retrogradne ejakulacije potrebno je spomenuti da se normalna ejakulacija se sastoji od niza uzastopnih događaja: emisionog transporta semenske tečnosti i sperme u uretru prostate, zatvaranja vrata bešike i ejakulacije semenske tečnosti u antegradnom pravcu. Aspermija koja se definiše kao potpuni nedostatak sperme koja se izbacila iz uretralnog kanala - naziva se još i suvi ejakulat. Ovo se može desiti ili zbog nemogućnosti proizvodnje sperme ili zbog nemogućnosti ejakulacije u antegradnom pravcu. Aspermija se može široko klasifikovati ili kao anejakulacija ili retrogradna ejakulacija. Najčešći uzroci anejakulacije su opstrukcija ejakulacionog kanala, operacije karlice kao što su prostatektomija, traume karlice, zračenje karlice, povrede kičmene moždine, neurološka stanja poput Parkinsonove bolesti i multiple skleroze, dijabetes melitusa i psihološki stres i anksioznost. Lečenje anejakulacije i retrogradne ejakulacije posebno je važno za muškarce koji planiraju porodicu, a jedina alternativa je hirurško vađenje sperme za upotrebu uz pomoć potpomognutih reproduktivnih tehnologija. (Mehta i Sigman, 2015.)

### 3.1.4. Antispermatozoidna antitela

Pretpostavlja se da su antispermatozoidna antitela (ASA) mogući faktor neplodnosti, pri čemu se ASA otkrivaju kod 5%–15% neplodnih muškaraca, ali samo kod 1%–2% plodnih. Razvojne abnormalnosti formiranja krvno-testisne barijere i traumatski poremećaj ove barijere mogu dovesti do stvaranja ASA kod muškaraca. Očekivano visoki nivoi ovih antitela se nalaze kod muškaraca sa istorijom traume testisa, varikokele, zauški, povreda kičmene moždine, urođenog odsustva semevoda i posledica vazektomije. Druga stanja povezana sa ASA uključuju biopsiju ili malignitet testisa, istoriju kriptorhidizma, prostatitis, polno prenosive bolesti i idiopatska stanja. Veruje se da ASA imaju negativan efekat na plodnost muškaraca tako što smanjuju izlaz sperme, pokretljivost sperme i aglutinaciju sperme, narušavanje sposobnosti spermatozoida da prođe u cervikalni sluz, ometanje plodnosti fagocitnim ćelijama u ženskom genitalnom traktu, narušavanjem reakcije akrozoma i vezivanja za zonu pelucidu. (Lu i dr. 2019)

### 3.1.5. Infekcije

Do 30 % neplodnih muškaraca ima prisustvo leukocita u spermi. Poreklo leukocita u ejakulatu je uglavnom iz epididimisa i povezano je sa narušenim imunitetom. Stoga su bakterijske i virusne infekcije jedne od uzročnika leukocitospermije kod neplodnih muškaraca, iako oni koji pohađaju androloške klinike često nemaju očiglednu simptomatsku infekciju. Više od 30 polno prenosivih infekcija, uključujući *Herpes simplex*, *Chlamidia trachomatis*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* i *Neisseria gonorrhoeae* identifikovani su kao patogeni koji uzrokuju povrede genitalija, infekciju semena, prostatitis, uretritis, epididimitis kod muškaraca. Ako je leukocitospermija uporna, može se razmotriti antibiotska terapija, nakon koje je pokazalo značajno poboljšanje u svim parametrima sperme. (Bai i dr. 2021)

### 3.1.6. Kriptorhizam

Kriptorhizam se jednostavno definiše kao odsustvo jednog ili oba testisa iz skrotuma. To je najčešći urođeni defekt muških genitalija. Javlja se kod oko 1% novorođenčadi starosti više od tri meseca i uprkos tome što je tako čest događaj, tačan uzrok kriptorhizma je i dalje nepoznat. Neplodnost je uočena kod pojedinaca koji imaju bilateralni, ali ne i jednostrani kriptorhizam. Praćenje uzorka jednostranih i bilateralnih slučajeva su otkrili da jednostrani slučajevi pokazuju normalnu stopu očinstva i normalnu koncentraciju spermatozoida. Utvrđeno je da je incidenca azoospermije kod jednostranog kriptorhizma bila 13%, ali je kod nelečenog bilateralnog kriptorhizma dostigla i do 89%. (Fawzy i dr. 2015)

### 3.2. Uticaj ishrane na plodnost

Prepoznavanje faktora koji utiču na plodnost muškaraca i žena je značajno za efikasno lečenje neplodnosti. Sve veću pažnju naučne javnosti zaobija upravo istraživanje uticaja ishrane, supelementaije, načina života i fizičke aktivnosti na plodnost kao i uticaj faktora sredine u kojoj živimo. Kombinacija visoke prevalencije neplodnosti i visokih troškova procedura biomedicinski potpomognute oplodnje motiviše da se pronađu najbolja moguća rešenja u predviđanju promenljivih faktora neplodnosti i da se dijagnozi pristupa multidisciplinarno. (Gaskins and Chavarro, 2018) Ishrana može imati pozitivan i negativan uticaj na plodnost žena i muškaraca, a nijanse zavise od kvalitativnih i kvantitativnih svojstava hrane, kalorijskog unosa i odnosa makronutrijenata u jelovnicima, pripreme hrane. Ne treba zanemariti ni unos mikronutrijenata kako putem hrane, tako i uzimanjem dodataka ishrani u vidu suplemenata. Prema poslednjim sazanjima mediteranska ishrana pokazuje izuzetno pozitivan efekat na plodnost. Sve više naučnih radova ukazuje a značaj korišćenja biljnih proteina u ishrani, zatim namirnica bogatim antioksidansima, vlaknima, ugljenim hidratima sa niskim do srednjim glikemijskim indeksom. (Łakoma i sar., 2023)

### 3.2.1. Obrazac ishrane i njegova uloga u neplodnosti

Obrasci ishrane koji nisu zasnovani na pravilnim principima se često dovode u vezu sa hroničnim nezaraznim bolestima koji su sve učestaliji u svetu i samim tim potencijalna prepreka ostvarivanju fiziološki zdrave trudnoće. (Khosrorad i dr., 2015) Način ishrane koji se može uvideti u razvijenijim zemljama i sve češće u zemljama u razvoju obiluje upotrebom crvenog mesa i mesnih prerađevina, hrane sa visokim sadržajem masti, rafinisanih šećera, slatkiša, mlečnih proizvoda sa visokim procentom masti, napicima sa velikom količinom dodatog šećera. U literaturi se ovakav način ishrane naziva još i zapadnjačkim. (Nazni, 2014) Ispostavilo se da upravo ovakvi obrasci negativno utiču na plodnost. Nasuprot tome mediteranska ishrana bazira se na unosu povrća, voća, mahunarki, žitarica, ribe, orašastih plodova i semenki. Maslinovo ulje je glavni izvor masti u mediteranskoj kuhinji. Pored povoljnog uticaja na plodnost žena i muškaraca, mediteranska ishrana doprinosi i smanjenu kardiovaskularnih oboljenja, pojavi kancera, smanjenju telesne mase i zastupljenosti insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma. Mnogi stručnjaci preporučuju mediteransku dijetu bogata povrćem i voćem parovima koji prolaze kroz ciklus vantelesne oplodnje, jer smatraju da se za čak 40% može povećati uspešnost samog postupka. (Łakoma i dr., 2023)

Studija koja objavljena 2007. godine predstavila je obrazac ishrane plodnosti koji se zasnivao na povećanom unosu biljnih proteina, povećanom unosu gvožđa i mononezasićenih masnih kiselina i ujedno značajnim smanjenjem trans masti i mlečnih proizvoda sa visokim procentom masti, kao i da se značajnije poveća unos ugljenih hidrata koji imaju nizak glikemijski indeks. (Chavarro i dr., 2007) Crveno meso i živina su pokazala negativan uticaj na plodnost jer su doprinosili anovulaciji kod žena, dok su biljni proteini smanjivali rizik od anovulatorne neplodnosti za čak 50% i izazivali slabiji insulinski odgovor u odnosu na proteine životinjskog porekla. (Chavarro i dr., 2008)

Biljna ishrana ima dobro objašnjene anti-inflamatorne efekte, naročito u domenu metabolizma mitohondrija. Mitohondrije su ćelijske organele veoma značajne za reproduktivne performanse muškaraca jer one doprinose pokretljivosti spermatozoida. Pored porekla namirnica, važna je i priprema hrane. Veganaska i vegeterijanska ishrana takođe može biti nezadrava ukoliko se priprema kao brza hrana, sa mnogo prženja, pečenja na vatri, dimljenja, uz obilatu, nebalansiranu upotrebu testenina i pekarskih proizvoda. (Łakoma i dr., 2023) S tim u vezi neophodno je obuhvatiti mnoge parametre kada pričamo o obrascima ishrane i njenom uticaju na plodnost pri planiranju jelovnika.

### 3.2.2. Ugljeni hidrati, masti i proteini

Metabolizam glukoze neophodan je za spermatogenezu. Odvija se na način da glukoza ulazi u spermatozoide olakšanom difuzijom putem glukoznih transportera koji se nalaze na ćelijskoj

membrani spermatozoida i dalje se koristi kao gorivo za pokretljivost spermatozoida. (Pecora i dr., 2023) Kod planiranja jelovnika koji imaju svrhu da poboljšaju plodnost trebalo bi voditi računa o metabolizmu glukoze i osetljivosti na insulin. Obroci koji imaju veliko glikemijsko opterećenje i sadrže namirnice sa visokim glikemijskim indeksom često dovode do metaboličkih komplikacija i mogu da povećaju rizik od insulinske rezistencije, dislipidemije, dijabetesa i oksidativnog stresa koji negativno deluju na plodnost i reproduktivnu funkciju. Oksidativni stres kod muškaraca smatra se glavnim uzročnikom neplodnosti. Hiperglikemija ne samo da smanjuje pokretljivost spermatozoida, već povećava rizik od imunoloških i hormonalnih poremećaja. Hipogonadizam javlja se kod velikog broja muškaraca koji su gojazni ili imaju insulinsku rezistenciju i dijabetes tipa 2. Konzumiranje namirnica sa visokim glikemijskim indeksom i nedovoljan unos vlakana su direktno povezani sa upalnim procesima u telu i sa neplodnošću oba pola. Konzumiranje zaslađenih gaziranih pića čak i među mladm populacijom muškaraca pokazalo se kao negativno kada je u pitanju pokretljivost spermatozoida. Pored mediteranske ishrane veliku pažnju u lečenju neplodnosti privukla je i ketogena dijeta koja je zasnovana na smanjenom unosu ugljinih hidrata. (Łakoma i sar., 2023) Kao glavni izvor energije za ćelije koriste se ketonska tela umesto glukoze. Ketonska tela nastaju oksidacijom masnih kiselina koja prevashodno mogu da koriste mozak, srce i skeletni mišići za obavljanje svojih funkcija. Nedavne studije na životinjama ustanovile su da ketonska tela u koja spadaju aceton, acetat i beta hidroksibutirat takođe mogu da koriste i spermatozoidi za svoje kretanje u nedostatku glukoze. (Pecora i dr. , 2023 ) Neke naučne studije pokazale su pozitivne rezultate u primeni ove dijetе kod ljudi koji su imali težnju za redukcijom telesne mase i problem sa insulinskom rezistencijom, međutim postoji manjak podataka o efikasnosti ove dijetе sa dugoročnim efektima na ljudsko zdravlje. (Łakoma i sar., 2023) Još jedna veoma važna komponenta u ishrani koja se istražuje radi uticaja na reproduktivne mehanizme je konzumacija masti. Pojedine frakcije masnih kiselina na različite načine utiču na podnost. Povećan, ali i nedovoljan unos masnih kiselina doprinose poremećajima plodnosti. Poznato je da trans-masne kiseline imaju najnegativniji uticaj na plodnost, pre svega jer kod žena utiču na poremećaj ovulacije razvoj insulinske rezistencije, zbog toga što imaju proinflamatorna svojsva i povećanje zapaljenskih markera. Kod muškaraca se pak učestala konzumacija trans-masnih kiselina u ishrani dovodi do smanjenja broja spermatozoida, a uočen je i smanjen kvaltet sperme. Glavni izvori ovih masnoća su brza hrana, pržena hrana, konditoski proizvodi, crveno meso, slane i slatke grickalice. (Łakoma i sar., 2023) Veruje se da je mediteraska ishrana povezana sa dobrim uticajem na plodnst muškaraca upravo zbog toga što ima niži nivo zasićenih masnih kiselina i veći unos mononezasićenih masnih kiselina i frakcije polinezasićenih masnih kiselina kojima pripadaju omega-3 i omega-6. (Cosmin Petre i dr., 2023 )Eslamian i saradnici 2015. godine došli su do zaključka da su trans-masne kiseline i zasićene masne kiseline povezane sa razvojem astenozoospermije, dok je drugačiji uticaj vezan za

omega-3 masne kiseline koje čak imaju svoju ulogu u formiranju ćelijske membrane spermatozoida, stimuliše proizvodnju hormona i oplodnju jajnih ćelija. (Eslamian i dr., 2015) Masti u ishrani dele se pre svega na masti biljnog i životinjskog porekla. Nakon toga sledeća podela bila bi na zasićene i nezasićene masti. Zasićene masne kiseline dele se na kiseline kratkog do srednjeg lanca (zasićeni buter (C4), kaproična (C6), kaprilna (C8), kaprinska (C10), undekanska (C11), laurinska (C12), i tridekanske (C13) kiseline) i masne kiseline dugog lanca (miristinska (C14), pentadekanoična (C15), palmitinska (C16), heptadekanska (C17), stearinska (C18), neadekanoična (C19), arahidna (C20), behenske (C22) i lignocerinske (C24) kiseline). Nezasićene masne kiseline dele se na mononezasićene i polinezasićene masne kiseline. Polinezasićene se dele dalje na omega-3 (dokosapentaenska kiselina (DPA), eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA), parinarna kiselina, alfa-linolenska kiselina i dokozaetrienska kiselina) i omega-6 masne kiseline (linolna kiselina, eikozadienska kiselina, arahidonska kiselina i dokozaetraenska kiselina).

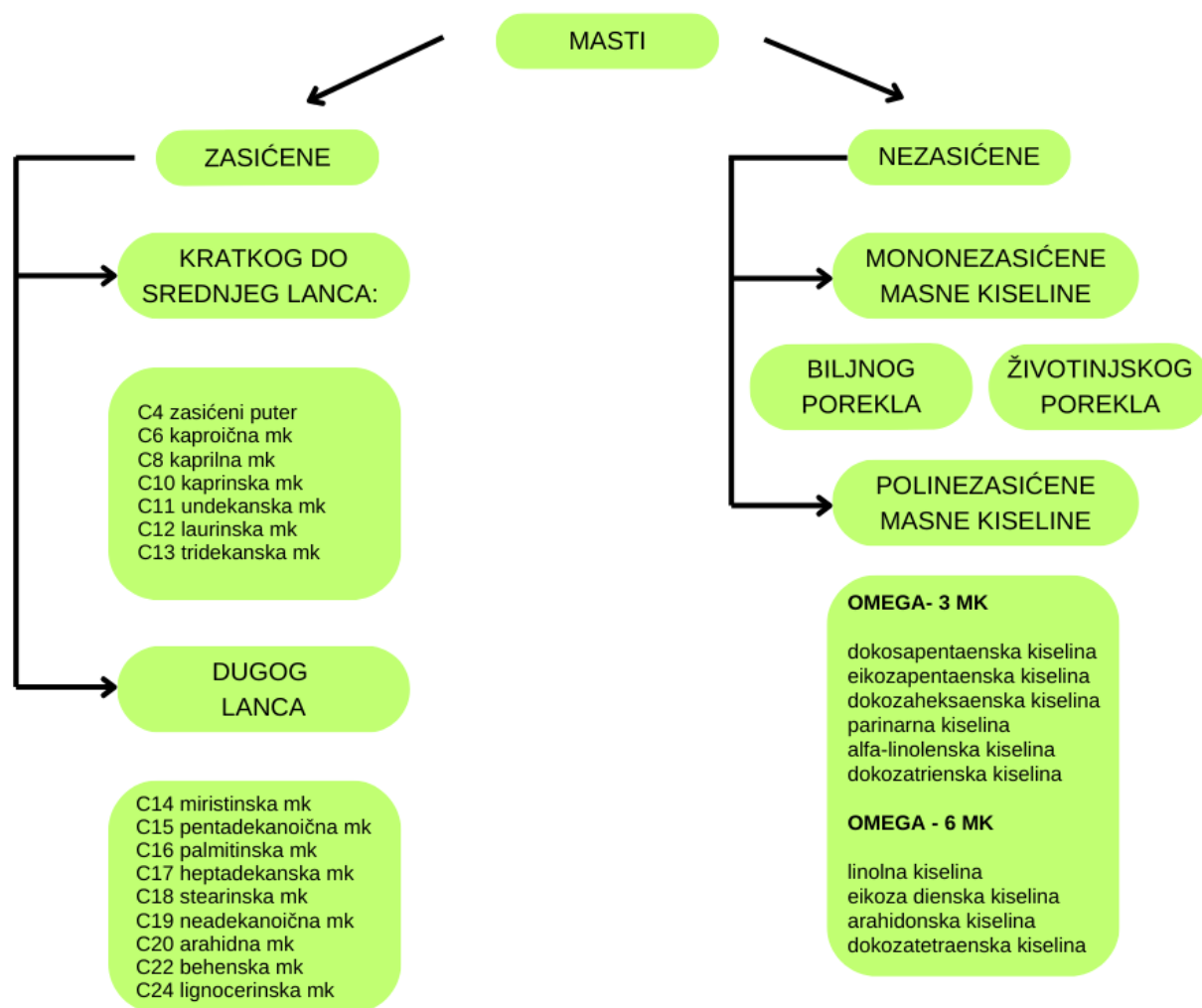


Figura 2: Podela masnih kiselina (Zhao i dr. , 2023)

Studija koja je sprovedena u Kini ukazuje na to da potrošnja masnih kiselina biljnog porekla smanjuje verovatnoću za razvijanje astenozoospermije, dok su mononezasićene masne kiseline životinjskog porekla povećavale ovu verovatnoću. Konzumacija stearinske, plamitoleinske i arahidonske zasićene kiseline dugog lanca su davale veće izgleda za razvijanje astenozoospermije. Ove masne kiseline nalaze se u proizvodima od crvenog mesa, životinjskoj masti, masnim ribama, punomasnim mlečnim proizvodima. (Zhao i dr. , 2023) Omega-3 masne kiseline su važna komponenta ćelijske membrane spermatozoida, doprinose pokretljivosti i fluidnosti membrane. Ove masne kiseline su podložne peroksidaciji lipida stvarajući oksidativni stress u semenu. Za održavanje upravo ovih masnih kiselina i čuvanje njihovog integriteta i funkcije u ćelijskoj membrane oocita i spermatozoida važni su vitamin E i vitamin C. Niža zastupljenost ovih vitamina i masnih kiselina dovodi do promena u morfologiji, smanjenom broju spermatozoida i smanjnom funkcionalnosti i razvika oligoastenozoospermije. Dijeta sa niskim sadržajem proteina je identifikovana kao potencijalni faktor muške neplodnosti jer dovodi do smanjenja težine testisa, epididimisa i semenih vezikula, kao i nižih vrednosti testosterona u serumu. Nasuprot ovoj tezi, rezultati nekoliko studija koje govore o povećanom unosu proteina i njegovom uticaju na plodnost su kontradiktorne, zbog čega treba biti pažljiv u kreiranju jelovnika. (Łakoma i sar., 2023) Mlečna hrana je u nekim studijama predstavljena kao hrana koja može ometati plodnost zbog visokog sadržaja galaktoze, šećera koji ulazi u sastav mlečnog šećera laktoze, kao i zbog visokog sadržaja estrogena. Studija iz 1994. godine sprovedena u 31 zemlji ustanovila je pad plodnosti među populacijom koja je imala veću potrošnju mleka. Kasnija studija pokazala je da žene koje su konzumirale 3 i više čaša dnevno mleka su imale 70% manje rizik od razvoja neplodnosti u odnosu na one koje nisu pile mleko. S tim u vezi ne mogu se trenutno doneti čvrsti dokazi i smernice koje će ukazati na značaj konzumiranja mleka i mlečnih proizvoda u svrhu poboljšanja plodnosti. Slična situacija je sa naučnim podacima koji su vezani za konzumaciju soje i proizvoda od soje u ljudskoj ishrani i njenom uticaju na plodnost. (Gaskins i Chavarro, 2018)

### 3.3. Značaj fizičke aktivnosti na plodnost

U lečenju neplodnosti primenjuju se različiti farmakoterapijski pristupi. Mnogi od njih su efikasni i zbog toga dobijaju na svojoj popularnosti. Međutim svaku farmakoterapiju prate i neželjeni efekti poput glavobolje, nesanice, vrtoglavice, pojačanog gubitka kose i višeplođnih trudnoća. Pojedini stručnjaci preporučuju i psihoterapijsku podršku tokom procesa lečenja neplodnosti baš zbog različitih psiholoških pritisaka. Ono što nikako ne smemo zanemariti je značaj fizičke aktivnosti za mentalno i fizičko zdravlje. Svetska zdravstvena organizacija prepisuje više od 150 minuta fizičke aktivnosti nedeljno u svrhu pozitivnog uticaja na plodnost. Smatra se da je fizička aktivnost jeftin i

univerzalan lek i naša kućna apoteka koja je svima dostupna u određenoj meri već po izlasku iz svoje kuće. Veliki broj meta - analiza potvrdilo je da dozirana fizička aktivnost značajno doprinosi poboljšanju sindroma policističnih jajnika i smanjuju rizik od razvoja endometrioze kod žena. Stoga je važno da se pitamo se da li fizička aktivnost doprinosi i poboljšanju plodnosti kod muškaraca. (Brinson i dr., 2023.) U radu Ramlau-Hansen i saradika iz 2007. godine nalaze se podaci koji ukazuju na to da je gojaznost žena i muškaraca povezana sa smanjenom stopom trudnoće i povećanom stopom gubitaka trudnoće kod parova koji prolaze kroz postupak biomedicinski potpomognute oplodnje. Gojaznost muškaraca je povezana sa nižim vezivanjem spermatozoida za receptore na membrani jajne ćelije i smanjenom stopom oplodnje tokom biomedicinski potpomognute oplodnje i smanjenim razvojem blastocista. Takođe je primećeno da je BMI muškaraca koji su sa svojim partnerkama ostvarili trudnoću bio značajno niži u odnosu na grupu pacijenata koji nisu. (Sharqawi i dr.,2022)

Testosteron je široko poznata determinanta mišićnog volumena, snage, funkcije i adaptacije na stres povezan sa vežbanjem kod ljudi, bilo da su mladi ili stariji. Važno je napomenuti da njegova uloga ide dalje od toga, jer testosteron može uticati na sastav tela, metabolizam glukoze i proteina, eritropoezu, reproduktivnu funkciju, kognitivne procese, i kod sportista i kod nesportista. Fiziološki efekat testosterona odnosi se na pojavu sekundarnih polnih karakteristika, maskulinizaciju, smanjuje stres učestvujući u kompeticiji i vezivanju za steroidne receptore koji su takođe receptori za kortizol, povećava aerobni i anaerobni kapacitet, kardiovaskularnu efikasnost, snagu i eksplozivnost, aktivnost enzima u mitohondrijama, povećava sadržaj fosfokreatina i stvaranje proteina, eritrocita, ima efekat na hormon rasta. Takođe pozitivno utiče na neuromišićnu provodljivost, smanjuje osećaj umora i percepciju negativnih emocija, povećava motivaciju za kompeticijom i agresivnost. Vežbanje koje je umereno često dovodi do prolaznog povećanja testosterona, dok sa druge strane izloženost intenzivnim i učestalim treninzima izdržljivosti može narušiti balans hipotalamusno-hipofizno gonadalne ose, što može dovesti do smanjenja ukupnog i slobodnog testosterona ili pak može ostati u nivou fiziološkog opsega. Da li je supresija testosterona vežbanjem rezultat fiziološke adaptacije na stres ili neželjena nuspojava, ostavlja se kao otvoreno pitanje. Najbolji tretman za hipogonadizam izazvan vežbanjem je smanjenje opterećenja i pažljivo doziranje fizičke aktivnosti ukoliko je ono previše intenzivno. (Sansone i dr. 2018)

Druga veoma važna tema pored fizičke aktivnosti je korišćenje androgenih anaboličkih steroida (AAS) prilikom vžbanja za ostvarivanje estetskih ciljeva, brže izgradnje mišićne mase i snage, a takođe i takmičarske prednosti. U savremenom svetu čini se da su jedan od glavnih motiva muškaraca za bavljenje svojim telom kroz fizičku aktivnost često estetski. U literaturi je dokazano da upotreba egzogenog testosterona ili drugih androgenih anaboličkih steroida ima supresivni efekat na hipogonado-hipotalamusno-gonadalnu osu (HHG). Hipogonadizam uzrokovan uzimanjem

androgenih anaboličkih steroida utiče na seksualno i reproduktivno zdravlje. Jedan od prvih simptoma može biti erektilna disfunkcija. Smatra se da do 2% neplodnih muškaraca upravo pati od hipogonadizma uzimanjem steroida egzogeno. Nizak nivo FSH usko je povezan sa smanjenim brojem spermatozoida u ejakulatu, a produžena upotreba AAS dovodi do smanjenja testisa usled tubularne atrofije uzrokovane supresijom HHG ose. Smatra se da lečenje i oporavak nakon uzimanja AAS može potrajati 12-24 meseca. Međutim, ozbiljne i dugoročne promene u seksualnom i reproduktivnom zdravlju mogu nastati ukoliko se AAS uzimaju tokom puberteta, kada u tom periodu dođe do supresije HHG ose. (Sansone i dr. 2018)

Iako mnogi podaci ukazuju na to da su faktori načina života važni za reproduktivno zdravlje muškaraca, u literaturi se mogu pronaći heterogeni rezultati različitih studija. Tako nedavno randomizovano kontrolisano ispitivanje istraživalo je indikatore muške reproduktivne funkcije nakon 24 nedelje intervalnog treninga visokog intenziteta (HIIT). Studija je vršena na 441 muškarcu koji su podeljeni u grupu koja vežba i grupu koja ne vežba. Kao rezultat intervencije došlo je do snižavanja proinflammatoryh citokina u semenu IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  i indikatora oksidativnog stresa, reaktivnih kiseoničnih radikala ROS, malondialdehida MAD i 8- izoprostana. Uočeno je poboljšanje integriteta DNK spermatozoida i stope začeća. Nekoliko još opservacionih studija potvrdilo je ove rezultate. Zapažanja koja su dobile 4 klinike za vantelesnu oplodnju bile su takve da su bolje rezultate imali sa parovima među kojima su muškarci bili fizički aktivni i sa manjim procentom telesnih masti. Prospektivna kohortna studija ispitivala je različite vrste fizičke aktivnosti u odnosu na parametre spermograma neplodnih muškaraca. Ispitanici koji su se bavili umerenom do jačom fizičkom aktivnošću imali su za 43% povećanu koncentraciju sperme. Kada se otišlo korak dalje u ispitivanju, naučnike je zanimalo koji je to vid ili kombinacija fizičke aktivnosti dovela do rezultata. Došlo se do zaključka da su muškarci koji su upražnjavali 1,5 puta nedeljno trening na otvorenom ili više od 2 puta nedeljno trening snage, da su imali koncentraciju sperme veću za 42% odnosno 25%. Nasuprot tome ispitanici koji su se bavili biciklizmom duže 1,5 sat nedeljno imali su za 34% nižu koncentraciju sperme u odnosu na pojedince koji to nisu činili. (Belladelli i dr. 2023) Vajz i saradnici radili su studiju sa 2261 muškarcem koji su pohađali tri različite klinike za asistiranu reprodukciju i zaključili da nema razlike u kvalitetu spermograma i vežbanja. Međutim u podgrupi muškaraca koji su prijavili isključivo vožnju bicikla kao vid svoje fizičke aktivnosti više od 5 sati nedeljno uočena je niža koncentracija spermatozoida. Ova veza ima biološku uverljivost jer je vožnja bicikla povezana sa genitourinarnim problemima, kao što su uklještenje nerva, erektilna disfunkcija, tromboza penisa, hematurija, torzija spermatične vrpce. Dve studije koje su pratile parametre spermograma kod biciklista na duge staze, u kojim je uočeno da postoje smanjen broj spermatozoida sa normalnom morfologijom i smanjenu pokretljivost spermatozoida. Još uvek nije utvrđeno da li je uzrok ovakvih promena povišena skrotalna

temperatura uzrokovana tesnom biciklističkom opremom ili dužinom trajanja fizičke aktivnosti ili pak posledica mehaničke traume. Kod sportista i rekreativaca koji su umereno vozili bicikl nije uočena ovakva korelacija. (Wise i dr. 2012). Aerts i saradnici su u svom sistematskom pregledu pratili različite studije koje su ispitivale efekat sportova izdržljivosti na kvalitet sperme sportista. Rezultati su pokazali da sportovi izdržljivosti sami po sebi ne utiču statistički značajno na apsolutne vrednosti parametara sperme koje su ostale iznad graničnih vrednosti koje je propisala svetska zdravstvena organizacija. Trčanje, biciklizam i triatlon ne utiču sami po sebi na spermatogenezu, ali mogu biti odlučujuć faktor kod muškaraca koji već imaju niže i izmenjene vrednosti parametara sperme. (Aerts i dr. 2024) Zanimljivo je osvrnuti se na još jedan vid fizičke aktivnosti a to je joga je poznata po svojim mnogostrukim efektima na zdravlje uključujući smanjenje stresa, poboljšanje cirkulacije, regulaciju hormona i jačanje mišića. Njene mnogostruke blagodeti za fizičko i psihičko blagostanje, dovele su Jadhava i saradnike na istraživanje uticaja upažnjavanje joge i joga nidre na reproduktivno zdravlje i to baš sa aspekta poboljšanja parametara sperme. Nihovo istraživanje obuhvatilo je samo jedan par koji je imao problem sa začećem, te samim tim je potrebno sprovesti dodatne studije koje bi istraživale uticaj joge na plodnost. Analizom spermograma i hormona ustanovljena je neplodnost muškarca. Muški partner praktikovao je jogu svakodnevno u trajanju od 60 minuta. Vežbe su obuhvatale joga asane, različite fizičke položaje tela, pranajame odnosno vežbe disanja i dane meditativne tehnike. Misija ovih naučnika nije bila da jogičkom praksom pojednostavi problematiku neplodnosti, već da ukaže na značaj holističkog pristupa lečenju infertiliteta. Nakon 12 nedelja povećana je ukupna pokretljivost spermatozoida i učestalost morfološki abnormalnosti se smanjila i približila referentnim vrednosima koje su preporučene od strane SZO. Pored spermograma urađena je ponovo i analiza hormona testosterona, FSH i kortizola, gde su vrednosti prva dva hormona ostale iste pre i posle jogičke prakse dok je vrednost kortizola opala nakon 12 nedelja, nakon čega je potvrđena trudnoća nakon inseminacije. Ograničenje ovog rada je svakako broj ispitanika, što zahteva dalja istraživanja i razmatranje multidisciplinarnog pristupa u lečenju neplodnosti, ali i značaja praćenja hormona stresa tokom procesa lečenja neplodnosti. (Jadhav i dr. 2024) U literaturi je takođe dokazano da rekreativna fizička aktivnost ima pozitivan ili neutralan efekat na kvalitet sperme, u zavisnosti od vrste, trajanja i intenziteta treninga. (Giudice i dr. 2024)

### 3.4. Dijagnostički postupci metode

Nema sumnje da je neplodnost bolest koja je uvrštena u Međunarodnu klasifikaciju bolesti sa određenom šifrom. Otuda se pojavljuje i sve više pitanja koja se odnose na to kako najadekvatnije i najefikasnije pomoći ljudima koji se susreću sa ovom bolesti. Kako što brže doći do prepoznavanja uzroka i na kraju krajeva kako olakšati parovima teret procedura koje nemaju uspeh. Najviše

korišćen test za procenu plodnosti muškaraca je svakako spermogram. Pored njega koriste se i antispermatozidna antitela, genetski skrining testovi nivoi hormona LH, FSH, prolaktina, testosterona, broj leukocita u spermi, analiza urina nakon ejakulacije, skrotalni, testikularni ili transrektalni ultrazvuk, biopsija testisa, vazografija. Takođe treba imati na umu da postoji duga lista testova koji nisu dokazani i nisu medicinski neophodni za dijagnostikovanje neplodnosti kod muških pacijenata. Tu spada trenutno i kompjuterski potpomognuta analiza sperme (CASA), test vezivanja hijalurona (HBA), postkoitalni test penetracije cervikalne sluzi, reaktivni test kiseonikovih vrsta (ROS), test reakcije akrozoma sperme i test integriteta/fragmentacije DNK sperme. (Szamatowicz M. i Szamatowicz J. 2020)

#### 3.4.1. Analiza spermograma

Spermogram predstavlja laboratorijsku analizu sperme pri kojoj se posmatra zapremina tečnosti, boja, prisustvo sluzi, ukupan broj spermatozoida, koncentracija kao i morfologija spermatozoida u ejakulatu. Njihova vijabilnost, oblik, pokretljivost. Sve ovo radi se u svrhu procene muškog faktora neplodnosti. (Sunder i Leslie, 2022) Uzimanje materijala za analizu vrši muškarac samomasturbacijom u ustanovi u kojoj se obavlja analiza ili u njenoj neposrednoj blizini. Najkasnije do 1 sat nakon masturbacije potrebno je dostaviti uzorak, kako bi se process likvefakcije posmatrao i odvijao pred očima embriologa koji vrši analizu. Preporuka je da muškarac najmanje 3, a najviše 7 dana apstinira pre davanja uzorka sperme kako bi podaci koje dobijamo bili najtačniji. Ono što takođe utiče na preciznost jeste da se analiza ponovi 2-3 puta i da je izvodi isti embriolog. Ukoliko rezultati testa ne pokazuju dobre rezultate, trebalo bi ponoviti analizu za 3 meseca kad se potpuno završi novi ciklus spermatogeneze. (Poland i dr. 1985) Prve preporuke Svetske zdravstvene organizacije po pitanju referentnih vrednosti parametara sperme izdati su 1980. godine, nakon čega su pretrpele nekoliko revizija. Od toga najznačajniju 1999. i 2010. godine. (de Moraes De Zorzi i dr. 2022)

Prema poslednjim podacima SZO, referentne vrednosti za spermogram su sledeće:

- Zapremina  $\geq 1,5\text{ml}$
- $\text{pH} \geq 7,2$
- Ukupan broj spermatozoida u ejakulatu  $\geq 39$  miliona
- Vitalnost  $\geq 58\%$  živih spermatozoida
- Progresivna pokretljivost  $32\%$
- Progresivna i neprogresivna pokretljivost ukupno  $\geq 40\%$
- Morfologija  $\geq 4\%$  normalnih oblika korišćenjem Tigerberg metode
- Nema aglutinacije spermatozoida
- Viskozitet  $\leq 2\text{cm}$  nakon likvefakcije

Opcione pretrage:

- Imunobead test  $< 50\%$  spermatozida vezanih u nanizane perlice
- Seminalni cink  $\geq 2,4$  mcmol/ejakulatu
- Semena fruktoza  $\geq 13$  mcmol/ejakulatu
- Test mešane antiglobulinske reakcije sa  $50\%$  pokretnih spermatozoida sa vezanim česticama
- Seminalna neutralna glukozidaza  $\leq 20$  milijedinica/ ejakulatu (ASRM Practice Committee, 2015)

Promene u vrednostima parametara sperme mogu da ukazuju na brojne uzroke, kao što su retrgradna ejakulacija, hormonski disbalans, opstrukcija ejakulacionog kanala, urođeno odsustvo semenvoda, zloupotreba androgena, patologija epididimisa, infekcija genitalnog trakta, upotreba cigareta i narkotika, genetski faktor. (Sunder i Leslie, 2022)

#### 3.4.2. Antispermatozoidna antitela

Antispermatozoidna antitela pripadaju grupi imunoglobulina reagujući protiv antigena koji se nalaze na površini spermatozoida. Zreli spermatozoidi nalaze se iza krvno - testikularne barijere i samim tim nisu izloženi muškom imunološkom sistemu. Kada je ova barijera iz nekog razloga narušena dolazi do kontakta spermatozoida i antitela. Ne utiču sva antispermatozoidna antitela na funkciju spermatozoida, ali neka od njih i te kako mogu da utiču negativno na akrozomalnu reakciju, pokretljivost i kapacitaciju. Relativno niska prevalencija antispermatozoidnih antitela podstakla je Američko društvo za reproduktivnu medicinu kao i američko i evropsko urološko društvo da ne podrže imunološke testove u dijagnostici neplodnosti muškaraca. (Gupta i dr. 2022)

#### 3.4.3. Genetski skrining testovi

Genetski skrining testovi u Srbiji još uvek ne spadaju u rutinsko testiranje radi utvrđivanja uzroka neplodnosti. Pojedini testovi nam mogu ukazati na genetsko opterećenje i na taj način usmeriti pažnju na drugačiji pristup lečenju, dok neke promene u genima mogu biti neotkrivene zbog limitiranosti samih testova. Cistična fibroza jedna je od najčešćih autozomno recesivnih bolesti. (Bienvenu i dr. 2020) S aspekta genetike postoji popisanih 2065 popisanih varijanti *CFTR* gena. Mnoge od njih su retke i javljaju se svega kod jedne ili dve osobe. (Sharma i Cutting, 2021.) Većina muškaraca sa cističnom fibrozom ima urođeno bilateralno odsustvo semenovoda. Posledično, 97–98% muškaraca rođenih sa cističnom fibrozom stvara spermatozoide, ali tih spermatozoida nema u spermi zbog nedostatka anatomskeg kanala kroz koji spermatozoidi prolaze iz testisa u uretru. Većina muškaraca sa ovom bolešću će se morati podvrgnuti nekoj od metoda asistiranog reprodukcije. Prvi korak je hirurško vađenje sperme ili aspiracija sperme testisa (poznato i kao perkutana ekstrakcija sperme epididima [PESA], ekstrakcija sperme testisa [TESA], mikrohrurška aspiracija sperme iz epididima [MESA]. (Jain i dr. 2024)

Kariotip predstavlja kompletan hromozomski set jedne osobe koji se sastoji od 46 hromozoma, tj. 23 para. Kariotip se koristi za otkrivanje hromozomskih abnormalnosti bilo u broju ili strukturi hromozoma. Većina muškaraca sa azoospermijom ili oligospermijom ima potpuno normalan nalaz kariotipa. Iako možda kariotipizacijom ne uočavamo hromozomsku abnormalnost, to ne znači da genetika i dalje nema udela u infertilitetu, već da je maskirana mozaicizmima i da je potrebno dodatno proveriti druge analize i metode. Poteškoće u identifikovanju mozaicizama su prisutne jer ne postoje karakteristične fenotipske karakteristike nosilaca. (Stormont i Deibert 2021)

#### 3.4.4. Hormonski status

Hormonski faktori koji utiču na plodnost kod oba pola su brojni. Sve više pažnje se posvećuje i problemu gojaznosti. Adipociti deluju kao endokrini organ, a njihov višak promoviše poremećaje osovine hipotalamus-hipofiza-testisi. Već smo pomenuli da hipotalamus i hipofiza kontrolišu i regulišu pravilno funkcionisanje endokrinih žlezda. Gonadotropni put je posebno važan u slučaju plodnosti i svako ometanje rada hipotalamusno-hipofizno-gonadalne ose remeti reproduktivnu funkciju. Na funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema utiču i hormoni kao što su estradiol (E2) i prolaktin. Estradiol, koji proizvode i testisi i periferna konverzija testosterona, je snažan inhibitor LH i FSH. S druge strane, prolaktin, inhibirajući proizvodnju GnRH, smanjuje koncentraciju LH i testosterona, što rezultira hipogonadizmom. Kortizol, zauzvrat, inhibira proizvodnju gonadotropina, što uzrokuje smanjenje proizvodnje testosterona u Leidigovim ćelijama (zbog sniženog nivoa LH). Štaviše, nizak nivo FSH smanjuje oslobađanje proteina koji vezuje androgen (ABP) od strane Sertolijevih ćelija, što dodatno smanjuje nivoe testosterona u cirkulaciji. Zanimljivo je da gojaznost utiče ne samo na osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlezde i hipotalamus-hipofiza-štitna žlezda, već stvaranjem ROS-a utiče na povećanu proizvodnju leptina od strane adipocita, koji zajedno sa insulinom smanjuje koncentraciju trijodtironina (T3), i time negativno utiče na funkcionisanje testisa. Leptin je takođe inhibitor proizvodnje GnRH u hipotalamusu. Pre-pubertalni porast nivoa leptina odgovoran je za pravilan razvoj testisa. Zauzvrat, povećanje koncentracije androgena kod dečaka adolescenata izaziva smanjenje koncentracije leptina. Gojaznost nije povezana samo sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara, dijabetesa tipa 2, već i sa poremećajima u reproduktivnom sistemu i kod žena i kod muškaraca. Takođe dovodi do hiperinsulinemije, hiperlipidemije, hiperleptinemije i hronične upale. Kod gojaznih muškaraca primećeni su smanjeni nivoi testosterona, luteinizirajućeg hormona i globulina koji vezuje polne hormone (SHBG). Povećana količina adipocita negativno utiče na kvalitet i kvantitet sperme, a kako se BMI povećava, ukupan broj spermatozoida se smanjuje. Meta-analiza 21 studije koja je uključivala 13.000 muškaraca otkrila je veću incidencu oligozoospermije i azoospermije kod gojaznih muškaraca. Štaviše, efikasnost procedure biomedicinski potpomognute oplodnje opada kada je partner gojazan. Epifiza je, preko melatonina,

odgovorna za kontrolu regulacije cirkadijalnog ritma, uglavnom sna i budnosti. Njegova sinteza i lučenje se značajno povećava u mraku. Druga važna funkcija melatonina je inhibicija seksualnog sazrevanja. Kod ljudi, pad prosečne dnevne proizvodnje melatonina napreduje sa godinama. Ovo se dešava zbog inhibicije ekspresije kisspeptina melatoninom, koji stimuliše ćelije hipotalamusa da sintetišu GnRH . Dokazano je da primena egzogenog melatonina izaziva odložen pubertet kod dece oba pola . Melatonin se takođe proizvodi u drugim organima, uključujući reproduktivni sistem, mrežnjaču i sočivo, gastrointestinalni trakt i krvne ćelije, delujući kao autokrini ili parakrini hormon. Melatonin se takođe smatra veoma efikasnim antioksidansom. Aktivirajući svoje MT1 i MT2 receptore, stimuliše ekspresiju superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPk) i glutation reduktaze (GRd). Melatonin izaziva smanjenje lučenja luteinizirajućeg hormona, što dovodi do nižeg lučenja testosterona od strane Lejdigovih ćelija u testisima, što negativno utiče na intenzitet spermatogeneze. Pokazana je pozitivna korelacija između koncentracije melatonina i muške plodnosti, kako u serumu tako i u spermi. Zanimljivo je da je povećana koncentracija melatonina u plazmi i njegov smanjen nivo u spermi pokazana kod neplodnih muškaraca. Istraživanja su pokazala da koncentracija melatonina u spermi obrnuto korelira sa učestalošću oštećenja DNK spermatozoida, što je verovatno posledica njegove antioksidativne aktivnosti . Takođe je prijavljeno da suplementacija melatoninom poboljšava kvalitet sperme i povećava šanse za očuvanje plodnosti kod pacijenata sa varikokelom. Snažna povezanost insulinske rezistencije takođe je prikazana kod pacijenata sa neobjašnjivim problemima plodnosti, pretpostavljajući da povišeni nivoi insulina u krvi mogu poremetiti spermatogenezu, a kod pacijenata sa hiperinsulinemijom i dijabetesom tipa 2, takođe izazivaju oštećenje jedarne i mitohondrijalne DNK u spermi. Osim oksidativnog stresa, koji negativno utiče na kvalitet sperme, pominje se i dugotrajni stres koji se manifestuje povećanim nivoom kortizola. Ovo je povezano sa muškom neplodnošću zbog smanjene konverzije androstendiona u testosteron, čime se smanjuje zapremina i koncentracija sperme. Istraživanja su pokazala da su nivoi kortizola i adrenalina bili značajno viši u grupi neplodnih muškaraca u poređenju sa kontrolnom grupom muškaraca bez problema sa plodnošću. Stres je u ovom smislu i fizički i emocionalni faktor koji izaziva aktivaciju neurona koji luče hormon koji oslobađa kortikotropin, što dovodi do viših nivoa kortizola u plazmi. Višak kortizola smanjuje proizvodnju testosterona, smanjujući parametre sperme. Kortizol takođe može direktno da smanji proizvodnju testosterona blokiranjem transkripcije gena koji kodiraju enzime neophodne za sintezu testosterona. (Bendarska-Czerwińska i dr. 2023) Zbog svega navedenog u lečenju neplodnosti je veoma važno proveriti brojne hormonske parametre i informisati se o načinu života pacijenta, jer bi zapravo promene na tom nivou potencijalno mogle da doprinesu boljim ishodima potpomognute oplodnje.

#### 3.4.5. Leukociti u spermi

Leukociti se u spermi javljaju se usled postojanja infekcija reproduktivnog trakta koje i te kako mogu biti uzrok neplodnosti. Kvalitet sperme se smanjuje kada je koncentracija leukocita veća od milion leukocita po 1ml. (Wang i dr. 2022) Pojedine prospektivne studije pokazale su da leukocitospermija ima visoku korelaciju sa indeksom deformiteta sperme, destrukcijom akrozoma, nedostatkom srednjeg segmenta i abnormalnošću repa. Do sada su antibiotici i antioksidansi širokog spektra bili rutinski korišćeni za lečenje muške neplodnosti izazvane leukocitospermijom, jer mogu da eliminišu infekciju i smanje reaktivne vrste kiseonika (ROS) koje oslobađaju leukociti tokom inflamatornih reakcija. Leukociti aktivirani upalom proizvode 100 puta više ROS od neaktiviranih leukocita. Kada je jedarna DNK spermatozoida podvrgnuta oksidativnom stresu, nezasićene masne kiseline su obogaćene plazma membranom sperme, koja može da reaguje sa enzimima koji čiste ROS, čime se uništava fluidnost i integritet plazma membrane spermatozoida, i na kraju dovodi do oštećenja nuklearne DNK sperme. Mitohondrijalna DNK sperme ima slabu sposobnost samoizlečenja i osetljiva je na oksidativni stres, zbog nedostatka zaštite protamina i proteina koji vezuju DNK, pa je oštećenje DNK češće. (Liu i dr., 2021)

#### 3.4.6. Analiza urina nakon ejakulacije

Retrogradna ejakulacija (RE) je disfunkcija ejakulacije zbog nepotpuno zatvorenog vrata mokraćne bešike, što uzrokuje protok semena u bešiku tokom ejakulacije. Diferencijalna dijagnoza među poremećajima ejakulacije zasniva se na prisustvu ili odsustvu orgazma, ejakulacije i na detekciju prisustva spermatozoida u postorgazmičnom urinu. (Mazzilli i sar. 2020)

#### 3.4.7. Ultrazvuk

Ultrazvuk testisa je neinvazivna tehnika koja bi mogla biti veoma korisna za predviđanje kvaliteta semena. Daje informacije o lokalizaciji testisa, zapremini, teksturi parenhima, intratestikularnoj vaskularizaciji, prisustvu izolovanih ili višestrukih kalcifikacija, postojanju i stepenu varikokele i prisustvu masa ili cista. Štaviše, može pružiti dokaze o morfologiji i prečniku epididima i o statusu proksimalnog dela semenovoda. (Garolla i dr. 2021)

#### 3.4.8. Biopsija testisa

Biopsija testisa izvodi se u slučaju opstruktivne ili neopstruktivne azoospermije odnosno potpunog odsustva spermatozoida u ejakulatu. Spermatozoidi za potrebe vantelesne oplodnje se mogu izvaditi korišćenjem tehnika ekstrakcije sperme testisa (TESE) ili aspiracije sperme testisa (TESA) i koristiti u naprednim tehnikama asistiranе reprodukcije kao što je intracitoplazmatska injekcija sperme (ICSI). Sperma dobijena iz testisa na ove načine i korišćena za vantelesnu oplodnju sa ICSI generalno dovodi do zdravog potomstva. (Sharma i Leslie, 2023)

#### 3.4.9. Vazografija

Vasografija je radiološka procedura koja se koristi za procenu prohodnosti vas deferensa i ejakulacionih kanala. Postupak uključuje injekciju kontrastnog materijala u semenovod. Nedavno su aspiracija semenskih vezikula i vezikulografija uglavnom zamenili vazografiju za dijagnozu opstrukcije ejakulacionog kanala. Treba posumnjati na ingvinalnu opstrukciju vas deferensa kod pacijenata sa azoospermijom i prethodnim operacijama uključujući orhiopeksiju, popravku kile, operaciju uretere, pa čak i apendektomiju (jatrogene povrede vas deferensa). (Loughlin i dr. 1994)

#### 3.4.10. Kompjuterski potpomognuta analiza sperme (CASA).

CASA je računarski sistem koji zahteva kameru visoke rezolucije povezan sa fazno-kontrastnim mikroskopom koji analizira spermatozoide u nekoliko vidnih polja. Koncentracija sperme, motilitet i morfologija ispituju se sa predviđenim CASA sistemom. Svaki analizirani slajd može biti sačuvan u sistemu za pregled i može se može ponoviti. Kompjuterska analiza sperme je nova metoda koja zahteva dalja istraživanja i unapređenje budući da se još uvek ne smatra superiornom u odnosu na manuelnu analizu sperme. Rad Talarczyk-Desole i saradnika pokazao je da iako pojedini parametri spermograma bivaju dobro očitani i vrlo slični onima dobijenim manuelnom tehnikom, postoje odstupanja u rezultatima što zahteva dalje studije kako bi se povećala objektivnost i smanjila pristrasnost u individualnoj interpretaciji rezultata tehničara.

#### 3.4.11. Test vezivanja hijalurona (HBA)

Test vezivanja hijalurona koristi se za procenu sposobnosti spermatozoida da prepoznaju ženski gamet in vitro, odnosno hijaluronsku kiselinu koja je deo komponente kumulus-oocita. Tumačenje testa dovodi do poređenja sa testovima hemotakse sperme na osnovu povećane akumulacije sperme u blizini izvora hemoatraktanta. Izostanak reakcije između sperme i hijaluronske kiseline može ukazivati na odsustvo HSPA2 (porodice proteina toplotnog šoka A), što se može povezati sa postmejotičkim defektima u sazrevanju spermatozoida. Niska ekspresija HSPA2 je zabeležena kod nezrelih spermatozoida sa zadržavanjem citoplazme, a visoka ekspresija HSPA2 je zabeležena kod zrelih spermatozoida bez zadržavanja citoplazme. (Marchlewska i dr., 2024)

#### 3.4.12. Postkoitalni test penetracije cervikalne sluzi

Iako se koristi više od jednog veka u proceni neplodnosti i već je u velikoj meri ova metoda zamenjena nekim savremenijim i dalje postkoitalni test predstavlja važan dijagnostički aspekt. Uključuje sakupljanje cervikalne sluzi u određenom vremenskom trenutku nakon seksualnog odnosa, potom brojanje i karakterizaciju sperme koja se nalazi u sluzi. Širok spektar progresivno pokretnih spermatozoida je povezan sa stopama trudnoće u studijama neplodnosti. Peto izdanje priručnika SZO navodi: „Prisustvo bilo koje spermatozoide sa progresivnom pokretljivošću u endocervikalnoj sluzi 9–14 sati nakon snošaja osporava značajne faktore grlića materice i autoimunost spermatozoida kod muškaraca ili žena, kao mogućih uzroka neplodnosti. Međutim, u

publikaciji SZO iz 1973. stoji „10 ili više spermatozoida sa usmerenom pokretljivošću može se smatrati zadovoljavajućim, a manje od 5 posebno kada je povezano sa sporim ili kružnim pokretima, pokazatelj je oligo-astenospermije ili abnormalne cervikalne sluzi. (Mauck i Vincent, 2020)

#### 3.4.13. Test reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

ROS se generiše u spermi pomoću dve metode, jedan je sistem nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH-oksidaza), a drugi je nikotinamid adenin dinukleotid zavisna oksidoreduktaza (NADH-oksidoreduktaza) na plazma membrani spermatozoida i mitohondrijama. Primarni ROS koji se generiše u ljudskim spermatozoidima je superoksidni anjon ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Ovaj jednoelektronski redukcionni proizvod  $\text{O}_2$  sekundarno reaguje sam sa sobom u reakciji dismutacije, koja je u velikoj meri ubrzana superoksid dismutazom (SOD), da bi se stvorio vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). U prisustvu prelaznih metala kao što su gvožđe i bakar,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mogu da interaguju da bi generisali izuzetno opasan hidroksilni radikal ( $\text{OH}\cdot$ ). Smatra se da je hidroksilni radikal izuzetno moćan inicijator kaskade peroksidacije lipida uzrokujući fragmentaciju DNK i može izazvati gubitak funkcija spermatozoida. Da bi katalizovao oksidaciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i superoksidnog anjona, glutathion peroksidaza (GPX) koristi glutathion kao donora elektrona. U Sertolijevim ćelijama postoji značajna količina GPX. Glava epididimisa je mesto gde se GPX eksprimira, luči i otkriva u spermi. GPX u velikoj meri štiti plazma membranu spermatozoida od peroksidacije lipida. (Andrabi i dr. 2024)

#### 3.4.14. Test reakcije akrozoma

Akrozomska reakcija ogleda u prisustvu enzima u glavi spermatozoida koji su zaduženi za iniciranje skoka koncentracije kalcijumovih jona prilikom oplodnje. Test reakcije akrozoma sperme može da bude negativan iako su drugi parametri spermograma potpuno u redu. Često se u takvim kliničkim slučajevima govori o idiopatskoj neplodnosti. (Pampiglione i dr. 1993) Kratka privremena izloženost spermatozoida veoma niskoj koncentraciji jonofora kalcijuma, bila bi poželjna da bi se oni pripremili za oplodnju. Naročito je značajno u slučajevima kada parovi imaju uzastopne neuspele pokušaje vantelesne oplodnje. (Tateno i dr. 2013)

#### 3.4.15. Testovi integriteta/fragmentacije DNK spermatozoida

Fragmentacija DNK sperme može negativno uticati na potencijal oplodnje spermatozoida, posebno kada su nivoi oštećenja DNK visoki. Nivoi oksidativnog stresa koji nisu dovoljni da indukuju ćelijsku smrt putem apoptoze mogu poremetiti sve aspekte funkcije spermatozoida, uključujući pokretljivost, prepoznavanje spermatozoida i jajnih ćelija. Hromatin sperme ima dosta alkalno labilnih mesta, uglavnom lokalizovanih u ponavljajućim sekvencama DNK, sklonih torziji DNK tokom pakovanja hromatina. Oštećenje hromatina je sveobuhvatan termin koji objašnjava sve defekte u strukturi DNK. Može se javiti tokom spermatogeneze, spermiogeneze, epididimalnog

tranzita ili nakon ejakulacije. Ljudski spermatozoidi su podložni ROS zbog obilnog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u plazma membranama. ROS ne napada samo membrane spermatozoida, već i jedarnu i mitohondrijsku DNK. (Esteves i dr., 2020.)

### 3.5. Trenutne terapije i njihova ograničenja

U ovom radu navedene su dijagnostički pristupi koji se trenutno koriste u manjoj ili većoj meri u Srbiji i u svetu. Biomedicinski potpomognuta oplodnja nije lek za sve probleme sa neplodnošću. Nedavne studije sugerišu da bi lekari trebalo da imaju sveobuhvatan klinički, molekularni i citogenetski pristup neplodnosti pored rešavanja opštih faktora, kao što su promene u načinu života i efekti zagađenja životne sredine, koji imaju veliki uticaj na plodnost muškaraca. S obzirom na cenu i opterećenje koje donosi korišćenje invazivne tehnologije u postupcima vantelesne oplodnje, preciznije razumevanje etiologije muške neplodnosti je od suštinskog značaja za specijaliste za plodnost da se prevaziđe neefikasnost ili bilo koji neproduktivan ili suvišan korak u procesu oplodnje, kao i da na odgovarajući način savetuje pacijente o njihovim šansama uspeha sa upotrebom biomedicinski potpomognute oplodnje. Deljenje iskustava sa kolegama drugih specijalnosti omogućava lekarima da na različite načine pristupe lečenju neplodnosti, fokusirajući se na sve aspekte života, istražujući dostupne testove za procenu neplodnosti i resurse za unapređenje postojećih navika.

Sa nedavnim napretkom u reproduktivnoj medicini, budućnost genetskog testiranja je obećavajuća sa metodama koje mogu da opišu ceo genom, kao što je sekvenciranje sledeće generacije (NGS). NGS uključuje potencijalne testove, kao što su sekvenciranje ciljano na bolest, sekvenciranje celog egzoma i sekvenciranje celog genoma. Ovo pruža mogućnost sagledavanja šire slike, pregleda više genetskih problema uključujući varijante pojedinačnih nukleotida, promene u broju i strukturi hromozoma. Tokom proteklih nekoliko godina, veštačka inteligencija (AI), koristeći sisteme zasnovane na mašinskom učenju je u velikoj meri uticala na inovacije, istraživanja i doprinos tehnikama biomedicinski potpomognute oplodnje. AI može pomoći ili čak potpuno automatizovati procedure, kao što su procena kvaliteta gameta, selekcija sperme za ICSI, sakupljanje oocita, asistiranje u protokolima za kontrolisanu hiperstimulaciju jajnika, podudaranje donora ili odabir i rangiranje embriona za transfer i krioprezervaciju. Još jedna oblast andrologije u kojoj AI može igrati ulogu je spermogram, trenutno najpopularnija metoda za utvrđivanje neplodnosti, jer AI može prevazići subjektivnost embriologa u proceni analize sperme. Većina studija koje su ispitivale upotrebu AI-a se fokusirala na procenu morfologije. Neke studije su razvile modele koji procenjuje samo morfologiju glave spermatozoida, dok su druge stvorile model koji procenjuje ceo spermatozoid. Ove razlike otežavaju implementaciju u kliničku praksu. Uprkos obećavajućim implikacijama i sposobnostima novih tehnologija, potrebno je rešiti više izazova pre veće primene u kliničkoj praksi. Matične ćelije su još jedna veoma popularna tema u medicini. One su donele novu

nadu u prevazilaženju problema vezanih za neplodnost, koje koriste prednosti ćelijske terapije u pretkliničkim i kliničkim modelima. Ove ćelije su nediferencirane i u tkivima odraslih, mogu se samoobnavljati i višesmerno diferencirati kada je to potrebno. Klinički prevod terapije matičnim ćelijama u reproduktivnoj medicini je za sada ograničen zbog neželjene diferencijacije i onkogenosti. U kliničkoj praksi, napredak u terapiji matičnim ćelijama zahteva dalje dugoročno planiranje uz rigoroznu evaluaciju i nadzor kako bi se osigurala tačnost, kvalitet i bezbednost. Pošto su autologne matične ćelije etičnije, bezbednije i neimune, njihova klinička primena u budućnosti ima veći potencijal. (Calogero i dr. 2023) Do upotrebe ovih inovativnih metoda, svu svoju pažnju potrebno je usmeriti na segmente života kojima možemo upravljati kao što su ishrana, suplementacija, fizička aktivnost i samoregulacija.

## 4. Nutrigenetika i plodnost

### 4.1. Osnove nutrigenetike

Termin "nutrigenomika" je stvoren da opiše interakciju između hranljivih materija i gena. Stoga, nutrigenomika povezuje genetiku sa ishranom, fiziologijom, biohemijom, metabolikom, proteomikom, transkriptomikom i bioinformatikom. Nutrigenetika objašnjava kako komponente ishrane mogu da utiču na ekspresiju gena na nivoima pre transkripcije, post-transkripcije i translacije, što rezultira dobijanjem ili gubitkom funkcije tih određenih proteina koji su začajni za metabolizam. Istraživanja o vitaminu A, vitaminu D i masnim kiselinama pokazuju da ovi vitamini direktno pokreću aktivaciju receptora na ćelijskom jedru i na taj način indukuju transkripciju gena. (Karim Kiani i dr. 2022) Hranljive materije koje dospevaju u organizam utiču na zdravlje pojedinaca, jer neki od njih direktno komuniciraju sa genomom i epigenomom regulišući aktivnost faktora transkripcije i modifikatora hromatina. Veoma je složen odnos između genoma, epigenoma i ishrane. Ćelijska i molekularna biologija koje stoje iza ovih regulatornih procesa gena održavaju homeostazu našeg tela koja sprečava nastanak nezaraznih bolesti, kao što su gojaznost, dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti i rak. Ipak ovi mehanizmi koji se odvijaju u ćelijama mogu u različitim okolnostima biti utišani, odnosno pojačani u zavisnosti od toga kakve su informacije zapisane u samoj DNK i kako različiti unutrašnji i spoljašnji faktori doprinose ekspresiji gena.

U poslednjih 20 godina uticaj varijacija ljudskog genoma na rizik od bolesti prvenstveno je istražen studijama na nivou genoma (GVAS) koristeći nizove od hiljada do miliona pojedinačnih polimorfizama nukleotida tzv. SNP-ova. Ovaj metod je danas zamenjen naprednijom tehnologijom, sekvenciranjem celog egzoma ili celog genoma. Postoje takozvane monogenске bolesti, gde promena u samo jednom genu dovodi do razvoja bolesti, međutim hronične nezarazne bolesti današnjice imaju multigenšku osnovu, odnosno zasnivaju se na promenama u mnoštvu pojedinačnih nukleotida. (Carlberg, 2023) Nutrigenetske studije mogu se koristiti za predviđanje rizika od

različitih hroničnih bolesti. Kao što je slučaj sa mnogim drugim oblastima i u nutrigenetici je potrebno uključiti nutricioniste, endokrinologe, genetičare, lakere, trenere u svrhu personalizovanog i boljeg upravljanja ishranom, treningom, suplementacijom i lečenjem postojećih bolesti i stanja, kao i u cilju njihovog sprečavanja. (Karim Kiani i dr. 2022)

#### 4.2. Uticaj ishrane na genetske markere plodnosti

Nezdrava hiperkalorična ishrana, prekomerni unos zasićenih masti i trans-masnih kiselina, visok glikemijski indeks i niska nutritivna gustina mogu biti direktno povezani sa povećanim oksidativnim stresom, koji predstavlja osnovni uzrok gojaznosti, crevne disbioze, dijabetesa tipa 2 i insulinske rezistencije. Svi navedeni metabolički poremećaji su povezani sa pogoršanjem plodnosti kod muškarca, uglavnom zbog stvaranja oksidativnog stresa, koji se smatra jednim od glavnih faktora koji dovode do smanjenja kvaliteta sperme, hormonskih i imunooških poremećaja i većeg rizika od neplodnosti. Gojazni muškarci sa dijabetesom tipa 2 i insulinskom rezistencijom imaju veću verovatnoću da dožive sekundarni hipogonadizam i niže nivoe proteina koji vezuje polne hormone. Štaviše, hiperglikemija ima negativan uticaj na pokretljivost spermatozoida i proces oplodnje. Primećeno je da poslednjih decenija postoji drastična promena u načinu života društva koja se odnosi na smanjenje potrošnje energije, posebno u svakodnevnoj fizičkoj aktivnosti. Mnogo manje današnja digitalna era zahteva od ljudi da budu u pokretu na svom radnom mestu, u domovima i sredinama u kojima žive. Naročito kada se uz to uključi i povećana konzumacija hiperkalorične hrane sa visokim glikemijskim indeksom i visokim sadržajem masti, kao i istovremeni nizak unos dijetalnih vlakana. (Skoracka i dr. 2020)

Rezultati randomizovanih kontrolnih studija o efektu različitih komponenti ishrane na plodnost ukazuju na to da intervencije u odnosu makronutrijenata i većeg unosa povrća, voća i mahunarki zaista dovode do poboljšanja plodnosti, dok su rezultati efekata antioksidanasa i mikronutrijenata manje konzistentni. Nedosledni rezultati studija suplementacije mogu delom biti posledica genetskih razlika u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju specifičnih komponenti ishrane. (Vanderhout i dr. 2021) Iako je do sada je malo istraživanja ispitivalo kako genetske varijacije menjaju odnos između ishrane i plodnosti cilj ovog rada jeste da razumemo kako različiti nutrijenti utiču na spermatogenezu i funkcionalnost reproduktivnih ćelija muškaraca, kao i da odgonetnemo da li vitamini, minerali, koenzimi i aminokiseline zapravo utiču na plodnost i u kojoj meri ih je potrebno uvrstiti kroz suplemente prilikom planiranja trudnoće ili priprema za biomedicinski potpomognutu oplodnju. Poznavanje genotipa pojedinca može samo pomoći u određivanju genetskih predispozicija pojedinca i doprineti razvoju prilagođenih preporuka za ishranu i suplementaciju u svrhu optimizacije plodnosti.

### 4.3. Geni značajni za plodnost muškaraca

#### 4.3.1. Geni uključeni u metabolizam makronutrijenta i drugih bioaktivnih sastojaka hrane

##### **CD36 (Cluster of differentiation 36): rs1761667**

Kardiovaskularne bolesti imaju svoje poreko u genetičkoj predisponiranosti, načinu života, kao i kombinaciji ova dva faktora. Geni koji su uključeni u metabolizam masti važni su nam za razumevanje metabolizma i mehanizama koji nisu vidljivi drugim metodama, a kriju ključne poruke koje mogu dati bitne smernice za kreiranje plana ishrane u svrhu sprečavanja oboljenja koja mogu negativno uticati na plodnost i sveobuhvatno zdravlje. Jedan od gena koji utiče na transport lipoproteina u krvi, na percepciju masti u ishrani, skladištenje i lipoizu je *CD36* rs1761667 (cluster of differentiation 36). Ovaj gen može uticati i na diferencijaciju i aktivaciju imunih ćelija, što može biti posebno značajno sa aspekta stvaranja inflamatornih stanja kao posledica gojanosti, metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih oboljenja. (Navarro-Rios i dr. 2024) Prema tome, kakva je osobama percepcija masti u hrani, možemo ih podeliti na „*super degustatore*“, nosioce genotipa GA ili GG koji mogu osetiti masti u ishrani značajno izraženije u poređenju sa „*tipičnim degustatorima*“ odnosno osobama sa AA varijantom. Senzorna studija Kellera i saradnika iz 2012. ustanovila je da su osobe koje su imale A alel potvrđivale nižu osetljivost na percepciju masti u hrani, dok je studija Pepino i saradnika testirala percepciju masti u prelivima za salatu. Međutim, u ovoj studiji ispitanici nisu mogli da razlikuju kremast ukus od masnoće. (Pepino i dr. 2014) Treća pak studija tvrdi da nosioci genotipa GG imaju predispoziciju da razviju mnogo manje masnoćnu masu, veću abdominalnu gojaznost tzv. fenotip hipertrigliceridemijskog struka i povišeni krvni pritisak. (Yazdanpanah i dr. 2023) U skladu sa tim, nosioci GG genotipa mogu da konzumiraju mnogo manje masti u ishrani u odnosu na tipične degustatore.

##### **TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2): rs7903146, rs12255372**

*TCF7L2* gen kodira enteroendokrini transkripcioni faktor koji kontroliše transkripciju proglukagon gena, koji dalje kodira glukagon i glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1). L-ćelije crevnog epitela zadužene su za produkciju GLP-1 peptida čija su glavna zaduženja da stimuliše lučenje insulina i inhibiše lučenje glukagona. Polimorfizmi gena *TCF7L2* mogu uticati na rizik od razvoja dijabetesa tipa 2. (Wang i dr. 2013)

Masti u ishrani imaju brojne funkcije u telu, međutim, ishrana bogata mastima može povećati nivo triglicerida u serumu i semenu, što može povećati oksidativni stres u reproduktivnim tkivima. Gen *TCFL2* ima drugačiju ulogu. (Vanderhout i dr. 2021) Smatra se najjačim genom od uticaja za dijabetes tipa 2 koji učestvuje u Wnt/ $\beta$ -keteninski signalnom putu koji kontroliše uticaj masti u ishrani na telesni sastav. (Chen i dr. 2018) Pojedinci koji nose TT genotip za rs7903146 čine približno 10%

populacije. Oni sa TT varijantom koji konzumiraju visok udeo masti u ishrani mogu imati veću verovatnoću da budu gojazni i da dožive insulinsku rezistenciju, dijabetes tipa 2 u poređenju sa osobama sa CC ili TC genotipovima. Sva ova oboljenja mogu imati negativan uticaj na hormonsku ravnotežu, što može uticati na neplodnost. Ukupan unos masti kod muškaraca u ishrani je negativno povezan sa brojem i koncentracijom spermatozoida, poremećaje u građi membrane spermatozoida, poremećenu pokretljivost i funkciju. Najvažniji faktor pri analizi odnosa između masti u ishrani i plodnosti kod muškaraca je vrsta masti, jer odnos nezasićenih i zasićenih masti u ishrani može uticati na kvalitet sperme. (Vanderhout i dr. 2021)

Žitarice od celog zrna su bogat izvor metionina, betaina, holina i folata, koji su svi uključeni u metilaciju DNK. Cela zrna takođe obezbeđuju dijetalna vlakna, koja mogu ublažiti brzo povećanje glukoze u krvi. Poznato je da su ishrane bogate vlaknima obrnuto povezane sa insulinskom rezistencijom i razvojem dijabetesa tipa 2. (InterAct Consortium, 2015.) Posedovanje T alela *TCF7L2* (rs12255372) gena povezuje se sa većom ekspresijom proteina TCF7L2, poremećenom osetljivošću na insulin, a samim tim i sa većim rizikom od razvoja dijabetesa tipa 2. (Aune i dr. 2013) Kao endokrini poremećaj, dijabetes tipa 2 može da promeni hormonski profil muškarca tako da negativno utiče na spermatogenezu, steroidogenezu, i ejakulaciju. Istraživanja su pokazala da ishrana bogata integralnim žitaricama i svežim povrćem i voćem podstiče bolju morfologiju i pokretljivost spermatozoida. Iako za sada postoji malo dokaza o direktnom uticaju ishrane na reproduktivni mikrobiom, postoje mnogobrojni dokazi o značaju ishrane bogate vlaknima i uticaju na razvoj mikrobioma u crevima. Takođe, gojaznost, insulinska rezistencija, zapaljenje i dislipidemija se ređe javljaju kod osoba sa većom raznovrsnošću mikrobioma. (Vanderhout i dr. 2021)

### ***NOS3* (Nitric Oxide Synthase 3): rs1799983**

Polinezasićene omega-3 masti nalaze se u masnoj ribi, orašastim plodovima, semenkama i uljima i mogu pomoći u održavanju zdravih nivoa triglicerida u cirkulaciji. Protein azot oksid sintaza (NOS) reguliše interakciju između masti u ishrani i triglicerida u plazmi i kodirana je genom *NOS3* (Nitric Oxide Synthase 3). Promene u ovom genu menjaju način ekspresije NOS proteina, pa stoga različiti genotipovi mogu uticati na nivoe triglicerida u cirkulaciji kao odgovor na nivoe omega-3 u plazmi. Ferguson i saradnici su u svojoj studiji 2010. godine uočili da su osobe sa GT ili TT genotipom *NOS3* imale više trigliceride u cirkulaciji kada su omega-3 masti u plazmi bile niske, u poređenju sa onima sa GG genotipom. (Liu i dr. 2017)

### ***FADS* (Fatty Acid Desaturase)**

#### ***FADS1* (Fatty acid desaturase 1): rs174547;**

### ***FADS2* (Fatty acid desaturase 2): rs2727270, rs498793**

Omega-3 i omega-6 masne kiseline se metabolišu u dugolančane polinezasićene masne kiseline (LC-PUFA) koje utiču na krvni pritisak, zgrušavanje krvi i upalne procese kroz stvaranje eikozanoida. Proizvodnja LC-PUFA je regulisana enzimima desaturaze koji kodira klaster gena *FADS*. Konkretno, poznato je da polimorfizmi gena *FADS1* i *FADS2* utiču na brzinu sinteze LC-PUFA. Polimorfizmi u ovim genima utiču na cirkulišuće nivoe različitih metaboličkih oblika n-3 i n-6 masnih kiselina uključujući eikozanoidne prekursore. Više studija je otkrilo da su nosioci alela C u genu *FADS1* (rs174547) smanjili endogenu proizvodnju LC-PUFA. Promene u pojedinačnim nukleotidima u genu *FADS2* (rs2727270, rs498793) takođe su u korelaciji sa izmenjenim metabolizmom polinezasićenih masnih kiselina. Efekti ovih *FADS* polimorfizama mogu uticati na reproduktivno zdravlje muškaraca kroz promenu inflamatornih odgovora i karakteristika membrane sperme. Omega-3 masti smatraju se najvažnijom komponentom u membranama spermatozoida. Polinezasićene masti u membrani spermatozoida su mete peroksidacije lipida, stvarajući oksidativni stres u semenu. Zbog toga su antioksidansi kao što su vitamini E i C neophodni za zaštitu nezasićenih masti koje čine membrane spermatozoida i oocita, održavajući integritet i funkciju ovih struktura. Viši odnosi omega-3 prema omega-6 i nezasićenih prema zasićenim masnim kiselinama povezani su sa boljim parametrima sperme, posebno kod muškaraca sa oligoastenoteratozoospermijom. U tromesečnom ispitivanju Mendeluk i saradnika na suplemenatima na bazi omega-3 masnih kiselina iz ribljeg i ulja algi koje je sprovedeno na 10 muškaraca sa dijagnostikovanom astenozoospermijom, smanjene su koncentracije omega-3 masnih kiselina u semenskoj plazmi. Takođe, randomizovana, dvostruko slepa studija u kojoj su učestvovali muškarci koji su dobijali 1.500 mg ulja obogaćenog dokozaheksaenskom kiselinom (DHA, vrsta omega-3 masnih kiselina) svakog dana tokom perioda od 10 nedelja, dovela je do poboljšanih rezultata. (Vanderhout i dr., 2021)

### ***APOA2* (Apolipoprotein A2): rs5082**

Zasićene masti su dugo smatrane markerom lošeg kvaliteta ishrane, zbog njihove veze sa bolestima kao što su gojaznost i hiperholesterolemija. Apoprotein A-2 je glavni protein lipoproteina velike gustine HDL-a. (Ward i dr. 1994) Poznato je da varijacije u genu *APOA2* (rs5082) utiču na odnos unosa zasićenih masti na indeks telesne mase (BMI), tako da su nosioci CC genotipa imali jaču povezanost između unosa zasićenih masti i većeg ideksa telesne mase, od onih sa TC ili TT genotipovima. (Correla i dr. 2009) Gojaznost je faktor rizika za neplodnost, stoga, nosioci genotipa *APOA2* CC mogu imati koristi od ograničenog unosa zasićenih masti, koje negativno utiču na broj i koncentraciju spermatozoida, kao i na lošu pokretljivost spermatozoida i morfologiju. Kod muškaraca sa astenozoospermijom i oligospermijom uočeno je da se u membranama spermatozoida

nalaze zasićene masti u većem procentu ometajući fluidnost, pokretljivost i prouzrokujući veću podložnost peroksidaciji lipida. (Vanderhout i dr., 2021)

### ***PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma): rs1801282***

Maslinovo ulje, bademi i avokado pripadaju mononezasićenim mastima. Istraživanja pokazuju da su veoma male promene u ishrani dovoljne za poboljšanje plodnosti zamenom svega 2% dnevnog unosa energije iz trans masti sa mononezasićenim mastima. Mononezasićene masti mogu pomoći u smanjenju takozvanog "lošeg" holesterola odnosno lipoproteina male gustine. Gen *PPAR $\gamma$ 2* je uključen u formiranje masnih ćelija. Konkretno, pojedinci koji imaju GG ili GC varijantu gena imaju tendenciju da dožive veći gubitak težine i da izgube više telesnih masti, u poređenju sa onima sa CC varijantom, kada konzumiraju ishranu bogatu mononezasićenim mastima. (Chavaro i dr., 2007), (Garaulet i dr. 2011) PPAR receptori su zapravo nuklearni receptori koji se aktiviraju vezivanjem liganda i imaju 3 člana: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ . Od čega je PPAR $\gamma$  najznačajniji zbog svog uključivanja u brojne metaboličke puteve, dominantno one koji su vezani za metabolizam masti i ugljenih hidrata. Pored adipogeneze, učestvuje u diferencijaciji adipocita, povećava osetljivost na insulin. Što se tiče vaskularnih oboljenja, rad Li i saradnika iz 2022. godine obuhvatio je nekoliko meta-analiza, prva je obuhvatala 22 studije sa 23.375 ispitanika otkrivši da GG genotip za polimorfizam rs1801282 ima veću predispoziciju oboljevanja od koronarne bolesti srca od CC homozigotnog nosioca. Druga meta-analiza u koju je uključeno 9 studija i 3.878 ispitanika je sugerisala da su nosioci alela T polimorfizma rs3856806 imali niži rizik od koronarne bolesti u odnosu na CC homozigote. (Li i dr. 2022.) U praksi se može desiti da je osoba nosilac nepovoljnih varijanti gena, odnosno da ne metaboliše dobro mononezasićene masti iz ishrane, zbog čega je potrebno pratiti parametre i personalizovati ishranu tako da se ovakve masnoće unose u manjoj, ali izbalansiranoj dozi.

### ***GLUT2 (Glucose transporter 2): rs5400***

Varijacije u genu *GLUT2* (rs5400) diktiraju sintezu proteina koji transportuje glukozu. Pokazalo se da nosioci alela T imaju nižu osetljivost, a time i veću preferenciju za glukozu u poređenju sa nosiocima CC genotipa. (Eny i dr. 2008) Unos šećera može biti važan faktor koji doprinosi dnevnom unosu kalorija. Naročito kada govorimo o dodatom šećeru koji se nalazi u različitim pekarskim, konditorskim proizvodima, sosevima, slatkišima, čiji višak može izazvati razvoj hroničnih bolesti kao što su gojaznost i dijabetes tipa 2, što može imati negativne implikacije na plodnost. (Malik i dr. 2008)

Veća potrošnja napitaka zaslađenih šećerom povezana je sa manjom pokretljivošću spermatozoida i brojem spermatozoida. U velikoj kohorti muškaraca sa azijskog kontinenta, veliki unos slatkih grickalica i zaslađenih pića je bio povezan sa manjim brojem spermatozoida. Pored toga,

prospektivna kohortna studija u kojoj je učestvovalo 2.554 danskih muškaraca otkrila je da je potrošnja zaslađenih pića negativno korelirala sa brojem spermatozoida, koncentracijom i morfologijom. Međutim, na rezultate studije možda su takođe uticali faktori lošijeg načina života među pojedincima koji često konzumiraju zaslađena pića, uključujući veću potrošnju crvenog mesa i alkohola koju su sami prijavili. Međutim, važno je napomenuti i da neke studije nisu pronašle povezanost između unosa šećerom zaslađenih pića i parametara sperme, što ukazuje da rezultati nemaju konzistentnost i da ih je potrebno dodatno istražiti u svrhu plodnosti. (Vanderhout i dr., 2021)

***HLA (Human leukocyte antigens): rs2395182, rs7775228, rs2187668, rs4639334, rs7454108, rs4713586***

Celijakija je autoimuna bolest tankog creva koju karakteriše netolerancija na gluten u ishrani kod osoba sa osetljivim genotipovima, HLA-DK2 i HLA-DK8. (Verdu i dr., 2017) Devedeset devet procenata ljudi sa celijakijom poseduje DK2 i DK8 varijante rizika, koje se mogu odrediti pomoću 6 polimorfizma u regionu gena *HLA*. (Wolters i dr. 2008) Inflamatorni odgovor koji se stvara kao posledica konzumacije glutena kod osoba sa intolerancijom, dovodi do stvaranja nepovoljnog okruženja za održavanje i funkciju reproduktivnog tkiva. Dostupni podaci ne ukazuju na povećan rizik od subfertiliteta kod muškaraca sa celijakijom, iako se auto-antitela mogu naći u semenskoj tečnosti muškaraca. Anti-spermatična antitela povezana sa autoimunim odgovorom kod osoba koje boluju od celijakije javljaju se nakon konzumacije glutena mogu biti povezani sa patogeneom smanjene morfologije i pokretljivosti spermatozoida. (Farthing i dr. 1982) Creva su mesto konverzije testosterona u dihidrotestosteron i zbog toga utiču na metabolizam hormona. Kod nelečene celijakije, nizak nivo testosterona i posledični hormonski disbalans mogu izazvati hipogonadizam i hipotalamičnu rezistenciju hipofize, oligospermiju i azoospermiju, narušavajući reproduktivnu funkciju. Međutim, uklanjanjem glutena iz ishrane, parametri semena se mogu povećati i plodnost može biti obnovljena. (Vanderhout i dr. 2021) Dalje posledice nelečene celijakije kod muškaraca povezane su sa nedostatkom mikronutrijenata. To može uključivati folat, vitamin B12, vitamin A, vitamin E, cink i selen, koji svi igraju važnu ulogu u održavanju reproduktivnog zdravlja. (Farthing i dr. 1982)

***CYP1A2 (Cytochrome P450 1A2 ): rs7662551; rs2472300***

Studije koje povezuju konzumaciju kofeina sa različitim zdravstvenim ishodima ostaju nedosledne. Ovo može biti delimično posledica genetskih razlika u metabolizmu kofeina. Gen za citohrom P450 1A2 (*CYP1A2*) kodira za enzim CYP1A2, koji je odgovoran za 95% metabolizma kofeina u telu. (Cornelis i dr. 2006) Pojedinci sa CA ili CC genotipovima (*rs7662551*) čine približno 60% populacije i poznato je da metabolišu kofein sporije od onih koji imaju AA genotip. Sporije

uklanjanje kofeina iz krvotoka u kombinaciji sa velikom potrošnjom povezano je sa povećanim rizikom od brojnih štetnih zdravstvenih ishoda, uključujući srčani udar. Kod muškaraca, kofein prelazi barijeru krvi i testisa, može se zadržati u tkivima gonada i izlučiti u spermu. Postoje dokazi koji ukazuju na to da je konzumacija kofeina povezana sa povećanom incidencom aneuploidije i drugim oštećenjima DNK u ćelijama sperme. Iako neke studije nisu pronašle pozitivan ili negativan efekat ovog fenomena na plodnost, druge su prijavile zavisne efekte doze kofeina na pokretljivost, broj i morfologiju spermatozoida, kao što je konzumacija 1-2 šoljice kafe dnevno imala je pozitivan efekat na parametre sperme, dok je konzumacija nula ili više od 2 šolje dnevno bila povezana sa smanjenom pokretljivošću spermatozoida i broj, kao i lošu morfologiju. (Vanderhout i dr. 2021) Međutim, druga studija sugerise da veći unos kofeina (>175 mg/dan) je pozitivno povezan sa zapreminom sperme i cirkulišućim testosteronom kod muškaraca. (Ramlaoui i dr. 2008.) Možda postoji inverzna veza između većeg unosa kofeina kod muškaraca i niže plodnosti, ali su potrebne dodatne studije koje uključuju analizu genotipa *CYP1A2* učesnika.

#### ***MCM6 (Minichromosome Maintenance Complex Component 6) rs4988235 i LCT (Lactase)***

Laktoza je prirodni šećer koji se nalazi u mlečnim proizvodima. Kada se laktoza vari, ona se razlaže na dva različita molekula: glukozu i galaktozu. Laktaza je enzim potreban za razgradnju laktoze i izuzetno je aktivna i važna u periodu detinjstva počevši od rođenja kada beba koristi majčino mleko kao jedinu hranu. Nakon faze odbijanja, kod nekih osoba počinje da opada aktivnost ovog enzima kroz život, dok kod drugih ostaje aktivan. (Anguita-Ruiz i dr. 2020) Pojedini ljudi ne proizvode dovoljno enzima laktaze. Zbog toga, laktoza prolazi kroz creva nesvarena. Kada se to dogodi, crevne bakterije u crevima fermentišu laktozu, koja proizvodi gas koji dovodi do nadimanja i grčeva, i uzrokuje da voda uđe u creva, što brzo dovodi do dijareje. Ovi neprijatni simptomi povezani su sa netolerancijom na laktozu. Neki ljudi sa laktoznom intolerancijom ne mogu tolerisati nijedan mlečni proizvod, dok drugi mogu tolerišu male količine laktoze. Kada se konzumiraju mlečni proizvodi u obroku može doći do pojave manjih simptoma ili ih uopšte nema, ali konzumiranje mlečnih proizvoda samostalno (naročito tečnog mleka) može izazvati više teških simptoma. Zbog svega navedenog pojedinci koji su netolerantni na laktozu mogu izbegavati mlečne proizvode i stoga mogu imati problem sa ispunjavanjem preporuka za kalcijum i vitamin D u ishrani. Pošto ovi hranljivi sastojci igraju važnu ulogu u plodnosti, pojedinci koji su netolerantni na laktozu moraju posebno da vode računa o dobijanju adekvatne količine ovih hranljivih materija. Simptomi koji nastaju usled nemogućnosti varenja laktoze se obično razvijaju oko sat vremena nakon konzumiranja proizvoda koji je sadrže. (Malik i Panuganti, 2023) Geni značajni za razvijanje predispozicije laktozne intolerancije su *LCT* (Lactase) i *MCM6* (Minichromosome Maintenance Complex Component 6). Rizik od intolerancije na laktozu delimično zavisi od gena *MCM6*. *MCM6*

je deo MCM kompleksa koji pomaže u regulisanju ekspresija *LCT* gena, koji kodira laktazu – enzim, koja igra ulogu u razgradnji laktoze. Pojedinci koji poseduju CC ili CT varijantu mogu proizvesti malo laktaze, ali je količina vrlo ograničena. Ova varijanta možda neće predvideti netoleranciju na laktozu i rizik za pojedince koji nisu evropskog porekla. Ponekad osoba može razviti kratkoročnu laktoznu netoleranciju kada je već narušen imunitet u situaciji recimo sa nedijagnostikovanom celijakijom. Međutim, kada jednom pojedinac konzumira strogu dijetu bez glutena, intolerancija na laktozu ima tendenciju da se stiša. Važno je pri prepisivanju preporuka za ishranu za laktoznu intoleranciju imati u vidu i povezanost ovog stanja sa nedostatkom vitamina D i kalcijuma, te je potrebno proveriti i te parametre u krvi. (Koek i dr. 2010) (Alharbi i El-Sohemy 2017) Ovo je povezano sa rizikom od pobačaja kod žena. (Hou i dr. 2016)

#### 4.3.2. Geni uključeni u metabolizam mikronutrijenata

##### ***BCMO1* (Beta-Carotene Oxygenase 1): rs11645428**

Vitamin A igra važnu ulogu u muškom i ženskom reproduktivnom zdravlju, podržavajući imuni sistem, koji posreduje u aktivnosti reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i na taj način štiti gonade i reproduktivna tkiva od oksidativnog stresa. (Omu i dr. 1999) Retinoična kiselina biološki aktivan oblik vitamina A indukuje spermatogenezu tokom ranog razvoja i tokom detinjstva. (Vanderhout i dr. 2021) Više vrednosti serumskog retinola su primećene kod muškaraca sa normozoospermijom u poređenju sa onima sa oligospermijom, astenozoospermijom i azoospermijom. (Omu i dr. 1999) Sa nedostatkom retinoične kiseline, krvno-testisna barijera je ugrožena zaustavljanjem ćelijskog ciklusa na nivou mejoze I/II i postmejojskog razvoja spermatida. Nedostatak vitamina A oštećuje semenski epitel epididimisa, prostate i semenskih vezikula, što dovodi do prekida spermatogeneze. Uprkos nedostatku vitamina A koji dovodi do ranog prestanka spermatogeneze, jedna nedavna studija je otkrila da dugotrajni hronični prekomerni unos vitamina A narušava proizvodnju, morfologiju i pokretljivost spermatozoida kod miševa. Preporuka je da se proverí da li postoji zaista deficit za opravdanu suplementaciju. Enzim beta-karoten monooksigenaza 1 (*BCMO1*), koji je kodiran genom *BCMO1* koji pretvara cirkulišući beta-karoten u retinol. Pokazalo se da u proseku 70% osoba poseduje GG varijantu gena što je povezano sa neefikasnom konverzijom beta-karotena u retinol. Geni *STRA8* (Stimulated By Retinoic Acid 8) i *REC8* (Meiotic recombination protein REC8 homolog) su indukovani retinoičnom kiselinom i imaju značajnu funkciju u spermatogenezi. (Vanderhout i dr. 2021)

##### ***FUT2* (Fucosyltransferase 2): rs602662, rs601338**

Vitamin 12 ima integralnu ulogu u ciklusu remetilacije homocisteina u metionin igraju upravo vitamini B12 i B9. (Forges i dr. 2007) Koncentracije homocisteina u cirkulaciji su direktno

povezane sa oksidativnim stresom. (Tyagi i dr. 2005) Vitamin B12 deluje kao kofaktor za enzim metilen-tetrahidrofolat-reduktazu MTHFR, koji katalizuje remetilaciju homocisteina u metionin. (Sadeghian i dr. 2006) Povećan nivo homocisteina u krvi takozvana hiperhomocisteinemija stanje koje je povezano sa lošim ishodima biomedicinski potpomognute oplodnje i smanjenim kvalitetom sperme najčešće je uslovljena smanjenim nivoom folata i vitamina B12. (Safarinejad i dr. 2011) Stabilnost i koncentracija vitamina B12 u ljudskoj plazmi zavisi od njegovog unosa putem hrane, ali i biosinteze mikroba u crevima. Kod ljudi, enzim fukoziltransferaza 2 kodirana je genom *FUT2* koji je zaslužan za homeostazu vitamina B12 i transport kroz telo. Varijacije u ovom genu su povezane sa različitim nivoima vitamina B12. Nosioci GG varijante smatra se da imaju niže vrednosti vitamina B12 u plazmi i ovo stanje primećeno je kod oko 50% populacije. Pošto se vitamin B12 u ishrani samo prirodno dobija iz životinjskih izvora hrane, vegetarijanci i vegani su pod povećanim rizikom od nedostatka vitamina B12. S tim u vezi potrebno je pažljivo planiranje ishrane i suplementacije (Vanderhout i dr. 2021)

### ***MTHFR* (Methylenetetrahydrofolate reductase): rs1801133**

Vitamin B9 ili folat je najpoznatiji po svojim preventivnim efektima na razvoj defekata neuralne cevi kod fetusa u ranim fazama trudnoće. (Czeizel i Dudas 1992) Metabolizam vitamina B9 i B12 se prepliću. Enzim metilen tetrahidrofolat reduktaza MTHFR je jedan od enzima uključenih u pretvaranje folata u 5-metiltetrahidrofolat, koji je donator metil grupe u konverziji homocisteina u metionin i kodiran je genom *MTHFR*. (Boxmeer i dr. 2008) Uobičajena varijanta gena je 677TT genotip, koji pogađa približno 40% populacije i povezan je sa smanjenim kapacitetom za metilaciju DNK, nižim nivoima cirkulišućeg folata i višim koncentracijama homocisteina u serumu. (Stern i dr. 2000)

Studije koje ukazuju na značaj folata za reproduktivno zdravlje muškaraca su podeljene. Jedne smatraju da dodatak folata je pozitivno povezan sa manjim oštećenjem spermatozoida, većom gustinom sperme, normalnom morfologijom ćelija, ukupnim većim kvalitetom sperme i negativno je povezan sa neplodnošću dok druge imaju drugačije rezultate. (Vanderhout i dr. 2021)

Studija Clément i saradnika iz 2020. godine je zaključila da su fiziološke doze 5-MTHFR efikasnije od visokih doza folne kiseline u smanjenju nivoa homocisteina i poboljšanju procesa metilacije. (Clément i dr. 2020) Budući da su rezultati studija i dalje podeljeni potrebno je pre bilo kakve suplementacije uraditi laboratorijske analize folata.

### ***GSTT1* (Glutathione S-transferase theta 1): insercija ili delecija**

Vitamin C, ili askorbinska kiselina, ima različite fiziološke funkcije, kofaktor je mnogih enzima i naročito je poznat po svojoj ulozi snažnog antioksidansa. (Luck i dr. 1995) Enzimi koji se nazivaju glutathion S-transferaze, ili GST, odgovorni su za održavanje antioksidativnog ciklusa

glutation-askorbinske kiseline. Enzim GSTT1 pomaže u konverziji dehidroaskorbinske kiseline u askorbinsku kiselinu i kodiran je genom za *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1). Posedovanje dve kopije delecione varijante *GSTT1*, koje je primećeno kod 20–40% populacije, u zavisnosti od etničke pripadnosti, može narušiti enzimsku aktivnost GSTT1. (Ganesh i dr. 2009) Pojedinci koji su homozigoti za delecionu varijantu GSTT1 su u mnogo većem riziku od deficita kada ne ispune preporučenu dnevnu količinu za vitamin C. Rezultati male (N=24) dvonedeljne intervencije koja je obezbedila ishranu bogatu voćnim sokom i povrćem bogatim antioksidantima kod zdravih muškaraca i žena sa različitim genotipovima glutation-S-transferaze (GST) pokazali su da postoji povećanje aktivnosti enzima GST. (Cahill i dr. 2009) Ishrana se nije razlikovala između grupa, što je dovelo do zaključka da je upravo odgovor na ishranu zavisio od genotipa. Važno je da osobe koje su homozigoti za deleciju varijantu GSTT1 da ispune preporučeni dnevni unos vitamina C za sveukupno i reproduktivno zdravlje. (Yuan i dr. 2013) Koncentracije askorbinske kiseline u semenu mogu biti i do 10 puta veće od serumske askorbinske kiseline i pokazalo se da vitamin C ima svojevrsnu antioksidativnu ulogu u semenu kada se nalazi u dovoljnoj količini utičući na integritet i strukturu spermatozoida tako što promoviše okruženje u kojem oni mogu da napreduju, razvijaju se i reprodukuju. Randomizovane kliničke studije podržale su ovu pozitivnu povezanost između unosa vitamina C njegove koncentracije u serumu i semenu i zdravih parametara sperme. (Vanderhout i dr. 2021)

### **Geni koji učestuju u metabolizmu vitamina D**

CYP2R1 (Cytochrome P450): rs10741657; GC: rs2282679

GC (GC Vitamin D Binding Protein)

VDR (Vitamin D receptor)

Vitamin D ima dobro poznatu ulogu u zdravlju kostiju kroz modulaciju metabolizma kalcijuma, kao i niz drugih predloženih funkcija kao što su imunološka i inflamatorna modulacija i regulacija reproduktivnog sistema. (Ozkan i dr. 2010) Vitamin D se može dobiti ishranom i endogenom proizvodnjom nakon izlaganja sunčevoj svetlosti. (Holick 2004) Da bi izvršio svoje biološke funkcije, i dijetetski i endogeni vitamin D moraju biti aktivirani u formu 1,25-hidroksivitamin D pomoću enzima vitamin D 25-hidroksilaze, koji je delimično regulisan genom *CYP2R1*. (Holick 1988.) Aktivirani vitamin D se kroz telo transportuje vezan za protein, koji je kodiran *GC* genom. Pojedinci koji poseduju GG ili GA varijantu *CYP2R1* (*rs10741657*) i/ili GG varijantu *GC* gena (*rs2282679*), koji su prisutni u preko 80 % populacije, imaju povećan rizik od nižeg cirkulacije vitamina D. (Slater i dr. 2017) Biološki aktivan 1,25-hidroksivitamin D se vezuje za ciljne gene preko receptora za vitamin D (VDR). Ovaj receptor vitamina D zajedno sa enzimom 1 $\alpha$ -hidroksilaza (*CYP27B1*) koji metaboliše 25-hidroksivitamin D imaju aktivnu ulogu u pokretljivosti

spermatozoida. Vitamin D receptori su prisutni u Leidigovim ćelijama testisa, epididimisu, prostati, semenskim vezikulama, što ukazuje na potrebu za vitaminom D u takvim tkivima za spermatogenezu i sazrevanje sperme. Vitamin D utiče na koncentraciju holesterola i triglicerida u membranama glave spermatozoida, koji su važni za zaštitu DNK spermatozoida i potencijalno mogu uticati na održivost, pokretljivost i sposobnost oplodnje. Vitamin D usko je vezan za metabolizam kalcijuma koji igra ulogu u pokretljivosti spermatozoda i akrozomskoj reakciji (Vanderhout i dr. 2021) U randomizovanoj kontrolnoj studiji koja je obuhvatila 86 ispitanika istraživali su se efekti dijetetskih suplemenata na pokretljivost sperme kod muškaraca sa idiopatskom oligoastenozoospermijom. Ispitanici su bili podeljeni u dve grupe. Jedna je uzimala 200 IU vitamina D i 600 mg kalcijuma dnevno, dok je druga grupa uzimala 100 mg vitamina E i 100 mg vitamina C dnevno tokom 3 meseca. Bilo je dokaza da se broj spermatozoida po ejakulatu povećao u grupi sa kalcijumom i vitaminom D, ta grupa je postigla trudnoću u 16,3% slučajeva, u poređenju sa 2,3% u grupi sa vitaminom E i vitamin C. (Deng i dr. 2014) Druga randomizovana klinička studija od 300 neplodnih muškaraca u Danskoj je istraživala efekat 1.400 IU vitamina D i 500 mg kalcijuma dnevno tokom 5 meseci. Zaključak studije je da vitamin D i kalcijum mogu uticati na bioraspoloživot seksualnih steroida i kvalitet sperme. (Blomberg i dr. 2016) Osnovne pretpostavke su da neplodni muškarci sa nedostatkom vitamina D imali manje pokretnih spermatozoida, niži globulin koji vezuje polne hormone i niži odnos testosteron/estradiol. Muškarci sa serumskim 25-hidroksivitaminom D  $>75$  nmol/L imali su veću pokretljivost spermatozoida u poređenju sa muškarcima sa serumskim 25-hidroksivitaminom D  $<25$  nmol/L što se smatra deficitarnim. (National Institutes of Health, 2011) Primećeno je i ostvarivanje većeg broja uspešnih trudnoća. (Blomberg i dr. 2018) Studija koja je upoređivala 25-hidroksivitamin D u serumu sa nivoima 1,25-dihidroksivitamina D u serumu kod muškaraca sa plodnošću i neplodnošću, dala je rezultate koji nisu pokazali povezanost između koncentracija 25-hidroksivitamina D u serumu i parametara sperme, ali je bilo dokaza povezanost između viših koncentracija 1,25-dihidroksivitamina D i poboljšane pokretljivosti spermatozoida i ukupnim brojem spermatozoida kod neplodnih muškaraca, što i dalje doprinosi zaključku da su vrednosti vitamina D značajne za reproduktivno zdravlje da je važno pratiti njegove vrednosti u serumu pri planiranju ishrane za parove koji se bore sa neplodnošću. (Zhu i dr. 2016) Uticaj vitamina D na Anti-Müllerov hormon (AMH) je mnogo istraživaniji kod žena, međutim studija Holt i saradnika istraživala je ovu povezanost kod muškaraca. Zaključak je da AMH vrednosti mogu poslužiti kao marker za oštećenu funkciju Sertoljevih ćelija, međutim on nije bio direktno povezan sa suplementacijom vitamina D. (Holt i dr. 2023)

### **GC (GC Vitamin D Binding Protein): rs7041; rs4588**

Kalcijum je važan za različite funkcije u telu i kao što je već napomenuto veoma je značajan za reprodukciju. (Uhland i dr. 1992) Zdravlje kostiju, funkcija srca, zgrušavanje krvi i mišićne kontrakcije su direktno posredovane kalcijumom. (Peacock 2010) GC gen kodira protein koji vezuje vitamin D i pomaže u regulisanju apsorpcije i transporta vitamina D. Pojedinci sa alelom G GC rs7041 i C alelom GC rs4588, koji pogađa oko 60% populacije, imaju veći rizik za nisko cirkulišući vitamin D, koji je povezan sa nižim nivoom kalcijuma u cirkulaciji, kada je unos kalcijuma smanjen. (Vanderhout i dr.,2021)

Tečnost epididimisa i prostate sadrži 2-3 puta veću količinu kalcijuma od one koja se nalazi u serumu, što ukazuje na njenu suštinu u razvoju i funkciji spermatozoida. (Kavanagh 1985) Kalcijum igra važnu funkciju već od samog početka spermatogeneze. U germnativnim ćelijama postoji mnoštvo kalcijumovih kanala koji su značajnu za spermatogonijalnu fazu proliferacije. Povećan nivo kalcijuma doprinosi povećanju proizvodnje testosterona u Lejdigovim ćelijama. Spermatozoidi svoje kretanje modulišu u zavisnosti od kalcijuma tako što progesteron stimuliše ulazak ekstracelularnog kalcijuma u ćeliju što indukuje hemotaksične pokrete i plivanje ka jajnoj ćeliji. Mnoga dosadašnja istraživanja potvrdila su da je glavni uslov za akrozomsku reakciju ulazak kalcijuma kroz kalcijumske kanale na plazma membrani spermatozoida i da je upravo ovaj proces povezan sa oslobađanjem enzima i daljim mehanizmima koji su neophodni za međucelijsku komunikaciju između jajne ćelije i spermatozoida. (Harchegani i dr. 2018)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu vitamina E**

Vitamin E obuhvata grupu od nekoliko liposolubilnih molekula u koje spadaju tokoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ) i tokotrienol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ). Kod ljudi čak 90% vitamina E nalazi se u belom masnom tivu. (Zumaraga i dr. 2024) Ovaj mikronutrijent ima važnu ulogu u reprodukciji zbog svog antioksidativnog potencijala. Randomizovana, duplo slepa kontrolna studija ispitala je uticaj suplementacije od 400 mg vitamina E dnevno tokom 3 meseca kako bi ustanovila kakav uticaj ima na ishode vantelesne oplodnje kod parova. Ukupno je učestvovao 101 par, 50 parova je uzimalo vitamin E dok je 51 par spadao u kontrolnu grupu. U pojedinim parametrima kao što su stopa živorođenih, progresivna pokretljivost spermatozoida i stopa implantacije su bile veće u grupi sa vitaminom E, ali svi ostali mereni parametri nisu bili poboljšani, te je zaključak naučnika bilo to da nema statistički značajne razlike koja bi zasta doprinela rezultatima uspešnosti ishoda vantelesne oplodnje. (Matorras i dr. 2020) Slična studija Sabetian i saradnika potvrdila je isto, da vitamin E od 400mg u trajanju od 8 nedelja nije pokazala značajne rezultate poboljšanja kvaliteta sperme, kao ni studija Kessopoulou i saradnika koja je prepisivala 600mg vitamina E. (Sabetian i dr. 2021) Nekoliko studija je dokazalo visoku interindividualnu varijabilnost u koncentraciji  $\alpha$ -tokoferola u masnom tkivu. Smatra se da u

metabolizmu i transportu  $\alpha$ -tokoferola učestvuje oko 28 genetskih varijanti i trenutno ne postoje studije koje su dokazale povezanost između ovih varijanti i koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u masnom tkivu. (Zumaraga i dr. 2024)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu koenzima Q10**

Koenzim Q10 je liposolubilni molekul sličan vitaminu koji učestvuje u sintezi ATP-a u mitohondrijama i ima zaštitnu ulogu ćelijskih membrana i lipoproteina. Ima antioksidativnu ulogu zbog čega se smatra da može biti značajan za vitalnost i pokretljivost spermatozoida. Studija Safarinejad iz 2009. godine ustanovila je da korišćenje 300mg CoQ10 tokom šest meseci, što je doprinelo poboljšanju parametara sperme. Takođe kombinacija koenzima Q10 i letrozola tokom 3 meseca doprinelo je poboljšanju broja, morfologije i koncentracije spermatozoida. (Bahauldeen Fadhil i dr. 2024) Alahmar je 2022. godine u svojoj prospektivnoj studiji takođe potvrdio da 300mg dnevno koenzima Q10 doprinosi progresivnoj pokretljivosti. (Alahmar, 2022) Sa nutrigenetičkog aspekta želela sam da istražim koji sve geni učestvuju u metabolizmu koenzima Q10 i da li su promene u njima značajne. Studija Thakashi i saradnika identifikovala je 8 pojedinačnih polimorfizama koja učestvuju u metabolizmu koenzima Q10: *SREBP2* rs133291 (Sterol regulatory element-binding protein 2), *HMGCR* rs3846663 (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase), *APOB* rs1042034 (apolipoprotein B protein), *CYP7A1* rs3808607 (cytochrome P450 7A1), *NPC1L1* rs2072183 (NPC1 Like Intracellular Cholesterol Transporter 1), *ABCB1* rs1045642, rs2032582 takođe poznat kao *MDR1* (multi-drug resistance protein 1) i CD36 rs1761667 (cluster of differentiation 36). Kod muškaraca ni jedan od ovih polimorfizama nije bio značajan za metabolizam koenzima Q10. (Takahashi i dr. 2021)

### ***GSTM1* (Glutation-S-transferaze M1)**

Glutation GSH je mali molekul uključen u mehanizme oksidativnog metabolizma koji se dominantno odvija u mitohondrijama. Sintetiše se u citosolu, međutim nisu poznati svi molekularni mehanizmi značajni za puteve transporta glutaciona. (Wang i dr. 2021) Pojedina istraživanja ukazuju na uticaj glutacion-S-transferaze u idiopatskoj muškoj neplodnosti. Enzimsko aktivnost citosolne glutacion-S-transferaze M1 može biti smanjenama promenama u genima uzrokovanim gubitkom genetskog materijala. Genotip divljeg tipa je AA, dok je genotip homozigotne mutacije GG, a heterozigotni nosilac mutacije AG. Ovi polimorfizmi remete oksidativni metabolizam, doprinoseći povećanju stope strukturnog i funkcionalnog oštećenja spermatozoida. (He i dr. 2022)

Haidari i saradnici su u svojoj randomizovanoj trostruko slepoj kontrolisanoj kliničkoj studiji potvrdili uticaj suplementacije lipoične kiseline od 600mg tokom 12 nedelja na aktivnost

glutathion-S-transferaze. Ekspresija enzima bila je veća u interventnoj grupi, kao i vrednost testosterona, a došlo je do smanjenja FSH i LH hormona i prolaktina. (Haidari i dr. 2019)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu holina**

Holin je esencijalni nutrijent koji se nalazi u proizvodima životinjskog porekla kao što su iznutrice i jaja, takođe ga sadrže pšenične klice. Uprkos tome što je esencijalni nutrijent, unos za žene i muškarce često se njegove vrednosti nalaze ispod preporučenog dnevnog unosa. Holin je važan izvor jedinica ugljenika za metilaciju DNK i važan je za regulaciju ekspresije gena, kao i za biosintezu lipoproteina i membranskih fosfolipida. Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi u genu za metabolizam holina, holin dehidrogenaze (*CHDH*) su povezani sa većim rizikom od neplodnosti. Prijavljeno je da su muškarci sa genetskom varijacijom u *CHDH* (rs12676) imali smanjenu pokretljivost spermatozoida ili astenozoospermiju. Enzim fosfatidiletanolamin N-metiltransferaza (*PEMT*) katališe sintezu holina. Njegove varijante rs4646343 i rs7946 takođe utiču na endogenu homeostazu fosfatidilholina. (Vanderhout i dr., 2021.)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu betaina**

Betain se nalazi u morskim plodovima i proizvodima od celog zrna pšenice. (Craig 2004.) Pokazalo se da potrošnja betaina u studijama na životinjama povećava gustinu spermatozoida i poboljšava kvalitet spermatozoida, pri čemu se ovi efekti javljaju u vremenskom periodu kraćem od jednog spermatogenog ciklusa. (Shadmehr i dr. 2018) Koncentracija betaina u cirkulaciji zavisi od metabolizma folata i holina. Postoje dva ključna polimorfizma za metabolizam betaina gen za holin dehidrogenazu, *CHDH* (+432 G→T; rs12676) i fosfatidiletanolamin N-metiltransferaza (*PEMT*; -74). rs12325817). (da Costa i dr. 2006) Studije MTHFR nokaut miševa su otkrile povoljan efekat betaina na spermatogenezu, a u nedostatku folata, i betain i holin suplementacije sprečavaju hipometilaciju DNK. (Obeid i dr. 2013) Kod ljudi, konzumacija raznovrsne i uravnotežene ishrane doprinosi i adekvatnim snabdevanjem holina i betaina. (Datillo i dr., 2016)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu gvožđa**

Gvožđe je esencijalni nutrijent za održavanje zdravih crvenih krvnih zrnaca, transport kiseonika u krvi, imunološku funkciju i homeostazu slobodnih radikala. (Beard, 2001) Gvožđe je neophodno za fluidnost ejakulacije i održavanje pH sperme u funkcionalnom opsegu. (Nikolaev i dr. 1998) Pored toga, Sertolijeve i Lejdigove ćelije su izvori feritina, proteina za transport gvožđa. Feritin takođe štiti tkivo testisa. (Toebosch i dr. 1987) Anemija usled nedostatka gvožđa, manifestacija je niskog nivoa gvožđa u serumu, dovodi do smanjenog transporta kiseonika u cirkulaciji i stoga stvara hipoksičnu sredinu za testise. Zbog toga je veoma važno da ispitamo i bolest srpastih ćelija odnosno sideropeničnu anemiju kod pacijenata koji se susreću sa neplodnošću. Poznato je da muškarci sa

ovim stanjem imaju smanjen volumen ejakulata, gustinu, pokretljivost i morfologiju spermatozoida. (Agbaraji i dr. 1988) Varijacije u svakom od sledećih gena mogu uzrokovati smanjeno funkcionisanje proteina koje oni kodiraju, što zajedno može uticati na individualni rizik od niskog statusa gvožđa. *TMPRSS6*, *TFR2* i *TF* geni. *TMPRSS6* (transmembrane serine protease 6) kodira matriptazu-2, protein koji utiče na hepcidin, koji kontroliše apsorpciju gvožđa u epitelu creva. Gen za *TFR2* (transferrin receptor 2) reguliše TFR2 protein koji pomaže u transportu gvožđa kroz ćelijske membrane, a gen *TF* (transferrin) kodira transferin, koji transportuje gvožđe u krvi. Suprotno tome, genetske varijacije u *HFE* (Homeostatic Iron Regulator) i *SLC17A1* (Solute Carrier Family 17 Member 1) genima, koje kodiraju istoimene proteine, takođe utiču na apsorpciju gvožđa u crevima. (Vanderhout i dr. 2021) Višak gvožđa u semenskoj plazmi povezan je sa teratozoospermijom i smanjenom pokretljivošću zbog toga nije potrebno suplementirati pacijente gvožđem ako su laboratorijske vrednosti u referentnom opsegu. (Wise i dr. 2003) Onima koji poseduju genetske varijante koje povećavaju rizik od preopterećenja gvožđem savetuje se da ne konzumiraju previše hrane bogate gvožđem i treba da izbegavaju kombinovanje hrane koja sadrži gvožđe i vitamin C jer prisustvo kiseline pomaže u održavanju gvožđa u njegovom rastvorljivijem obliku ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Pored toga, osobama sa rizikom od preopterećenja gvožđem može se preporučiti da promene ishranu sa namirnicama biljnog porekla koje sadrže ne-hem gvožđe, koje se apsorbuje manje efikasno od hem gvožđa. (Teucher i dr. 2004)

### ***ACE (Angiotensin-converting enzyme) rs4343***

Natrijum je veoma važan mikronutrijent koji učestvuje mnogim ćelijskim procesima preko takozvane Na/K pumpe. Uloga natrijuma u ishrani je da reguliše krvni pritisak, zapreminu krvi, mišićne kontrakcije, održava zapreminu vode u organizmu. U sve zastupljenijoj zapadnjačkoj ishrani većina ljudi konzumira više natrijuma nego što je potrebno telu. Hipertenzija koja može biti uzrokovana većim unosom natrijuma i može negativno uticati na kvalitet sperme kod muškaraca. (Eisenberg dr. 2015) Kod žena, hipertenzija pre i tokom trudnoće povećava rizik od mnogih ozbiljnih komplikacija za fetus u razvoju, kao i za samu majku. Međutim, neki pojedinci ne doživljavaju tako sjajno povećanje krvnog pritiska kao odgovor na unos viška natrijuma kao i drugi. Istraživanja pokazuju da efekat unosa natrijuma na krvni pritisak može biti posledica varijacije u genu koji se zove *ACE* (Angiotensin). *ACE* gen usmerava telo da proizvodi angiotenzin koji konvertuje enzim ACE, koji igra ulogu u regulisanju krvnog pritiska nakon unosa natrijuma. Oni koji imaju GA ili AA varijantau *ACE* gena su u većem riziku od ispoljavanja povišenog krvnog pritiska kada se konzumiraju veće količine natrijuma nego oni koji poseduju GG varijantu gena. S tim uvezi posebno je obratiti pažnju kod kreiranja jelovnika osobama koje imaju zastupljene ove

polimorfizme kroz mnogo manji unos zasoljene hrane poput maslina, suhomesnatih sušenih i konzerviranih proizvoda. (Poch i dr. 2001)

### **Geni koji učestvuju u metabolizmu selen**

Selen je mikronutrijent značajan za reprodukciju, spermatogenezu, razvoj testisa i očuvanje pokretljivosti spermatozoida. Jedna od njegovih funkcija upravo je povezana sa enzimom glutation peroksidaze sa kojim predstavlja svojevrsni antioksidativni štit. Smatra se da su namirnice bogate selenom značajne da se nađu u svakodnevnoj ishrani zbog svoje biodostupnosti i manje toksičnosti. Međutim kao što je slučaj i sa mnogim drugim mikroelementima i u uzimanju selen se mora biti umeren, jer i deficit i prekomeran unos mogu negativno uticati na pokretljivost, količinu spermatozoida i promenama u morfologiji spermatozoida. (Silva de Castro Pacheco da Cunha i dr. 2021) U svom preglednom radu Dimitriadis i saradnici su ustanovili da su najčešće prepisivane doze za selen bilo kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim antioksidansima bila 200 mg. (Dimitriadis i dr. 2023) Mnogobrojne namirnice sadrže selen u tragovima kao što je hrana životinjskog porekla, žitarice, voće i povrće, brazilski orah, riba, mleko i mlečni proizvodi. Koncentracija selen u namirnicama biljnog porekla zavisi u mnogome od tla na kojem rastu i zasićenošću zemljišta selenom. (Hu i dr. 2021)

### ***SLC39 i SLC30: (Solute-carrier genes)***

Količina cinka je u ljudskom telu relativno konstantna čineći oko 24% svih elemenata. Ubedljivo najveća količina cinka se nalazi u prostati, čak 100 puta više nego u krvi, a relativno ravnomerno je raspoređen u drugim tkivima. Ovaj podatak navodi na to da se utvrdi značaj cinka za reproduktivni sistem muškaraca. (Milostić i dr. 2020) Joni cinka zbog svog naelektrisanja i hidrofilne prirode ne mogu neometano da prolaze kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane spermatozoida, te im to omogućavaju proteinski transporteri SLC39 i SLC30. Cink ima vitalan značaj u spermatogenezi akumulirajući se u zametnim ćelijama i povećavajući svoju koncentraciju u testisima. Ovaj proces doprinosi morfološkoj transformaciji spermatozoida. Pri samom kraju diferencijacije spermatozoida cink postaje koncentrisan u predelu repa utičući na pokretljivost. (Veselinovic i dr. 2025)

Nekoliko studija objavilo je svoje rezultate u kojima prikazuju da su kod neplodnih muškaraca vrednosti cinka bile niže od referentnih vrednosti. (Milostić i dr. 2020) Nedavno objavljena studija Veselinović i saradnika nije pokazala statistički značajne razlike u vrednostima cinka između normospermičnih i teratospermičnih muškaraca koji su sa svojim partnerkama postigli trudnoću putem biomedicinski potpomognute oplodnje. Međutim ono što jeste važan podatak je da su izmerene niže vrednosti kod obe grupe muškaraca u odnosu na vrednosti zabeležene u drugim zemljama.

#### 4.4. Različiti režimi ishrane i njihov uticaj na zdravlje spermatozoida

Mnoge komponente koje potiču iz hrane utiču na pravilnu spermatogenezu kao i zdravlje i funkciju spermatozoida. Istraživanja pokazuju da modeli zdrave ishrane jasno koreliraju sa boljim kvalitetom sperme i manjom mogućnošću postojanja abnormalnosti u parametrima kao što su količina, koncentracija i pokretljivost spermatozoida, kao i sa smanjenom fragmentacijom DNK u ćelijama. Muško seme je mešavina sekreta različitih žlezda. Uključuje kiselu fosfatazu, limunsku kiselinu, inozitol, bakar, kalcijum, cink i magnezijum, fruktozu, seminogelin, vitamine C i E, prostaglandine, karnitin, glicerofosfatoholin i neutralnu alfa-glukozidazu. Pored toga, sperma se takođe sastoji od proteina, karotenoida, elektrolita natrijuma i kalijuma, ili glukoze, selen, uree, mlečne kiseline i holesterola. Preporučeni standard ishrane je ishrana bogata sirovim povrćem i voćem, integralnim žitaricama i proizvodima bogatim vlaknima, umesto proizvoda na bazi prečišćenog brašna. Maslinovo ulje, masna morska riba iz pouzdanog izvora, orasi, semenke i koštice i avokado su dobri izvori nezasićenih masti, koje mogu činiti do 35% kalorijske vrednosti u ishrani. Zbog toga je dobar izvor proteina nemasna živina i nemasni mlečni proizvodi, mahunarke, riba i morski plodovi. Štaviše, treba istaći ulogu odabranih minerala, antioksidativnih vitamina i omega-3 masnih kiselina, čije će se delovanje zasnivati pre svega na minimiziranju oksidativnog stresa i takođe naglasiti da je pre bilo kakvog doziranja suplemenata potrebno proveriti vrednosti vitamina i minerala u krvi.

##### 4.4.1. Mediteranska ishrana

Mediteranska dijeta se smatra modelom ishrane u okviru principa ishrane za plodnost. Pokazane su mnoge zdravstvene prednosti mediteranske dijeta, uglavnom zbog njenih antioksidativnih, antiinflamatornih efekata. Upražnjavanje ove dijeta je takođe povezano sa boljim kvalitetom sperme u opservacionim studijama, ali su potrebne dalje interventne studije u ovoj oblasti da bi se utvrdilo da li može doprineti većoj šansi za pozitivan ishod trudnoće. Iako oksidativni stres teži da bude primarni faktor u osnovi muške neplodnosti, treba naglasiti da su studije o efikasnosti antioksidativne terapije još uvek kontradiktorne. Čini se da oralna suplementacija antioksidansima poboljšava parametre za procenu kvaliteta sperme i povezana je sa manjim oštećenjem DNK. Međutim, nisu dostupne pouzdane studije koje procenjuju uticaj suplementacije antioksidansima na pozitivne ishode trudnoće i stopu živog rođenja. (Skoracka dr. 2020)

Kada je reč o efektima ove dijeta na kvalitet sperme i plodnost muškaraca, postoji samo nekoliko opservacionih studija koje su objavljene u literaturi, i samo dve randomizovane kontrolisane studije koje pokazuju poboljšanja parametara semena. Jedna od ovih studija, koju su sprovedli Montano i saradnici, čak se odvijala u veoma zagađenim oblastima i pokazala je poboljšanje redoks statusa semena. Studija Corsetti i saradnika okupila je 50 muškaraca koji su se pridržavali mediteranskog načina ishrane u periodu od novembra 2020. do oktobra 2021. uz smernice da 80% potrošnje

namirnica bude organskog porekla. Dnevni unos integralnih žitarica i namirnica sa niskim glikemijskim indeksom, doručak je uključivao hleb od celog zrna sa izvorom proteina kao što su jaja, divlji losos, orasi i crveno voće. Alternativno, zob u obliku palačinki ili kaše je takođe bio dozvoljen kao opcija za doručak. Mlečni proizvodi su eliminisani ili smanjeni, sa nekim izuzecima za kozje sireve. Dnevna konzumacija fermentisane hrane kao što su jogurt ili kefir. Dnevna potrošnja crvenog voća i 3 porcije zelenog lisnatog povrća. U proseku 30 g oraha dnevno. Potrošnja mahunarki najmanje 3-4 puta nedeljno. Konzumacija divljih morskih algi najmanje 5-6 puta nedeljno, uključujući masnu ribu 2-3 puta. Eliminacija prerađenog mesa. Konzumacija mesa hranjenog travom ili organskog mesa 3-4 puta nedeljno. Potrošnja 8-10 jaja nedeljno. Potrošnja voća ograničena na maksimalno 300 g dnevno. Potrošnja povrća iz porodice krstašica najmanje 4-5 puta nedeljno. Eliminacija upakovanih kupovnih proizvoda. Česta upotreba začina kao što su đumbir, kurkuma, korijander, ružmarin, bosiljak, beli luk, crveni luk i peršun. Nakon nutricionističkog savetovanja i primene personalizovanog plana ishrane, primećeno je da su pojedinci koji su modifikovali svoju ishranu smanjenjem rafiniranih šećera i povećanjem konzumacije celih žitarica, svežeg povrća i mahunarki, uz izbegavanje upakovane hrane i mlečnih proizvoda, doživeli značajno povećanje nivoa testosterona.

Istovremeno, grupa muškaraca koji su se pridržavali ishrane sa oko 50% unosa ugljenih hidrata tokom 3 meseca, pri čemu je njihov unos antioksidanata povećan svakodnevnom konzumacijom crvenog voća i minimalno 3 porcije svežeg povrća dnevno, uz izbegavanje upakovane hrane i eliminisanje mlečnih proizvoda, pokazalo je značajno smanjenje fragmentacije DNK sperme.

Randomizovana klinička studija Montano i saradnika dokazala je da intervencije u ishrani i fizičkoj aktivnosti u trajanju od 4 meseca značajno mogu poboljšati kvalitet sperme zdravih mladih muškaraca. Dijetetske promene zasnovane na postulatima mediteranske ishrane uspele su da prevaziđu čak i uticaj zagađenja životne sredine u kojoj su ispitanici živeli, a koja takođe sama po sebi već negativno utiče na kvalitet reproduktivnog materijala. (Montano i dr. 2022)

#### 4.4.2. Dijeta sa povećanim unosom proteina

Postoji 20 proteogenih aminokiselina koje su gradivni blokovi sinteze proteina. Ovo nisu samo građevinski blokovi peptida i proteina, već su takođe neophodni za proizvodnju mnogih bioaktivnih molekula koji doprinose regulaciji metabolizma i signalnih puteva u telu. Neophodno objasniti ulogu aminokiselina u ljudskoj reprodukciji i razjasniti snažnu korelaciju između ishrane bogate proteinima i reprodukcije. Dijetetski i nutritivni suplementi za povećanje plodnosti istraženi su u terapiji muške neplodnosti obezbeđivanjem para-aminobenzojeve kiseline (PABA) iz semenki grožđa i crvene deteline. Uključivanje u ishranu prebiotika i probiotika za modifikovanje aktivnosti crevnih bakterija poboljšalo bi reproduktivne performanse i kod muškaraca i kod žena, kao i kod njihovog potomstva. Aminokiseline pokazuju eminentnu ulogu u višestrukim biološkim i psihološkim procesima i antioksidativnim svojstvima koja su aktivna primarna odbrana za zaštitu strukture membrane sperme. U procesu reprodukcije, semenska plazma je ključna biološka tečnost koja kontroliše funkciju spermatozoida. Ishrana sa nedostatkom aminokiselina smanjuje broj spermatozoida za oko 90% i povećava procenat nepokretnih spermatozoida približno 10 puta. Suplementi aminokiselina povećavaju broj spermatozoida za 18% i pokretljivost za 7,6%. Aminokiseline semenske plazme (alanin, serin, valin, glicin, L-prolin, L-glutamin) omogućavaju veću vijabilnost ćelija nakon odmrzavanja i poboljšavaju ukupnu pokretljivost spermatozoida održavajući viši funkcionalni integritet membrane i akrozoma smanjenjem peroksidacije lipida. Utvrđeno je da su specifične aminokiseline u semenskoj plazmi povezane sa značajnijim postotkom integriteta DNK nakon odmrzavanja sperme. (Ma i dr. 2022)

### 5. Šta je epigenetika i kako može uticati na plodnost?

#### 5.1. Osnove epigenetike

Epigenetika uključuje reverzibilne i nasledne procese koji regulišu ekspresiju gena bez povezanih promena u kodirajućoj sekvenci DNK. U stvari, epigenetska disregulacija može biti osnova nastanka različitih hroničnih bolesti i njihovog napredovanja. Kompleksne interakcije između hranljivih materija i metilacije DNK, nekodirajuće RNK i kovalentnih modifikacija histona doprinose gojaznosti, dijabetes melitusu tipa 2, dislipidemiji, kardiovaskularnim bolestima, nealkoholnoj masnoj bolesti jetre i razvoju kancera. Na primer, ishrana bogata mastima i šećerom povezana je sa abnormalnim obrascima metilacije neuropeptidnih gena koji kontrolišu unos hrane i mogu biti uključeni u razvoj gojaznosti. Slično, ishrana sa niskim sadržajem proteina može da promeni nivoe lipida i glukoze ometajući modifikacije histona unutar glavnih regulatornih gena. Nutriepigenetika predstavlja proučavanje nutritivnih intervencija koje menjaju epigenetske promene koje značajno utiču na lečenje i prevenciju hroničnih bolesti. Na primer, pokazano je da su

antiinflamatorni efekti mediteranske dijeta povezani sa inhibitornom hipermetilacijom proinflamatornih gena. (Karim Kiani i dr. 2022.)

## 5.2. Epigenetske modifikacije u kontekstu plodnosti

Smatra se da epigenom funkcioniše kao druga dimenzija DNK sekvence koja je veoma efikasna u održavanju obrazaca koji pripadaju ekspresiji gena specifičnog za ćelijski tip. Pošto epigenom ćelije ima veliku plastičnost i može se reprogramirati, epigenetske modifikacije dinamički i reverzibilno kontrolišu ekspresiju gena. Epigenetsko reprogramiranje menja sudbinu ćelija tokom razvoja i odraslog doba. Važno je napomenuti da faktori sredine igraju važnu ulogu u stvaranju i održavanju epigenetskih oznaka. Epigenetski procesi utiču na potencijal oplodnje kao i na funkciju spermatozoida. Odgovarajuće funkcionisanje koje se odnosi na epigenetske mehanizme, naime, metilaciju DNK, nekodirajuću RNK, remodeliranje hromatina i modifikacije repa histona tokom razvoja gonada, kao i tokom spermatogeneze, od suštinskog je značaja za normalnu proizvodnju i funkciju spermatozoida. Nedavni napredak u tehnologijama sekvenciranja daje nadu, jer nam može pomoći da identifikujemo zašto neki parovi doživljavaju idiopatsku neplodnost. Remodelovanje hromatina, rezidualne promene histona uz metilaciju DNK odražavaju ključne epigenetske promene koje se dešavaju i na ribonukleinskoj kiselini (RNK) spermatozoida, a čini da sve ovo igra važnu ulogu u identifikaciji muške neplodnosti. (Erdoğan i dr. 2023)

Rotondo i saradnici zaključili su da aktivnost enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) i njegovog proizvoda S-adenozilmetionin (SAM) igraju ulogu u evoluciji, morfologiji i pokretljivosti spermatozoida. Primećeno je da je enzim MTHFR uključen u metabolizam folne kiseline i da njegova aktivnost može biti važan faktor u spermatogenezi. U jednoj studiji je utvrđeno da se promotor gena za hipermetilaciju MTHFR često javlja u spermi dobijenoj od neplodnih osoba, i da je relativno češći kod muškaraca sa istorijom spontanog pobačaja nego kod muškaraca bez istorije spontanog pobačaja. Ovaj rezultat ukazuje na novi muški parametar povezan sa neplodnošću i spontanim pobačajima. Iz tog razloga, čini se da se promotor gena za hipermetilaciju *MTHFR* pojavljuje kao novi potencijalni faktor rizika u etiologiji spontanog pobačaja. (Rotondo i dr. 2012)

## 5.3. Metilacija DNK

Metilacija DNK je epigenetski marker koji se često ispituje. Ova promena epigenetske vrste je potrebna za razvoj gametogeneze žena i muškaraca. Unutar genoma sisara, metilacija DNK se javlja uglavnom u okviru guanina i citozina na petoj poziciji koja se odnosi na citozinske baze. Ovo se zove 5-metilcitozin (5mc). Ovi dinukleotidi su definisani kao metilovani regioni na drugačiji način, koji se obično nalaze bliže regionima koji su poznati kao regulatori gena poput promotera. Jedan od enzima koji održavaju metilaciju DNK tokom replikacije DNK je DNMT1. Nedostatak DNMT1 dovodi do aberacija tokom spermatogeneze, kao i do gubitka metilacije uglavnom u utisnutim

genima očeve vrste. Enzimi DNMT3B, DNMT3L, zajedno sa DNMT3A učestvuju u metilaciji DNK tokom razvoja zametnih ćelija u embrionalnoj fazi. Svi DNMT su potrebni da bi se desila odgovarajuća spermatogeneza. Metilacija DNK sperme je povezana sa promenama sperme, kao i sa neplodnošću. (Erdoğan i dr. 2023. ) Hiljade gena je uključeno u spermatogenezu. Cannarella i saradnici su još nedavno objavili listu od 60 gena uključenih u spermatogeni neuspeh, što govori o eksponencijalnom širenju našeg znanja o genima uključenim u mušku neplodnost. Slično, Patel i saradnici nedavno su pokazali korisnost korišćenja sekvenciranja sledeće generacije za identifikaciju gena za koje se zna da utiču na plodnost muškaraca, sugerišući da se sekvenciranje sledeće generacije može koristiti za brže identifikovanje većeg broja gena za koje se smatra da su povezani sa muškom neplodnošću sa većom preciznošću i uz značajno smanjenu cenu u poređenju sa tradicionalnom standardnom analizom. Međutim, iako nastavljamo da identifikujemo gene uključene u neplodnost, ovi geni ostaju prvenstveno od dijagnostičkog interesa, a malo njih je rezultiralo terapijskim ciljevima za lečenje muške neplodnosti. Epigenetske promene mogu imati suptilan, neke od njih čak beznačajan biološki uticaj, potrebno je dalje obavljati studije u cilju dobijanja konkretnih terapijskih rešenja. (Krzastek i dr. 2020.)

#### 5.4. Uticaj ishrane i suplementacije na epigenetske promene

Nutricionistička epigenetika, odnosno proučavanje promena u ekspresiji gena izazvanih bioaktivnim jedinjenjima u ishrani, pojavljuje se kao nova tema u studijama koje istražuju uticaj ishrane na zdravlje. Ishrana je jedan od faktora koji se najviše menjaju i koji mogu da utiču na puteve metilacije DNK. Pokazalo se da ishrana može da utiče na epigenetsku regulaciju metilacije DNK na različite načine menjanjem supstrata i kofaktora neophodnih za ovaj proces, promenom aktivnosti enzima koji regulišu aktivnosti demetilacije DNK. Najvažniji efekat ishrane na epigenetsku modulaciju ekspresije gena predstavljaju nutritivna iskustva u ranom životu koja su u stanju da indukuju uporne metaboličke i fiziološke promene kroz izmenjene epigenetske profile, što dovodi do različite osetljivosti na različite hronične bolesti u kasnijem životu. Ishrana majke se može smatrati glavnim uticajem na resetovanje epigenoma u ranom embrionu. Konkretno, citoplazmatski sastojci reaguju na ishranu majke na specifičan način: mast u ishrani povećava veličinu i sastav lipidnih kapljica, mikronutrijenti utiču na metilaciju DNK, a promene u lipidima i šećerima u ishrani utiču na aktivnost mitohondrija. Nedavne studije su potvrdile da mušjaci takođe prenose epigenetske modifikacije na svoje potomstvo, utičući ne samo na rast embriona već i na životno zdravlje. Epigenetske promene mogu uticati na razvoj muških zametnih ćelija u različitim fazama. Uticaj okoline ili načina života kao što su toksini, endokrini ometači, pušenje, endokrini poremećaji i gojaznost mogu uticati na spermu tokom razvoja u testisima ili tokom sazrevanja u epididimisu. Konkretno, pokazano je da spermatozoidi gojaznih muškaraca netolerantnih na

glukozu pokazuju različite male ekspresije nekodirajuće RNK i metilaciju DNK u poređenju sa normalno uhranjenim, tolerantnim subjektima na glukozu. Ovo specifično remodelovanje je uključivalo regulatore gena za kontrolu apetita (kao što su *MC4R*, *BDNF*, *NPI*, *CRI*) ili metabolizma (kao što su *FTO*, *CHST8*, *SH2B1*). Ove rezultate su potvrdili Soubri i saradnici koji su potvrdili da se status telesne mase i gojaznosti može pratiti u epigenomu sperme. Iako gore navedene studije ne omogućavaju da se razjasni da li je izmenjena metilacija sperme bila posledica same gojaznosti ili načina života pacijenata, ova zapažanja zajedno pokazuju prisustvo veze između ishrane i epigenetskih obrazaca sperme. Stoga je moguće da se epigenetske modifikacije sperme mogu preneti na potomstvo, što može dovesti do očeovog epigenetskog nasleđivanja metaboličkih poremećaja. Stoga je predloženo da mehanizam vezan za ishranu koji prolazi kroz mušku liniju može da utiče na dugovečnost i rizik od kardiovaskularnih oboljenja i dijabetes melitusa kada su otac ili deda bili izloženi višku hrane od 9.–12. godine života. Dakle, epigenetske modifikacije mogu uticati na reproduktivno zdravlje oba pola, kao i na stresne faktore oba roditelja, čak i pre začeća, i mogu oblikovati razvojnu putanju i životni tok embriona i fetusa. (Franzago i dr. 2020.)

## 6. Kliničke implikacije i preporuke

### 6.1. Primena nutrigenetike u kliničkoj praksi

Nutrigenetika je još uvek mlada nauka. Njeno razvijanje otpočeto je nakon završavanja projekta humanog genoma koji je zvanično završen u aprilu 2003. godine. Od tada do danas, počinje ekspanzija u različitim granama genetike kojem i danas svedočimo i koje će po procenama biti esencijalno za budućnost personalizovane medicine kako sa aspekta preventive, tako i lečenja. U Evropi i Americi već postoje kompanije i laboratorije koje se bave genetskim analizama pružajući svoje usluge klijentima i pacijentima kao i medicinskim radnicima koji žele da svoja profesionalna znanja prošire i kroz bolje poznavanje genetike. Samim tim ovakvu inicijativu prate tehnološke mogućnosti i naučna finansiranja samim tim i rezultati. U Srbiji je nešto drugačija situacija, što utiče i na brzinu ostvarivanja i implementiranja poslednjih trendova u medicini u kliničkoj praksi. Trenutna ograničenja u sprovođenju nutrigenetičkog testiranja u redovnoj kliničkoj praksi su u ceni, kvalitetu testova koji postoje na tržištu i edukovanja kadra koji bi tumačio rezultate analize gena i donosio procenu i preporuke za ishranu, suplementaciju, fizičku aktivnost ili odabir i doziranje terapije. Uprkos tome, i dalje postoji inicijativa pojedinaca za implementiranjem inovacija i savladavanjem prepreka. Dokle god bude postojala inicijativa pojedinica za bavljenje naukom i prepoznavanje i vrednovanje toga, možemo verovati da je potpuno personalizovan pristup u preventivi i lečenju zaista moguć.

## 6.2. Preporuke za ishranu i suplementaciju u kontekstu poboljšanja plodnosti muškaraca

Iz ovog preglednog rada možemo zaključiti da su korekcije u ishrani parova koji žele da osnuju porodicu značajne ne samo sa aspekta plodnosti muškaraca ili žena pojedinačno, već i u svrhu poboljšanja celokupnog zdravlja parova i usvajanja dobrih životnih navika kako za sebe, tako i za svoju buduću porodicu. Mediteranska i ishrana sa povećanim udelom proteina za sada su pokazale najbolje rezultate među ispitanicima. Ishrana sa manjim udelom ugljenih hidrata i povećanim udelom masti je pokazala značajne rezultate kod gojaznih muškaraca u svrhu redukcije telesne mase. Međutim dugoročni efekti ovakve dijetе nisu nam poznati. Takođe ukoliko se pristupa dijeti sa većim udelom masti, preporuka je da se uradi nutrigenetička analiza da bi se utvrdilo koji tip masti osoba dobro metaboliše i da li je taj izbor dijetе zapravo relevantan na osnovu genetskog profila. Raznovrsnom ishranom možemo obezbediti dovoljan unos mikronutrijenata ukoliko ne postoje predispozicije za deficit nekog vitamina ili minerala koji je genetski uslovljen. Pre bilo kakvih preporuka, potrebno je proveriti njihove vrednosti laboratorijski i tek nakon ustanovljenog deficita davati preporuke. Popularna kombinovana suplementacija nije dobar izbor zbog toga što sufitit nekog od elemenata može da dovede do suprotnog efekta, odnosno da poremeti parametre sperme ili da zapravo ne popravi ni malo nalaz koji je već sam po sebi van referentnih vrednosti. Suplementi koji su pokazali značajnima za poboljšanje plodnosti muškaraca su vitamin C i vitamin D. Rezultati studija pokazuju nedvosmislene rezultate kada je reč o kontrolisanoj suplementaciji ovim vitaminima. Svi dodatni mikronutrijenti mogu biti podrška ovoj suplementaciji ukoliko se laboratorijskim testovima ustanovi da postoji njihov deficit. Veoma je važno proveriti krvnu sliku muškaraca zbog mogućnosti postojanja sideropenične anemije, koja dovodi do hipoksične sredine u testisima. U tom slučaju je neophodna suplementacija gvožđem u kombinaciji sa vitaminom C.

## 6.3. Budući pravci i ispitivanja

Gotovo svaka naučna oblast teži savremenijem pristupu, što nam i omogućavaju tehnološke inovacije. Teme infertiliteta i metoda biomedicinski potpomognute oplodnje zaokupiraju sve veću pažnju naučne javnosti, te su buduća ispitivanja neophodna kako bismo imali što više naučno relevantnih podataka. Važno je da se kritički odnosimo prema novinama, ali i da ih prigrlimo jer na taj način doprinosimo struci negujući multidisciplinarnost u radu sa pacijentima. Za sada spermogram i dalje predstavlja najrelevantniju dijagnostičku metodu u utvrđivanju neplodnosti muškaraca. Iako se oslanja na prilično subjektivnu procenu embriologa, novije tehnologije koje se zasnivaju na kompjuterskoj analizi i dalje nisu dovoljno precizne te ih je potrebno dodatno razvijati. Sve informacije zapisane u genima se prenose na potomstvo u vidu jedinstvenog zapisa. Sada imamo potvrdu da još mnogo toga nezapisanog u DNK sekvenci postaje deo jedinstvene poruke koja se prenosi sa roditelja na decu u vidu transgeneracijskog epigenetskog nasleđa. Potrebno je

podsticati naučnike na istraživanje u ovoj oblasti kako bismo imali još pouzdanije informacije, rezultate i primenu koja će izaći van naučnih okvira i ući u kliničku praksu.

## 7. Zaključak:

Zaključak ovog rada ukazuje na važnost holističkog pristupa u poboljšanju plodnosti muškaraca, koji uključuje ne samo ishranu i suplementaciju, već i individualne pristupe zasnovane na genetskim analizama. Promene u ishrani, kao što su smanjenje unosa ugljenih hidrata ili povećanje proteina, mogu imati značajan uticaj na kvalitet sperme, posebno kada se kombinuju sa ciljanom suplementacijom mikronutrijentima. Iako su trenutno dostupne dijagnostičke metode korisne u praksi, potrebno je dalje razvijati tehnologije koje omogućavaju preciznije merenje plodnosti i predviđanje uspeha tretmana. Štaviše, istraživanje transgeneracijskog uticaja životnih navika i ishrane na zdravlje potomstva pruža dodatnu dimenziju u razumevanju problema neplodnosti. S obzirom na ubrzan napredak u oblasti biomedicinske tehnologije, očekuje se da će buduća istraživanja otvoriti nove mogućnosti za preciznije dijagnoze i efikasnije terapije. Ovaj pristup, koji integriše nutrigenetiku, epigenetiku i savremene dijagnostičke metode, može omogućiti bolje rezultate za parove koji žele da osnuju porodicu.

## Literatura:

1. Calogero A. E. et al, "The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology", *World J Mens Health*, 2023 Jan 5; 41(2): pp. 237–254.
2. University of Cambridge, *The history of medical studies of male infertility*, 2014, September 10, <https://medicalxpress.com/news/2014-09-history-medical-male-infertility.html>, 29.3.2025.
3. Carson S. A., and Kallen A. N., "Diagnosis and Management of Infertility", *JAMA*. 2021 Jul 6; 326(1): pp. 65–76.
4. Du L, Chen W, Cheng Z, Wu S, He J, Han L, He Z, and Qin W, Novel Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis, *Cells*. 2021 Mar; 10(3): 666., Published online 2021 Mar 17. pp. 1-10.
5. Nikolić I. R., Rančić G., Radenković G., Lačković V, Todorović V., Mitić D., Mihailović D. "Embriologija čoveka", 7. izdanje, *Data Status*, Beograd, 2018, str. 33-35
6. Sun Y., Sun J., Leng X., Liang Y., Zhang F., Jiang X., Yang Y., and Shen Y. , "CEP128 is involved in spermatogenesis in humans and mice", *Nat Commun*. 2022; 13: 1395., Published online 2022 Mar 16. pp. 1-14
7. Nunes D.C., Ribeiro J.C., Alves M. G., Oliveira P.F., Bernardino R.L., "Male Sex Hormones, Metabolic Syndrome, and Aquaporins: A Triad of Players in Male (in)Fertility", *Int. J. Mol. Sci*. 2023, 24(3), 1960; pp. 1-10
8. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., " Tena-Sempere, M. Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms". *Physiol. Rev*. 2012, 92, pp. 1235–1316.
9. Basaria, S., "Male hypogonadism". *Lancet*, 2014 Apr 5;383(9924):pp. 1250-1263.
10. Lamm, S., Chidakel, A., Bansal, R., " Obesity and Hypogonadism". *Urol. Clin. N. Am*. 2016, 43, pp. 239–245
11. Skorupskaite, K., George, J.T., Anderson, R.A. "The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease". *Hum. Reprod. Update* 2014, 20, pp.485–500.
12. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* Sixth Edition, ISBN 978-92-4-003078-7, 2021, July 27, pp. 83-105.
13. Jedidi I., Ouchari M., Yin Q., "Sex chromosomes-linked single-gene disorders involved in human infertility". *Epub* 2018 Oct 25.
14. Aitken R. J. and Baker M.A., "The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility-A Unifying Hypothesis?". 2020 Sep 30;11:581838. *eCollection* 2020. pp. 1-16.
15. Aitken R.J., Ross A., Lees M.M. "Analysis of sperm function in kartagener's syndrome". *Fertil Steril*. (1983) 40:696–8. pp. 1-7
16. Lissens W., Mercier B. , Tournaye H., Bonduelle M. , Férec C., Seneca S., Devroey P., Silber S., Van Steirteghem A., Liebaers I., "Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities", *Hum Reprod*. 1996 Dec;11 Suppl 4:55-78; pp. 79-80.

17. Fang Y., Su Y., Xu J., Hu Z., Zhao K., Liu C., Zhang H., “Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation”. *Front Immunol.* 2021 Aug 31;12:729539. pp.1-6.
18. Abdulmasih Vud G. J., Greko Kardoza Z. P., Paluelo D. V., Fagundes Nunes T., Kokuza M. “Varicocele-Associated Infertility and the Role of Oxidative Stress on Sperm DNA Fragmentation”, *Front Reprod Health.* 2021 Oct 29;3:695992. pp. 1-3.
19. Franko A., Projeti F., Palombi V., Savareze G., Gvidoti M., Leonardo K., Fero F., Mana K., Franko D., “Varicocele: To Treat or Not to Treat?”, *J Clin Med.* 2023 Jun 15;12(12):4062. pp. 1-10.
20. Belastela Đ., Karotenuto R., Kajaco F., Longo M., Ćiriljo P., Skapatićo L., Karbone K., Arkaniolo D., Majorino M. I., Espozito K., “Varicocele: An Endocrinological Perspective, *Front Reprod Health*”. 2022 Apr 1;4:863695. pp. 1-6.
21. Mehta A., Sigman M., “Management of the dry ejaculate: a systematic review of aspermia and retrograde ejaculation”. Volume 104, Issue 5p1074-1081, November 2015.
22. Lu S., Li X., Wang S., Yang X., Xu Y., Huang L., Liu J., Cai F., Chen Z., “Success rates of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in men with serum anti-sperm antibodies: a consecutive cohort study”. *Asian J Androl.* 2019 Jan 29;21(5):473–477. pp. 1-5.
23. Bai S., Li Y., Wan Y., Guo T., Jin Q., Liu R., Tang W., Sang M., Tao Y., Xie B., Zhao Y., Li W., Xu X., Yue Q., Hu X., Xu B. “Sexually transmitted infections and semen quality from subfertile men with and without leukocytospermia”, *Reprod Biol Endocrinol.* 2021 Jun 21;19:92. pp. 1-7.
24. Fawzy F., Hussein A., Mahmoud Eid M., Mahmoud El Kashash A., Salem H.K., “Cryptorchidism and Fertility”. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2015 Dec 22;9: pp. 39–43.
25. Gaskins A.J., Chavarro J.E. “Diet and fertility: a review”, *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Apr;218(4) pp. 379-389.
26. Łakoma K., Kukharuk O., Śliż D. “The Influence of Metabolic Factors and Diet on Fertility”, *Nutrients.* 2023 Feb 27;15(5):1180, pp. 1-16.
27. Khosrorad T., Dolatian M., Riazi H., Mahmoodi Z., Alavimajd H., Shahsavari S., Bakhtiari M. “Comparison of Lifestyle in Fertile and Infertile Couples in Kermanshah during 2013”. *Iran. J. Reprod. Med.* 2015;13: pp. 549–556.
28. Nazni, “Association of western diet & lifestyle with decreased fertility”, *Indian J Med Res.* 2014 Nov;140(Suppl 1): pp. 78–81.
29. Chavarro J.E., Rich-Edwards J.W., Rosner B.A., Willett W.C. “Diet and Lifestyle in the Prevention of Ovulatory Disorder Infertility”. *Obstet. Gynecol.* 2007;110:pp. 1050–1058.
30. Chavarro J.E., Rich-Edwards J.W., Rosner B.A., Willett W.C. “Protein Intake and Ovulatory Infertility”. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008;198:pp. 1-12.
31. Pecora G., Sciarra F., Gangitano E., Venneri M.A., “How Food Choices Impact on Male Fertility”, *Curr Nutr Rep.* 2023 Dec;12(4): pp. 864-876.

32. Petre C.G., Francini-Pesenti F., Di Nisio A., De Toni L., Grande G., Mingardi A., Cusmano A., Spinella P., Ferlin A., Garolla A., “Observational Cross-Sectional Study on Mediterranean Diet and Sperm Parameters”, *Nutrients*. 2023 Dec 1;15(23):4989 pp. 1-10
33. Eslamian G., Amirjannati N, Rashidkhani B, Sadeghi M-R., Baghestani A-R., Hekmatdoost A., “Dietary fatty acid intakes and asthenozoospermia: a case-control study”, *Fertil Steril*. 2015 Jan; pp. 1-9.
34. Zhao J-Q., Wang X-B., Leng X., Wei Y-F., Huang D-H., Lv J-L., Du Q., Guo R-H., Pan B-C., Wu Q-J., Zhao Y-H., “Dietary fat and fatty acid consumptions and the odds of asthenozoospermia: a case-control study in China”, *Hum Reprod Open*. 2023 Jul 27;2023(3): pp. 1-10.
35. Brinson A.K., da Silva S.G., Hesketh K.R., Evenson K.R., “Physical activity and fertility”, *J Phys Act Health*. 2023 May 5;20(7):600–615.
36. Ramlau-Hansen C.H., Thulstrup A.M., Nohr E.A., Bonde J.P. , Sørensen T.I.A , Olsen J., “Subfecundity in overweight and obese couples”, *Hum Reprod*. 2007 Jun;22(6).
37. Sharkavi M, Hantisteanu S., Bilgori A., Aslih N., Abu Raia I.S., Atzmon I., Estrada D, Limonad O., Meisel-Sharon S., Shalom-Paz E. ,The Impact of Lifestyle on Sperm Function, Telomere Length, and IVF Outcomes”, *Am J Mens Health*. 2022 Sep 19;16(5): pp. 1-8.
38. Sansone A., Sansone M., Vaamonde D., Sgro P., Salzano C., Romanelli F., Lenci A., Di Luidi L., “Sport, doping and male fertility”, *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Nov 12;16:114. pp. 1-9.
39. Belladelli F., Basran S., Eisenberg M.L., “Male Fertility and Physical Exercise”, *World J Mens Health*. 2023 Jan 4;41(3): pp. 482–488.
40. Wise L.A., Cramer D.W., Hornstein M.D., Ashby R.K., Missmer S.A., “Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic”. *Fertil Steril*. 2010 Dec 3;95(3): pp. 1025–1030.
41. Aerts A., Temmerman A., Vanhie A., Vanderschueren D., Antonio L., “The Effect of Endurance Exercise on Semen Quality in Male Athletes: A Systematic Review”, *Sports Med Open*. 2024 Jun 11;10:72, pp. 1-10.
42. Jadhav R., More A., Dutta S, Gajabe G., Shrivastava J., Mehakar S., “Improving Semen Quality in a Male Partner With Abnormal Seminal Parameters Through Yoga and Yoga Nidra: A Case Report”, *Cureus*. 2024 Feb 12;16(2):e54095. pp.1-6.
43. Giudice AL., Asmundo M.G., Cimino S., Morgia G., Cocci A., Falcone M., Sokolakis I., Capogrosso P., Morgado A., Russo G.I., “Sexual and Reproductive Health Group, Effects of Physical Activity on Fertility Parameters: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials”, *World J Mens Health*. 2024 Jan 2;42(3): pp. 555–561.
44. Szamatowicz M and Szamatowicz J., “Proven and unproven methods for diagnosis and treatment of infertility”, Volume 65, Issue 1, March 2020, pp. 93-96.
45. Sunder M. and Leslie S.W., “Semen Analysis, 2024”, StatPearls Publishing LLC., Bookshelf ID: NBK564369PMID: 33232039, Last Update: October 24, 2022.
46. Poland M.L., Moghissi K.S., Giblin P.T., Ager J.W., Olson J.M. “Variation of semen measures within normal men”. *Fertil Steril*. 1985 Sep;44(3) pp. 396-400.

47. De Moraes De Zorzi P., De Souza Kussler A.P., Mylius Pimentel A., Capp E., and Von Eye Corleta H., "Semen Analysis of Total Motile Sperm Count Based on the 1999 and 2010 WHO Criteria", *JBRA Assist Reprod.* 2022 Apr-Jun; 26(2): pp. 261–266.
48. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. "Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion". *Fertil Steril.* 2015 Mar;103(3): pp. 18-25.
49. Gupta S. et al., "Antisperm Antibody Testing: A Comprehensive Review of Its Role in the Management of Immunological Male Infertility and Results of a Global Survey of Clinical Practices", *World J Mens Health.* 2022 Jan 1;40(3): pp. 380–398.
50. Bienvenu T., Lopez M., Girodon E., "Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges", *Genes* 2020 Jun 4;11(6):p. 619.
51. Sharma N and Cutting G.R., "The genetics and genomics of cystic fibrosis", *J Cyst Fibros.* 2021 Mar 30. pp. 1-6.
52. Jain R., Kazmerski T.M., Taylor-Cousar J.L., "The modern landscape of fertility, pregnancy, and parenthood in people with cystic fibrosis", *Curr Opin Pulm Med.* 2023 Sep 1;29(6):595–602.
53. Stormont G.D. and Deibert C.M., "Genetic causes and management of male infertility", *Transl Androl Urol.* 2021 Mar;10(3): pp.1365–1372.
54. Bendarska-Czerwińska A. et al, "Endocrine disorders and fertility and pregnancy: An update", *Front Endocrinol.* 2023 Jan 17;13:970439. pp. 1-23.
55. Wang Q., Que C., Chen G., "Effects of leukocyte elastase in semen on sperm quality", *Medicine.* 2022 Oct 14;101(41):e31111. pp. 1-5.
56. Liu K-S., Mao X-D., Pan F., Chen Y-J., " Application of leukocyte subsets and sperm DNA fragment rate in infertile men with asymptomatic infection of genital tract". Vol 10, No 2 (February 28, 2021), pp. 1221-1228.
57. Mazzilli R., Defeudis G., Olana S., Zamponi V., Macera M., Mazzilli F., "The role of ejaculatory dysfunction on male infertility", *Clin Ter* 2020; 171 (6): pp. 523-527.
58. Garolla A., Grande G., Palego P., Canossa A., Cetta N., Di Nisio A., Corona G., Foresta C., "Central role of ultrasound in the evaluation of testicular function and genital tract obstruction in infertile males", *Andrology.* 2021 Jun 18;9(5):1490–1498. pp. 1-9.
59. Sharma M. and Leslie S.W., "Azoospermia", StatPearls Publishing; 2024 Jan.
60. Loughlinl K.R., Bagli D.J., Hurley R.J.f, "Vasography: Application of an Epidural Catheter, *Journal of Andrology*", Vol. 15, Supplement 1994. p. 75.
61. Talarczyk-Desole J., Berger A., Taszarek-Hauke G., Hauke J., Pawelczyk L., Jędrzejczak P., "Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?", *Ginekol Pol.* 2017;88(2): pp. 56-60.
62. Marchlewska K., Erkiert-Kusiak M., Walczak-Jędrzejowska R., Słowikowska-Hilcz J., "Sperm Migration and Hyaluronic Acid Binding: Implications for Male Fertility Evaluation", *Int J Mol Sci.* 2024 Sep 17;25(18):9995. pp.1-10.

63. Mauck C.K., Vincent K.L., “The postcoital test in the development of new vaginal contraceptives”, *Biol Reprod.* 2020 Jun 16;103(2): pp.437–444.
64. Andrabi S.W., Ara A., Saharan A., Jaffar M., Gugnani N., Esteves S.C., “Sperm DNA Fragmentation: causes, evaluation and management in male infertility”, *JBRA Assist Reprod.* 2024 Apr-Jun;28(2): pp. 306–319.
65. Pampiglione J.S., Tan S-L., Campbell S., “ The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa”, *Fertility and sterility*, Vol. 59, No.6, June 1993. pp. 1-5.
66. Tateno H., Krapf D., Hino T., and Visconti P.E., “Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways”, October 15, 2013, 110 (46) pp. 18543-18548.
67. Esteves S.C., Zini A., Coward R.M., Evenson D.P., Gosálvez J., Lewis S.E.M, Sharma R, Humaidan P., “Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations”, *Andrologia.* 2020 Oct 27;53(2):e13874. pp. 1-30.
68. Calogero A.E. et al. “The Renaissance of Male Infertility Management in the Golden Age of Andrology”, *World J Mens Health.* 2023 Jan 5;41(2): pp. 237–254.
69. Karim Kiani A., Bonetti G., Donato K., Kaftalli J., Herbst K.L., Stupia L., Fioretti F., Nodari S., Perone M., Chiurrazi P., Bellinato F., Gisondi P., Bartelli M., "Polymorphisms, diet and nutrigenomics", *Prev Med Hyg.* 2022 Oct 17;63(2 Suppl 3): pp.125-141.
70. Carlberg C., “Nutrigenomics in the context of evolution”, *Redox Biol.* 2023 Mar 11;62:102656. pp. 1-7.
71. Skoracka K., Eder P., Łykowska-Szuber L., Dobrowolska A., Krela-Kaźmierczak I., “Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility—Underestimated Factors”, *J Clin Med.* 2020 May 9;9(5):1400. pp.1-12.
72. Vanderhout S.M., Rastegar Panah M., Garcia-Bailo B., Grace-Farfaglia P., Samsel K., Dockray J., Jarvi K., El-Sohemy A., “Nutrition, genetic variation and male fertility”, *Transl Androl Urol.* 2021 Mar;10(3):pp.1410–1431.
73. Navarro-Rios D., Panduro A., Roman S., and Ramos-Lopez O., “CD36 polymorphism, sugary drinks, and sedentarism are associated with hypertriglyceridemic waist phenotype”, *Int J Vitam Nutr Res* (2024), 94 (1), pp.37–44.
74. Pepino M.Y., Kuda O., Samovski D., Abumrad N.A., “Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism”, *Nutr.* 2014 May 16;34: pp.281–303.
75. Yazdanpanah Z., Salehi-Abargouei A. , Mollahosseini M., Sheikha M.H., Mirzaei M., Mozaffari-Khosravi H., “The cluster of differentiation 36 (CD36) rs1761667 polymorphism interacts with dietary patterns to affect cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome risk in apparently healthy individuals”, *British Journal of Nutrition*, 2023 Nov 14;130(9):pp. 1510-1520.
76. Wang J., Zhang J., Li L., Wang Y., Wang Q., Zhai Y., You H., Hu D., “Association of rs12255372 in the TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis”, *Braz J Med Biol Res.* 2013 Apr 12;46(4): pp. 382–393.

77. Chen X., Ayala I., Shannon C., Fourcaudot M., Acharya N.K., Jenkinson C.P., Heikkinen S., Norton L., “The Diabetes Gene and Wnt Pathway Effector TCF7L2 Regulates Adipocyte Development and Function”, *Diabetes*. 2018 Jan 9;67(4): pp. 554–568.
78. InterAct Consortium . Dietary fibre and incidence of type 2 diabetes in eight European countries: the EPIC-InterAct Study and a meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* 2015;58:1394-408.
79. Aune D., Norat T., Romundstad P., et al. “Whole grain and refined grain consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies”. *Eur J Epidemiol* 2013;28:pp. 845-858.
80. Ferguson JF, Phillips CM, McMonagle J, et al. NOS3 gene polymorphisms are associated with risk markers of cardiovascular disease, and interact with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 2010;211:539-44. 10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.027
81. Liu C.Y., Chou Y.C., Lin S.H., et al. “Serum lipid profiles are associated with semen quality”. *Asian J Androl* 2017;19: pp.633-638.
82. Ward K.D., Sparrow D., Vokonas P.S., et al. “The relationships of abdominal obesity, hyperinsulinemia and saturated fat intake to serum lipid levels: the Normative Aging Study”. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18: pp.137-144.
83. Corella D., Peloso G., Arnett D.K., et al. “APOA2, dietary fat, and body mass index: replication of a gene-diet interaction in 3 independent populations”. *Arch Intern Med* 2009;169:pp. 1897-1906.
84. Chavarro J.E. et al. “Dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility”. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(1): pp.231-237
85. Garaulet M et al. “PPAR $\beta$  Pro12Ala interacts with fat intake for obesity and weight loss in a behavioural treatment based on the Mediterranean diet”. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2011;55:pp.1771-1779.
86. Li S., He C., Nie H., Pang Q., Wang R., Zeng Z., Song Y. “G Allele of the rs1801282 Polymorphism in PPAR $\gamma$  Gene Confers an Increased Risk of Obesity and Hypercholesterolemia, While T Allele of the rs3856806 Polymorphism Displays a Protective Role Against Dyslipidemia: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Front. Endocrinol.* , 29 June 2022, Sec. Obesity, Volume 13 - 2022, pp. 1-10.
87. Eny K.M., Wolever T.M., Fontaine-Bisson B., et al. “Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations”. *Physiol Genomics* 2008;33:pp. 355-360.
88. Malik V.S., Popkin B.M., Bray G.A., et al. “Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk”. *Circulation* 2010;121:pp. 1356-1364.
89. Verdu E.F., Caminero A. “How infection can incite sensitivity to food”. *Science* 2017;356: pp.29-30.
90. Wolters V.M., Wijmenga C. “Genetic background of celiac disease and its clinical implications”. *Am J Gastroenterol* 2008;pp. 103:190-5.
91. Farthing M.J.G., Edwards C.R.W., Rees L.H., Dawson A.m., “Male gonadal function in coeliac disease: Sexual dysfunction, infertility, and semen quality”, *Gut*. 1982 Jul;23(7): pp 608–614.

92. Cornelis M.C., El-Sohemy A., Kabagambe E.K., et al. "Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction". *JAMA* 2006;295:pp. 1135-1141.
93. Anguita-Ruiz A., Aguilera C.M., Gil A., "Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies", *Nutrients*. 2020 Sep 3;12(9):2689 pp.1-15.
94. Malik T.M., Panuganti K.K., "Lactose Intolerance", Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-., Last Update: April 17, 2023.
95. Koek et al. "The T-13910C polymorphism in the lactase phlorizin hydrolase gene is associated with differences in serum calcium levels and calcium intake". *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(9):pp.1980-1987.
96. Alharbi O., El-Sohemy A. "Lactose Intolerance (LCT -13910C>T) Genotype Is Associated with Plasma 25-Hydroxyvitamin Concentrations in Caucasians: A Mendelian Randomization Study". *Journal of Nutrition*. 2017; 147(6): pp.1063-1069.
97. Hou W., Yan X., Bai C., Zhang X., Hui L., Yu X. "Decreased serum vitamin D levels in early spontaneous pregnancy loss", *European Journal of Clinical Nutrition*. 2016;70(9):pp.1004-1008.
98. Omu A.E., Fatinikun T., Mannazhath N., et al. "Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma alpha-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography". *Andrologia* 1999;31:pp. 347-354.
99. Forges T., Monnier-Barbarino P., Alberto J.M., et al. "Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health". *Hum Reprod Update* 2007;13:pp.225-238.
100. Tyagi N., Sedoris K.C., Steed M., et al. "Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:pp.2649-2656.
101. Sadeghian S., Fallahi F., Salarifar M., et al. "Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease". *BMC Cardiovasc Disord* 2006;6:38.
102. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. "Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility". *Reprod Sci* 2011;18:304-15. 10.1177/1933719110385135
103. Czeizel A.E., Dudas I. "Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation". *N Engl J Med* 1992;327:pp.1832-1835.
104. Boxmeer J.C., Brouns R.M., Lindemans J., et al. "Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans". *Fertil Steril* 2008;89:pp.1766-1770.
105. Stern L.L., Mason J.B., Selhub J., et al. "Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. " *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:pp.849-853.
106. Clément A., Menezo Y., Cohen M., et al. "5-Methyltetrahydrofolate reduces blood homocysteine level significantly in C677T methyltetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphism carriers consulting for infertility". *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2020;49:101622.

107. Luck M.R., Jeyaseelan I., Scholes R.A. "Ascorbic acid and fertility". *Biol Reprod* 1995;52:pp.262-266.
108. Ganesh S.K., Zakai N.A., van Rooij F.J., et al. "Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium". *Nat Genet* 2009;41:pp.1191-1198.
109. Cahill L.E., Fontaine-Bisson B., El-Sohemy A. "Functional genetic variants of glutathione S-transferase protect against serum ascorbic acid deficiency". *Am J Clin Nutr* 2009;90:1411-1417.
110. Yuan L., Zhang L., Ma W., et al. "Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms with consumption of high fruit-juice and vegetable diet affect antioxidant capacity in healthy adults". *Nutrition* 2013;29:pp. 965-971.
111. Ozkan S., Jindal S., Greenesid K., et al. "Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization". *Fertil Steril* 2010;94:pp.1314-1319.
112. Holick M.F. "Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis". *Am J Clin Nutr* 2004;79:pp.362-371.
113. Holick MF. "Skin: site of the synthesis of vitamin D and a target tissue for the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D3". *Ann N Y Acad Sci* 1988;548:14-26.
114. Slater N.A., Rager M.L., Havrda D.E., et al. "Genetic Variation in CYP2R1 and GC Genes Associated With Vitamin D Deficiency Status". *J Pharm Pract* 2017;30:pp.31-36.
115. Deng X.L., Li Y.M., Yang X.Y., et al. "Efficacy and safety of vitamin D in the treatment of idiopathic oligoasthenozoospermia". 2014;20:pp.1082-1085.
116. Blomberg J. M., Gerner Lawaetz J., Andersson A.M., et al. "Vitamin D deficiency and low ionized calcium are linked with semen quality and sex steroid levels in infertile men". *Hum Reprod* 2016;31:pp.1875-85.
117. National Institutes of Health. "*Vitamin D Fact Sheet for Health Professionals*" 2011. updated June 24, 2011. Accessed: April 4, 2025.
118. Blomberg J.M, Lawaetz J.G., Petersen J.H., et al. "Effects of Vitamin D Supplementation on Semen Quality, Reproductive Hormones, and Live Birth Rate: A Randomized Clinical Trial". *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:pp.870-881.
119. Zhu C.L., Xu Q.F., Li S.X., et al. "Investigation of serum vitamin D levels in Chinese infertile men". *Andrologia* 2016;48:pp.1261-1266.
120. Holt R., Yahyavi S.Y., Kooij I., Hjorth Andreassen C., Andersson A-M., Juul A., Jørgensen N., Blomberg Jensen M., "Low serum anti-Müllerian hormone is associated with semen quality in infertile men and not influenced by vitamin D supplementation", *BMC Med.* 2023 Feb 28;21:79. pp.1-9.
121. Uhland A.M., Kwiecinski G.G., DeLuca H.F.. "Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats". *J Nutr* 1992;122:pp.1338-44.
122. Peacock M. "Calcium metabolism in health and disease". *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5 Suppl 1:pp.23-30.

123. Kavanagh J.P. "Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid". *J Reprod Fertil* 1985;75:pp.35-41.
124. Harchegani A.B., Irandoost A., Mirnamniha M., Rahmani H., Tahmasbpour E., Shahriary A., "Possible Mechanisms for The Effects of Calcium Deficiency on Male Infertility", *Int J Fertil Steril*. 2018 Oct 2;12(4):pp.267–272.
125. Zumaraga M.P., Borel P., Gleize B., Nowicki M., Ould-Ali D., Landrier J-F., Desmarchelier C., "Genetic Factors Contributing to Interindividual Variability of  $\alpha$ -Tocopherol Levels in Subcutaneous Adipose Tissue among Healthy Adult Males", *Nutrients*. 2024 Aug 3;16(15):2556.
126. Matorras R., Pérez-Sanz J., Corcóstegui B., Pérez-Ruiz I., Malaina I., Quevedo S., Aspichueta F., Crisol L., Martinez-Indart L., Prieto B., Expósito A., "Effect of vitamin E administered to men in infertile couples on sperm and assisted reproduction outcomes: a double-blind randomized study", *F S Rep*. 2020 Sep 18;1(3):pp.219–226.
127. Sabetian S., Namavar Jahromi B., Vakili S., Forouhari S., Alipour S. "The Effect of Oral Vitamin E on Semen Parameters and IVF Outcome: A Double-Blinded Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial", *Biomed Res Int*. 2021 Oct 11;2021:5588275.
128. Bahauldeen Fadhil E., Mohammed M.M., Alkawaz U.M., "Impact of coenzyme Q10 as an adjuvant therapy to letrozole on spermiogram results and sex hormone levels in Iraqi men with infertility; randomized open label comparative study", *F1000Res*. 2024 Jun 10;12:1093.
129. Alahmar A.T. "Coenzyme Q10 improves sperm motility and antioxidant status in infertile men with idiopathic oligoasthenospermia", *Clin Exp Reprod Med*. 2022 Nov 4;49(4):pp.277–284.
130. Takahashi M., Kinoshita T., Maruyama K., Suzuki T. "CYP7A1, NPC1L1, ABCB1, and CD36 Polymorphisms Are Associated with Increased Serum Coenzyme Q10 after Long-Term Supplementation in Women", *Antioxidants* 2021 Mar 11;10(3):431.
131. Wang Y., Yen F.S., Zhu X.G., Timson R.C., Weber R., Xing C., Liu Y., Allwein B., Luo H., Yeh H.W., Heissel S., Unlu I.G., Gamazon E.R., Kharas M.G., Hite R., Birsoy K., "SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells", *Nature*. 2021 Oct 27;599(7883):pp.136–140.
132. He J., Mu Y., Liu M., Che B.-W., Zhang W.-J., Chen K.-H., Tang K.-F., "Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and fluoride-induced reproductive toxicity in men with idiopathic infertility", *Asian J Androl*. 2022 Oct 14;25(3):pp.404–409.
133. Haidari F., Mohammadi-Asl J., Kavianpour M., Dadfar M., Haghighian H.K., "Effect of lipoic acid supplementation on gene expression and activity of glutathione S-transferase enzyme in infertile men", 11 Jul 2019, pp. 276-283
134. Craig SA. "Betaine in human nutrition". *Am J Clin Nutr* 2004;80:pp.539-49.
135. Shadmehr S., Fatemi Tabatabaei S.R., Hosseinifar S., et al. "Attenuation of heat stress-induced spermatogenesis complications by betaine in mice". *Theriogenology* 2018;106:pp.117-126.
136. da Costa K.A., Kozyreva O.G., Song J., et al. "Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline". *FASEB J* 2006;20:1336-44.

137. Obeid R. "The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway". *Nutrients* 2013;5:3481-95.
138. Dattilo M., Giuseppe D., Ettore C., et al. "Improvement of gamete quality by stimulating and feeding the endogenous antioxidant system: mechanisms, clinical results, insights on gene-environment interactions and the role of diet". *J Assist Reprod Genet* 2016;33:pp. 1633-48.
139. Beard J.L. "Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning". *J Nutr* 2001;131:pp.568-579.
140. Nikolaev A.A., Lutskaa D.L., Nikolaeva N.N., et al. "Iron and nonheme iron protein metabolism in ejaculates with varying degrees of fertility". *Urol Nefrol* 1998; pp. 27-31.
141. Toebosch A.M., Kroos M.J., Grootegoed J.A. "Transport of transferrin-bound iron into rat Sertoli cells and spermatids". *Int J Androl* 1987;10:pp.753-764
142. Agbaraji V.O., Scott R.B., Leto S., et al. "Fertility studies in sickle cell disease: semen analysis in adult male patients". *Int J Fertil* 1988;33:pp.347-352.
143. Wise T., Lunstra D.D., Rohrer G.A., et al. "Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars". *J Anim Sci* 2003;81:pp.503-511.
144. Teucher B., Olivares M., Cori H. "Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids". *Int J Vitam Nutr Res* 2004;74:pp.403-419.
145. Eisenberg M .et al. "Relationship between physical occupational exposures and health on semen quality: data from the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study". *Fertility and Sterility*. 2015;103(5):pp.1271-1277.
146. Poch E. et al. "Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension: Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms". *Hypertension*. 2001;38:pp.1204-1209.
147. Silva de Castro Pacheco da Cunha L.M., Paz Teixeira M.Y., Camacho Santos Daltro A.F. et al. "Unbalance of Se and nutritional status in male infertility", *JBRA Assist Reprod*. 2021 Apr-Jun;25(2):pp.202–208.
148. Dimitriadis F., Borgmann H., Struck J.P., Salem J., Kuru T.H., "Antioxidant Supplementation on Male Fertility—A Systematic Review", *Antioxidants* 2023 Mar 30;12(4):836.
149. Hu W., Zhao C., Hu H., Yin S., "Food Sources of Selenium and Its Relationship with Chronic Diseases", *Nutrients*. 2021 May 20;13(5):1739.
150. Milostić A., Včev A., Tandara M., et al."Important of zinc concentration in seminal fluid of men diagnosed with infertility", *Acta Clin Croat*. 2020 Mar;59(1):pp.154–160.
151. Veselinovic A., Stojavljevic A., Arsic A., Bojovic-Jovic D.,Vucic V. and Golic I., "Serum and Seminal Plasma Zinc Levels and Immunopositivity ofthe ZIP6 and ZIP14 Transporters in Men with Normo-and Teratozoospermia", February 2025 Current Issues in Molecular Biology 47(2):101
152. Skoracka K., Eder P., Łykowska-Szuber L., Dobrowolska A., Krela-Kaźmierczak I., "Diet and Nutritional Factors in Male (In)fertility—Underestimated Factors", *J Clin Med*. 2020 May 9;9(5):1400.

153. Corsetti V., Notari T., Montano L., “Effects of the low-carb organic Mediterranean diet on testosterone levels and sperm DNA fragmentation”, *Curr Res Food Sci.* 2023 Nov 15;7:100636.
154. Montano L., Ceretti E., Donato F., Bergamod P., et al. “Effects of a Lifestyle Change Intervention on Semen Quality in Healthy Young Men Living in Highly Polluted Areas in Italy: The FASt Randomized Controlled Trial”, January 2022 *Andrology* Volume 8, Issue 1 pp.351-359
155. Ma X., Wu L., Wang Y., et al. “Diet and human reproductive system: Insight of omics approaches”, *Food Sci Nutr.* 2022 Mar 21;10(5):pp.1368–1384.
156. Erdoğan K., Tunca Sanlier N., Sanlier N., “Are epigenetic mechanisms and nutrition effective in male and female infertility?”, *J Nutr Sci.* 2023 Sep 26;12:103 pp.1-8.
157. Rotondo J.C., Bosi S., Bazzan E., et al “Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion”, *Human Reproduction*, Volume 27, Issue 12, December 2012, pp. 3632–3638.
158. Krzastek S.C., Smith R.P., Kovac J.R., “Future diagnostics in male infertility: genomics, epigenetics, metabolomics and proteomics”, *Transl Androl Urol.* 2020 Mar;9 pp.195–205.
159. Franzago M., Santurbano D., Vitacolonna E., Stuppia L., “Genes and Diet in the Prevention of Chronic Diseases in Future Generations”, *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 10;21(7):2633.