

# Potencijalna primjena anti-Mullerovog hormona (AMH) kao biljega spermatogeneze

---

**Vidas, Patricia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:878970>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske**  
**dijagnostike**

**Patricia Vidas**

**POTENCIJALNA PRIMJENA**  
**ANTI-MÜLLEROVOG HORMONA**  
**(AMH) KAO BILJEGA**  
**SPERMATOGENEZE**

**Završni rad**

**Osijek, 2017**

**Rad je ostvaren u :** Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek

Mentor rada : doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem.

Rad ima 22 stranice , 1 tablicu, 9 slika

*Veliku zahvalnost prije svega dugujem mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić na pruženoj prilici za suradnju, izdvojenom vremenu, strpljenju i potpori mojemu stručnom i znanstvenom usavršavanju te pomoći pri realizaciji rada.*

*Nadalje, veliko hvala svim djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku koji su mi svojim savjetima i znanjem olakšali rad u laboratoriju i provedbu istraživanja.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na svim odricanjima i razumijevanju. Hvala što ste mi omogućili studiranje i sve ove godine bili uz mene.*

*Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim.*

## Sadržaj:

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                     | 1  |
| 1.1. Neplodnost.....                                              | 1  |
| 1.1.1. Muška neplodnost .....                                     | 1  |
| 1.1.2. Muški spolni sustav.....                                   | 1  |
| 1.2. Analiza sjemene tekućine .....                               | 3  |
| 1.2.1. Makroskopska analiza.....                                  | 3  |
| 1.2.2. Mikroskopska analiza .....                                 | 4  |
| 1.2.3. Biokemijske analize .....                                  | 5  |
| 1.3. Poremećaji u spermogramu .....                               | 5  |
| 1.4. Analiza hormona.....                                         | 6  |
| 1.4.1. Anti-Müllerov hormon.....                                  | 6  |
| 2. CILJ.....                                                      | 8  |
| 3. ISPITANICI I METODE .....                                      | 9  |
| 3.1. Ispitanici .....                                             | 9  |
| 3.1.1. Prikupljanje uzoraka .....                                 | 9  |
| 3.2. Metode .....                                                 | 10 |
| 3.2.1. Određivanje broja i koncentracije spermija .....           | 10 |
| 3.2.2. Vitalno bojenje.....                                       | 10 |
| 3.2.3. Procjena pokretljivosti spermija i morfološka analiza..... | 11 |
| 3.2.4. Određivanje anti-Müllerova hormona.....                    | 12 |
| 3.3. Statističke metode.....                                      | 13 |
| 4. REZULTATI.....                                                 | 14 |
| 5. RASPRAVA.....                                                  | 16 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                                | 18 |
| 7. SAŽETAK.....                                                   | 19 |
| 8. SUMMARY .....                                                  | 20 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 9. LITERATURA.....  | 21 |
| 10. ŽIVOTOPIS ..... | 22 |

## 1. UVOD

### 1.1. Neplodnost

Neplodnost je ozbiljan medicinski i socijalni problem koji zahvaća više od 10 do 15 % parova reproduktivne dobi. Sve češća pojava bračne neplodnosti povezana je sa socijalnim fenomenom odgađanja rađanja i svakodnevnim stresom kakav donosi život u velikim sredinama. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), neplodnost se definira kao nemogućnost ostvarivanja trudnoće kod seksualno aktivnog para tijekom jedne godine bez uporabe kontraceptiva (1). Uzroci neplodnosti mogu biti vezani za jednog ili oba partnera. Smatra se da 15 % parova ne uspijeva ostvariti trudnoću unutar godine dana, a da je približno 50 % slučajeva uzrokovano muškim sterilitetom. Samostalno u 20 % slučajeva, a zajedno sa ženskim faktorom u 30 – 40 % slučajeva. U Hrvatskoj se broj neplodnih parova kreće od 12 do 15 %.

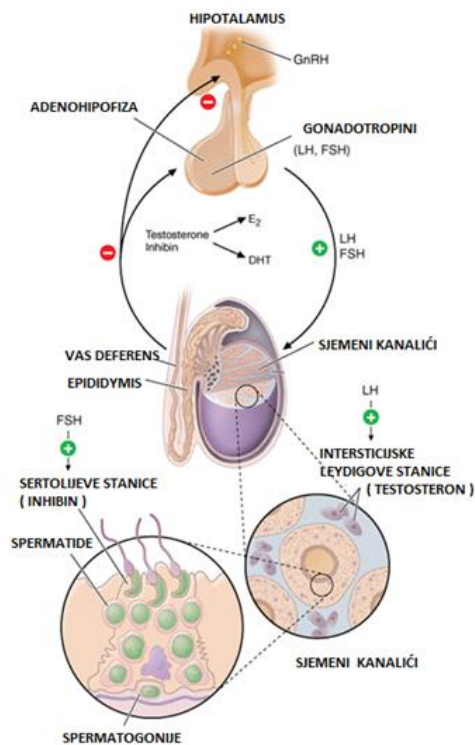
#### 1.1.1. Muška neplodnost

Znatan udio neplodnosti uzrokovan je muškim sterilitetom različita uzroka. Brojni rizični čimbenici i stanja uzrokuju nastanak muške neplodnosti te veliki niz poremećaja koji onemogućuju oplodnju jajne stanice i u konačnici trudnoću. Uzroci muške neplodnosti mogu biti: problemi u stvaranju sperme, u njezinu transportu, seksualni problemi (erekcija i ejakulacija), hormonalni poremećaj – prisutnost antispermalnih protutijela. I čimbenici poput stresnog načina života, pretilosti, alkoholizma, pušenja, pretjerane fizičke aktivnosti također mogu rezultirati smanjenjem kvalitete sperme ili uzrokovati odsutnost sperme u sjemenu. Azospermija, definirana kao potpuna odsutnost spermija u ejakulatu prisutna je u manje od 1 % muškaraca u normalnoj populaciji i u 10 – 15 % neplodnih muškaraca (2). Ako je nemoguće utvrditi etiologiju, takva se neplodnost proglašava idiopatskom (3). Pri procjeni muške neplodnosti liječnik mora imati dostupnu kompletnu anamnezu osobe, fizikalni pregled obaju partnera te barem dvije analize spermograma.

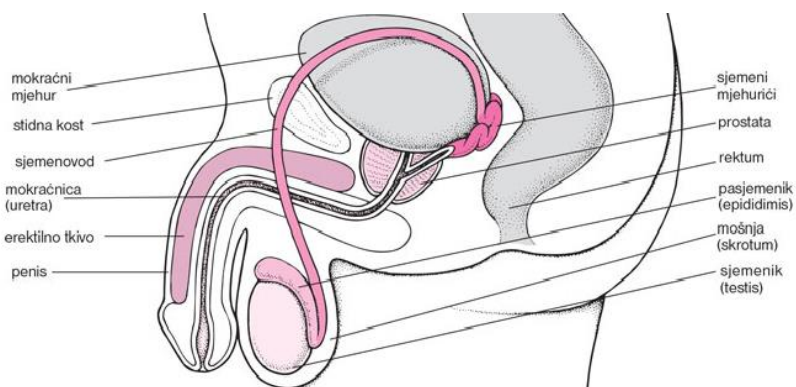
#### 1.1.2. Muški spolni sustav

Muški spolni sustav reguliran je međusobnim usklađenim djelovanjem endokrinih žlijezda i središnjega živčanog sustava (SŽS). To se obavlja mehanizmom povratne sprege preko osi hipotalamus – hipofiza – testis.

## UVOD



**Slika 1.** Shematski prikaz muškoga spolnog sustava preko osi hipotalamus – hipofiza – testis  
(Izvor: [http://dualibra.com/20Endocrinology%20and%20Metabolism/Section%201.%20Endocrinology/340\\_files/loadBinary\\_006.gif](http://dualibra.com/20Endocrinology%20and%20Metabolism/Section%201.%20Endocrinology/340_files/loadBinary_006.gif), pristup: 26. 7. 2017.)



**Slika 2.** Prikaz muškoga spolnog sustava

(Izvor: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/specificne-bolesti-muskaraca/reproduktivni-sustav-muskarca>, pristup: 13. 7. 2017.)



Muške spolne organe čine: testis (sjemenik), epididymis (pasjemenik), ductus deferens (sjemenovod), vesiculae seminales (sjemeni mjehurići), ductus ejaculatorius (mlaznični vod), prostata (predstojna žlijezda), glandulae bulbo-urethrales (bulbouretralne žlijezde), urethra (mokraćovod) i penis (muški spolni ud).

### **1.2. Analiza sjemene tekućine**

Analiza sjemena brza je, jednostavna, jeftina i neinvazivna metoda kojom se dobiva uvid u stanje plodnosti muškarca. Pri uporabi te metode moraju se uzeti u obzir neke važne činjenice. Sjeme je sastavljeno od tekućina nekoliko žlijezda i ima dva mjerljiva atributa: ukupni broj spermija (upućuje na proizvodnju spermija iz testisa i prohodnost posttestikularnog kanala) i ukupni volumen tekućine kojemu pridonose različite sekretorne žlijezde. Kvaliteta spermija može ovisiti i o različitim vanjskim i prolaznim čimbenicima, kao što su infekcije, toksični spojevi i stres. Rezultati laboratorijskih mjerenja kvalitete sjemena ovise o pravilnom uzorkovanju i dostavi uzorka, aktivnosti sekretornih žlijezda, vremenu apstinencije i o veličini testisa koja utječe na ukupni broj spermija u ejakulatu (4). Analizu sjemena ne čini samo broj spermija, njihova pokretljivost i morfologija, nego i određivanje fizikalnih svojstava tekućine, mikrobiološke analize, određivanje biokemijskih parametara (fruktoza, cink, limunska kiselina), određivanje spermalnih protutijela te drugih funkcionalnih i bioloških markera plodnosti.

#### **1.2.1. Makroskopska analiza**

Makroskopska analiza sjemena treba započeti procjenom likvefakcije, unutar 30 minuta, ali ne dulje od 1 sat nakon ejakulacije (4). Likvefakcija je pojava pri kojoj se plazma iz sjemene tekućine nakon što biva zgrušana djelovanjem faktora zgrušavanja ponovo „razvodnjava“ zbog utjecaja prostatičnih enzima. Za kompletnu likvefakciju važna je temperatura (idealna je temperatura 20 – 37 °C) jer su svi enzimi aktivni u navedenom temperaturnom intervalu, a kod normalnog uzorka likvefakcija nastupa unutar 15 – 20 min. Ovim se ispitivanjem doznaje više o poremećaju rada žlijezda, tj. izvodnih kanala jer koagulirajući enzimi potječu iz seminalnih vezikula, a likvefaktirajući agensi iz prostate. Potpuna odsutnost koagulumu upućuje na opstrukciju ductus ejaculatoriusa ili kongenitalnu odsutnost seminalnih vezikula, a, ako je problem s manjkom litičkih enzima zbog niske sekretorne aktivnosti prostate, neće nastupiti likvefakcija ili će njezino vrijeme biti produženo (više od 1 sata).

## UVOD

Nakon likvefakcije promatra se golim okom boja sjemenne tekućine. Normalni uzorak varira od bijele do sivkastobijele boje, a svaka druga boja može upućivati na patološke promjene. Boja sjemenata promatra se tako da se posuda s uzorkom drži pred bijelom pozadinom. Prema SZO-ovim standardima, vrijednost volumena može iznositi od 1,5 do 10 mL (4), dok je najčešće između 2 i 6 mL. Dobiveni volumen pokazuje je li riječ o aspermiji, hipospermiji, normospermiji ili hiperspermiji. Ako su vrijednosti više ili niže od navedenih, može se pretpostaviti da su posrijedi kratka ili duga seksualna apstinencija, ali i druga patološka stanja (npr. upala). Upala će biti praćena i porastom broja leukocita i bakterijske flore. Za makroskopsku analizu sjemenata bitan je i podatak o pH sjemenata. Granice pH trebale bi se kretati u rasponu od 7,2 do 8,0. pH niži od 7,0 u uzorku s malim volumenom i malim brojem spermija može upućivati na disgenezu sjemenovoda, sjemenih vezikula ili epididimisa (4). pH viši od 8,0 nalazi se u akutnoj upali.

### 1.2.2. Mikroskopska analiza

Početno mikroskopsko ispitivanje sjemenata preporučuje se u vlažnom, neobojenom preparatu koji se gleda svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 100 do 400 puta. Osnovna mikroskopska analiza uključuje procjenu pokretljivosti i koncentracije spermija te prisutnost drugih staničnih elemenata, osim spermatozoida. Pokretljivost spermatozoida klasificira se u 4 kategorije: brzo progresivni, sporo progresivni, stacionarni i nepokretni. Pregledava se 4 – 6 vidnih polja, klasificira 100 živih spermatozoida i procijeni postotak za svaku kategoriju pokretljivosti. Osim spermatozoida, sjeme redovito sadržava i druge stanice poput poligonalnih epitelnih stanica iz mokraćnoga trakta, nezrele zametne stanice, eritrocite, kristale pojedinih soli i leukocite. Od leukocita prevladavaju neutrofili, a njihov povećan broj upućuje na infekciju reproduktivnoga trakta.

Osim mikroskopiranja nativnoga preparata, za procjenu udjela živih spermatozoida primjenjuje se vitalno bojenje. To je postupak koji se temelji na principu da mrtve stanice s oštećenom plazmatskom membranom upijaju određene boje (4). U tu svrhu primjenjuje se eozin/nigrozinska metoda bojenja. Eozin ulazi u mrtve spermije, dok živi ostaju nebojeni. Nigrozin se rabi kao pozadinska boja. Diferenciraju se živi (nebojeni) i mrtvi (obojeni) spermiji.

Najčešće iskorištavani parametar kod mikroskopske analize jest broj spermija. Pri spolnom se činu obično ejakulira 3,5 mL sjemenata, a u svakom mililitru sjemenata prosječno ima oko 120 mil. spermija. Ukupan broj spermija u sjemenatu se određuje u Maklerovoj komorici. Spermiji

## UVOD

se broje pod povećanjem od 20 puta, u 10 kvadratića i njihov zbroj označuje koncentraciju izraženu u milijunima po mililitru sjemena. Ukupni broj spermija računa se na cijeli volumen sjemena, npr. isto je ako postoji 20 milijuna spermija u 6 mL sjemena, kao i ako je 40 milijuna spermija u 3 mL sjemena.

Morfološka klasifikacija spermija dobar je pokazatelj oplodnog potencijala i znatno se razlikuje kod plodnih i neplodnih muškaraca. Riječ je na preparatu obojenom modificiranom metodom po Papanicolaouu, svjetlosnom mikroskopijom pod uljnom imerzijom i povećanjem od 1000 puta. Metoda omogućuje rutinski razlikovati sve varijacije u veličini ili obliku glave, vrata i repa.

### **1.2.3. Biokemijske analize**

Loša kvaliteta sjemena može biti posljedica testikularne proizvodnje abnormalnog spermatozoida, posttestikularnog oštećenja spermatozoida u epididimisu ili ejakulat iz abnormalne sekrecije pomoćnih žlijezda (4). U tu svrhu postoji više biokemijskih markera koji pokazuju funkciju pomoćnih žlijezda. Neki su od njih cink, limunska kiselina i fruktoza. Količina cinka i limunske kiseline u sjemenu daje podatak o sekretornoj funkciji prostate, dok fruktoza u sjemennoj tekućini reflektira sekretornu funkciju sjemenih vezikula.

### **1.3. Poremećaji u spermogramu**

Postoji nekoliko različitih dijagnoza koje donosimo na temelju odstupanja određenih vrijednosti spermograma od normanih. Tako oligozoospermija označuje smanjen broj spermija u mililitru sjemena (ispod vrijednosti od 15 milijuna), dok je azoospermija potpuna odsutnost živih spermija u ejakulatu. Azoospermija proizlazi iz opstrukcije ekstratestikularnih kanala (opstruktivna) ili disfunkcije testisa (neopstruktivna). Neopstruktivna je azoospermija uzrokovana teškim oštećenjem spermatogeneze i to se smatra najkritičnijim uzrokom muške neplodnosti. U 70 % muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom nakon višestrukih testikularnih biopsija sperma nije pronađena u testisima, a testis također može biti atroficiran nakon tih postupaka (2).

Promjenom načina života, izbjegavanjem štetnih navika, kvalitetnom prehranom i sportom umjerena karaktera može se utjecati na kvalitetu sjemena. Smatra se da i smanjenje tjelesne težine može dati svojevrsan doprinos poboljšanju kvalitete sperme i ukupnoga broja spermija u ejakulatu. Istraživanja su pokazala da je visok indeks tjelesne težine povezan s niskim vrijednostima ukupnoga broja, morfologije, koncentracije i pokretljivosti spermija, dok gubitak težine utječe na povećanje ukupnoga broja spermija. Gubitak težine povezan je i s

povećanjima koncentracija globulina koji veže spolne hormone (engl. *Seks Hormone Binding Globuline*, SHBG), testosterona i anti-Müllerova hormona (AMH) (5).

### **1.4. Analiza hormona**

Hipofiza je najvažnija žlijezda s unutarnjim lučenjem u našem organizmu. Razlikujemo prednji – adenohipofiza, srednji – pars intermedia i stražnji režanj hipofize – neurohipofiza. Prednji režanj hipofize pod utjecajem gonadoliberina iz hipotalamusa luči gonadotropine: folikulstimulacijski hormon (FSH) i luteotropni hormon (LH), koji kontroliraju rast i reproduktivnu aktivnost gonada. Prednji režanj hipofize luči i prolaktin, hormon odgovoran za početak i održavanje laktacije. Hiperprolaktinemija u žena uzrokuje neplodnost, a u muškaraca se očituje oligospermijom i/ili impotencijom. FSH u žena stimulira razvoj folikula i lučenje estradiola, a u muškaraca spermatogenezu. LH u žena izaziva ovulaciju zrelog folikula i lučenje progesterona iz žutog tijela, a u muškaraca stvaranje testosterona. Testosteron je najvažniji androgeni hormon koji luče Leydigove stanice testisa nakon stimulacije LH. Mjerenje testosterona dalo je svojevrstan doprinos dijagnozi i praćenju različitih endokrinoloških poremećaja u muškaraca: hipogonadizma, oštećenja testisa, steriliteta, hipopituitarizma, hiperprolaktinemije. Osim Leydigovih stanica koje okružuju sjemene kanaliće, ključnu ulogu u stvaranju hormona imaju i Sertolijeve stanice u sjemenim kanalićima. Sertolijeve stanice luče dva hormona: inhibin i AMH, a njihovo lučenje kontrolira FSH. Inhibin je dimerni protein, a njegova je glavna zadaća regulacija lučenja FSH te se smatra biljekom funkcije testisa jer korelira s brojem spermija, volumenom i građom testisa.

#### **1.4.1. Anti-Müllerov hormon**

AMH je glikoprotein koji cirkulira kao dimer sastavljen od dvaju istovjetnih monomera od 72 kDa koji su povezani disulfidnim mostovima. Taj hormon pripada transformacijskom faktoru rasta- $\beta$ -skupine. U muškaraca razina AMH-a raste brzo nakon rođenja, najviši je u kasnoj fazi djetinjstva a zatim se postupno smanjuje do puberteta i zbog toga može poslužiti kao indikator specifičan za testis za dijagnozu u novorođenčadi s dvosmislenom genitalijom ili neplodnim gonadama (6). Smanjenje AMH-a odgovara stanju sazrijevanja Sertolijevih stanica. U odraslih muškaraca AMH se luči iz Sertolijevih stanica u sjemene kanaliće i u cirkulaciju.

#### AMH u fiziologiji testisa

AMH je nazvan prema svojoj prvoj opisanoj funkciji u fetalnoj spolnoj diferencijaciji: regresiji Müllerovih kanala u muškaraca tijekom ranoga fetalnog života. Povećanje intratestikularnog testosterona u pubertetu odgovorno je za inhibiciju ekspresije AMH-a.

## UVOD

Prisutnost androgenog receptora (AR) u dječaka starijih od osam godina objašnjava rani pubertetski pad razine AMH-a izazvane porastom intratestikularnog testosterona usprkos povećanju sekrecije FSH-a (7). Nakon puberteta AMH biva pušten iz Sertolijevih stanica prema lumenu sjemenih tubula, što rezultira većom koncentracijom AMH-a u sjemennoj plazmi nego u serumu (7). Za razliku od neonatalne faze, Sertolijeve stanice u ljudskom odraslom testisu izražavaju androgene receptore, a njihovo je djelovanje nužno za punu, kvantitativno normalnu spermatogenezu i plodnost. Mjerenje AMH-a vrlo je korisno u mladim jer se koncentracije gonadotropina kod agonadalnih u srednjoškolskoj dobi ne mogu izmjeriti, a koncentracije testosterona neće se povećati provokativnim testiranjem u djece s abdominalnim testisima.

### AMH u neplodnosti

AMH je jedan od ključnih čimbenika koji uvjetuju normalan razvoj muških genitalija. Određivanje serumskog AMH-a klinički je vrijedno za procjenu funkcije gonada. U odraslom čovjeku AMH se izlučuje u serumu i u sjemennoj tekućini i kao specifični marker Sertolijevih stanica njegovo mjerenje može biti korisno za dobivanje informacija o spermatogenezi u neplodnih muškaraca (8).

## 2. CILJ

Glavni cilj: ispitati dijagnostičku važnost određivanja AMH-a u procjeni spermatogeneze.

Specifični ciljevi

1. Ispitati učestalost oligospermije i azospermije.
2. Ispitati postoji li razlika u serumskim vrijednostima AMH-a s obzirom na koncentraciju i broj spermija.
3. Ispitati postoji li razlika u vrijednostima AMH-a u sjemenoj tekućini ovisno o koncentraciji i broju spermija
4. Ispitati postoji li korelacija u vrijednostima AMH-a u serumu i u sjemenoj tekućini.

### 3. ISPITANICI I METODE

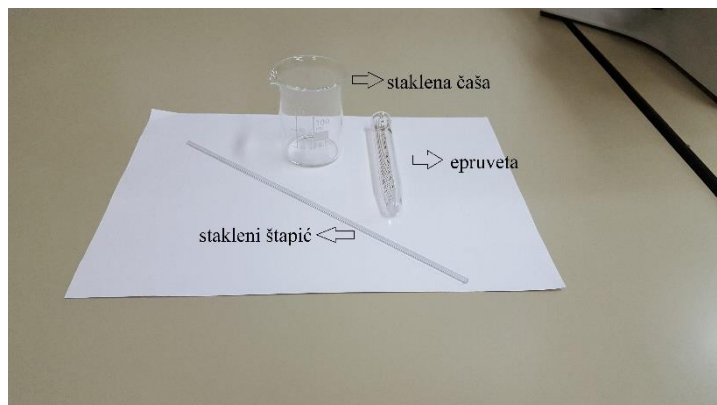
#### 3.1. Ispitanici

Za istraživanje su se rabili uzorci krvi i preostali uzorci sjemene tekućine pacijenata koji su bili u postupku obrade radi ispitivanja neplodnosti zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku od ožujka do srpnja 2017. godine. Iz istraživanja su isključeni ispitanici koji su imali nedovoljnu količinu sjemene tekućine za kompletnu obradu uzorka, oni u kojih nije došlo do lize koaguluma te zbog toga nije bilo moguće napraviti morfološku i biokemijsku analizu sjemene tekućine te ispitanici koji su u obradu bili upućeni zbog nekih drugih razloga.

Ispitanici su bili podijeljeni u skupine prema koncentraciji i broju spermija.

##### 3.1.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorak je dobiven masturbacijom i ejakulacijom u čistu posudu nakon 3 – 5 dana apstinencije u toaletu koji se nalazi u sklopu laboratorija. Uzorak je obilježen imenom i prezimenom ispitanika, datumom i vremenom uzorkovanja.



**Slika 3.** Pribor koji se upotrebljavao za prikupljanje uzoraka

Nakon toga pacijentima je uzet uzorak venske krvi u epruvetu s aktivatorom zgrušavanja (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) uz pridržavanje standardnih mjera za venepunkciju.

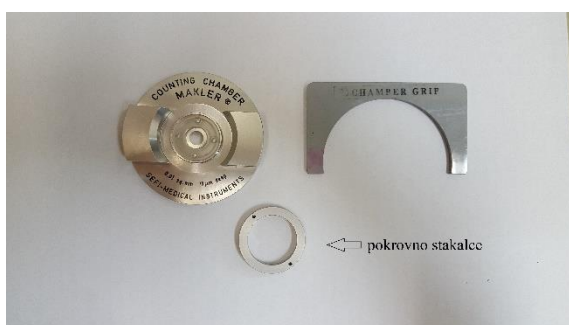
Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak kojim su potvrdili da žele sudjelovati u istraživanju.

## 3.2. Metode

U uzorcima sjemene tekućine, prema protokolu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*), postupkom mikroskopske analize napravljena je analiza sjemene tekućine (4).

### 3.2.1. Određivanje broja i koncentracije spermija

Ukupni broj spermija određen je u Maklerovoj komorici (slike 4. i 5.). Maklerova je komorica dubine 10  $\mu\text{m}$  tj., 1/10 dubine uobičajenih hemocitometara (4). Sastoji se od dvaju optički ravnih stakala, od kojih gornje služi kao pokrovnica na kojoj se nalazi mrežica od 1  $\text{mm}^2$ , a mrežica je podijeljena u 100 kvadratića površine 0,1 x 0,1 mm. Mala kapljica dobro promiješanog uzorka stavljena je u sredinu komorice i poklopljena gornjim staklom. Nakon toga Maklerova je komorica stavljena pod mikroskop (slika 6.) i pod povećanjem od 20 puta brojeni su spermiji. Spermiji su se izbrojeni u 10 kvadratića, a zbroj je označivao koncentraciju izraženu u milijunima po mililitru. Dobivena je koncentracija potom pomnožena s volumenom sjemena te je tako izračunan ukupan broj spermija u sjemenoj tekućini.



**Slika 4.** Dijelovi Maklerove komorice



**Slika 5.** Maklerova komorica





**Slika 6.** Svjetlosni mikroskop

### 3.2.2. Vitalno bojenje

Vitalno je bojenje postupak koji se radi na obojenom preparatu, svjetlosnim mikroskopom, pod uljnom imerzijom i povećanjem od 1000 puta, a omogućio nam je dobro razlikovanje živih i mrtvih spermija. Primjenjujete se eozin/nigrozinska metoda bojenja (slika 7.). Kapljica sjemena staklenim je štapićem stavljena na predmetno stakalce i dodana je kap 5 %-tne vodene otopine eozina i kap 2 %-tne vodene otopine nigrozina. Sve je promiješano, a nakon toga napravljen je razmaz na stakalcu koji se promatrao pod mikroskopom. Diferencirano je 100 spermija.



**Slika 7.** Na slici su prikazane boje eozin i nigrozin

### 3.2.3. Procjena pokretljivosti spermija i morfološka analiza

U svim je uzorcima procijenjena pokretljivost spermija u sjemenu te je napravljena i morfološka analiza. Pokretljivost je određivana u nativnome preparatu na svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem od 400 puta. Staklenim je štapićem na predmetno stakalce stavljena kap nerazrijeđene, promiješane sjemene tekućine i zatim prekrivena pokrovnicom. Nakon 1 min krenulo se s postupkom mikroskopiranja. Nakon pregledavanja 4 do 6 vidnih

polja, klasificirano je 100 živih spermatozoida i procijenjen postotak za svaku kategoriju pokretljivosti.

Pokretljivost spermija klasificirala se u 4 kategorije: brzo progresivni, sporo progresivni, stacionarni i nepokretni.

Morfološka je analiza provedena na obojenom preparatu modificiranom metodom po Papanicolaou (slika 8.), svjetlosnim mikroskopom pod uljnom imerzijom i pod povećanjem od 1000 puta. Morfološki, spermiji su svrstani u četiri kategorije: normalnog oblika, patološkog oblika glave, patološkog oblika srednjeg dijela i patološkog oblika repa.



**Slika 8.** Metoda bojenja po Papanicolaou

### 3.2.4. Određivanje anti-Müllerova hormona

Nakon makroskopske i mikroskopske analize uzorak je sjemene plazme centrifugiran 15 minuta pri 2000 okr./min te je izmjerena koncentracija AMH-a kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom (CLIA) na UniCel DXI 600 imunokemijskom analizatoru (Beckman Coulter Inc., Brea, SAD).

Uzorak je krvi je centrifugiran 10 minuta na 3500 okr./min, nakon čega je odvojen serum koji je poslužio za mjerenje koncentracije AMH-a istom metodom i na istom instrumentu.

CMIA AMH analiza je simultana, jednoobrazna imunoenzimska („sandwich”) analiza. Uzorak se dodaje u reakcijsku posudu, zajedno s mišjim monoklonskim anti-AMH protutijelom konjugiranim na alkalnu fosfatazu u MES puferu, TRIS puferiranom otopinom s proteinima, i paramagnetskim česticama obloženima mišjim monoklonskim anti-AMH protutijelom u TRIS puferu.

Nakon inkubacije u reakcijskoj posudi materijali vezani za krutu fazu drže se u magnetskom polju dok se nevezani materijali ispiru. Zatim se u posudu dodaje kemiluminiscentni supstrat Lumi-Phos\* 530, a zbog reakcije nastalo svjetlo mjeri se luminometrom. Proizvodnja svjetlosti izravno je proporcionalna koncentraciji AMH-a u uzorku. Količina analita u uzorku određuje se iz pohranjene, kalibracijske krivulje koja se sastoji od više točaka.

### **3.3. Statističke metode**

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc verzija 12.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Kolmogorov-Smirnovljevim testom ispitana je raspodjela podataka. Deskriptivna statistika uz odgovarajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije ili medijane i interkvartilne raspone (ovisno o normalnosti raspodjele) primijenjena je za prikaz podataka. Ovisno o normalnosti raspodjele, razlika između grupa testirala se odgovarajućim parametrijskim ili neparametrijskim testom (t-test ili Mann-Whitneyjev U-test). Ispitivanje povezanosti varijabli testiralo se izračunavanjem Spearmanova koeficijenta korelacije rho.  $P < 0,05$  je predočivao razinu značajnosti koja se služila za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

## 4. REZULTATI

U ovom je istraživanju sudjelovalo ukupno 87 muških ispitanika prosječne dobi 33 godine (18 – 47). Dvanaest ispitanika (0,13) imalo je azoospermiju (potpuni nedostatak spermija u sjemenoj tekućini), 11 ispitanika (0,13) imalo je oligospermiju ( $<15 \times 10^6/\text{mL}$ ), dok su preostala 64 ispitanika (0,74) imala normospermiju.

Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: I.) ispitanici s oligospermijom i azoospermijom i II.) ispitanici s normospermijom. Njihovi demografski i klinički parametri prikazani su u tablici 1.

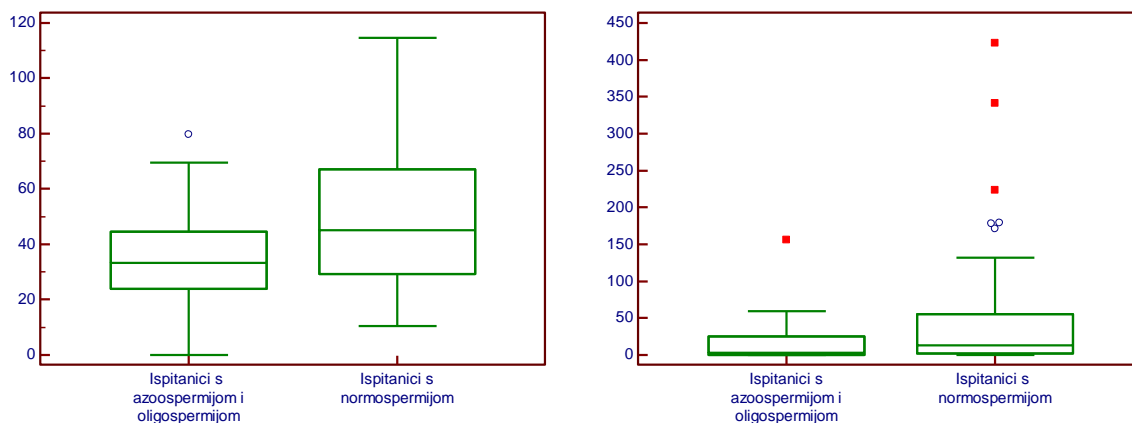
Tablica 1. Demografski i klinički parametri ispitanika

|                                                                                | Ispitanici s<br>azoospermijom i<br>oligospermijom<br>N = 23 | Ispitanici s<br>normospermijom<br>N = 64 | P-<br>vrijednost    |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------|
| Dob ( $\bar{x}^*$ , raspon)                                                    | 32 (18-46)                                                  | 33 (19 - 47)                             | 0,509 <sup>§</sup>  |
| Volumen sjemene tekućine (mL) ( $\bar{x}^*$ , SD <sup>†</sup> )                | 3,3 (1,5)                                                   | 3,5 (1,7)                                | 0,669 <sup>§</sup>  |
| Koncentracija spermija ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) (medijan, IQ <sup>‡</sup> ) | 0 (0 - 8)                                                   | 77 (32 - 134)                            | $<0,001^{\text{I}}$ |
| Broj spermija u sjemenu ( $\times 10^6/v$ ) (medijan, IQ <sup>‡</sup> )        | 0 (0 - 16)                                                  | 191 (115 - 496)                          | $<0,001^{\text{I}}$ |
| AMH u serumu (pmol/L) ( $\bar{x}^*$ , SD <sup>†</sup> )                        | 34,4 (20,3)                                                 | 51,2 (26,5)                              | 0,007 <sup>§</sup>  |
| AMH u sjemenjnoj plazmi (pmol/L) (medijan, IQ <sup>‡</sup> )                   | 3,4 (0,1 - 25,5)                                            | 13,2 (2,3 - 55,0)                        | 0,030 <sup>I</sup>  |

\*aritmetička sredina; †standardna devijacija; ‡interkvartilni raspon; § t-test; <sup>I</sup>Mann-Whitneyjev test

Vrijednosti koncentracija AMH-a u serumu i u sjemenjnoj plazmi bile su mnogo niže u skupini ispitanika s azoospermijom i oligospermijom (slika 9.).

## REZULTATI



**Slika 9.** Usporedba koncentracija AMH-a u serumu (četverokut označuje standardnu devijaciju, a njegova središnja linija aritmetičku sredinu, minimalna i maksimalna vrijednost prikazane su vodoravnim linijama, a stršeća vrijednost kružićem) i u sjemenoj plazmi (četverokut označuje interkvartilni raspon, a njegova središnja linija medijan, minimalna i maksimalna vrijednost prikazane su vodoravnim linijama ispod i iznad četverokuta, stršeće vrijednosti kružićima, a ekstremne vrijednosti kvadratićima)

Ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije utvrđeno je da između vrijednosti koncentracija AMH-a u serumu i AMH-a u sjemenoj plazmi nema korelacije.

## 5. RASPRAVA

AMH je jedan od ključnih čimbenika koji uvjetuju normalan razvoj muških genitalija. Sekrecija iz Sertolijevih stanica testisa te prisutnost u serumu i sjemenoj plazmi u mjerljivim koncentracijama čine ga potencijalnim biljekom muške neplodnosti (8). Posljednjih godina objavljeno je nekoliko studija o mogućoj kliničkoj primjeni određivanja AMH-a u dijagnostičkoj obradi pacijenata s oligospermijom i azospermijom (8).

Ovo je istraživanje provedeno u 87 muških ispitanika prosječne dobi 33 godine koji su prema koncentraciji spermija bili podijeljeni u dvije skupine: ispitanike s normospermijom i ispitanike oligospermijom i azospermijom.

Istraživanjem su utvrđene mnogo niže koncentracije AMH-a u serumu i u sjemenoj plazmi ispitanika s oligospermijom i azospermijom. S obzirom na ulogu Sertolijevih stanica u sazrijevanju spermija, takav je rezultat u skladu s očekivanjem. Osim toga, time su potvrđeni rezultati sličnih istraživanja koja pokazuju kako je znatno smanjenje AMH-a u sjemenoj plazmi povezano s odsutnošću spermatozoida u sjemenu muškaraca s azospermijom, otkrivajući blisku vezu između koncentracije AMH-a i napretka u spermatogenezi (2, 6, 10). Primjerice, Sabetian i suradnici (2) radili su istraživanje u 200 ispitanika koji su također bili podijeljeni u dvije skupine: ispitanici s azospermijom i normospermijom, te su dokazali da postoje znatne razlike u koncentracijama inhibina B i AMH-a između dviju skupina na temelju prisutnosti ili odsutnosti zreloga spermija u biopsijama testisa ( $P < 0,01$ ). Kang-sheng i suradnici (10) u svojem su istraživanju ispitanike podijelili na plodne i neplodne, ovisno o pokretljivosti spermija, te su ustanovili da su koncentracije AMH-a niže u serumu i u sjemenoj tekućini neplodnih muškaraca. Međutim, nisu našli korelaciju između koncentracija AMH-a izmjerenih u tim dvama biološkim uzorcima. Našim istraživanjem također nije nađena korelacija vrijednosti AMH-a u serumu i sjemenoj plazmi, što se može objasniti mogućim utjecajem nekih drugih čimbenika koji nisu vezani za spermatogenezu na koncentraciju tog analita. Ograničavajući faktori ovog istraživanja jesu mali broj ispitanika uključenih u istraživanje te nedostatak informacija o uzrocima koji su uzrokovali oligospermiju i azospermije. S druge strane, rezultati rada dobivaju na važnosti zato što je ovo prvo istraživanje te vrste provedeno u Hrvatskoj. Sva dostupna istraživanja posljednjih nekoliko godina provedena na uzorcima stanovništva azijskih zemalja.

## RASPRAVA

Pri razmatranju dobivenih rezultata treba uzeti u obzir činjenicu da u ispitivanu populaciji nisu isključeni pacijenti s kroničnim bolestima, pušači, ispitanici koji konzumiraju alkohol te oni koji se koriste lijekovima koji bi eventualno mogli utjecati na kvalitetu sjemensne tekućine. Nadalje, prethodnim je istraživanjima pokazano da visok indeks tjelesne težine može utjecati na broj, koncentraciju i morfologiju spermija (9) pa je nedostatak informacija o visini i težini ispitanika u ovom istraživanju još jedan od ograničavajućih faktora koje treba uzeti u obzir.

Zaključno, ovim je istraživanjem potvrđena potencijalna dijagnostička važnost određivanja AMH-a u procjeni muške neplodnosti. Potvrđeno je da padom koncentracije i smanjenjem broja spermija u sjemenu padaju i vrijednosti AMH-a. Može li dodatno određivanje inhibina B povećati dijagnostičku vrijednost AMH-a u procjeni muškog faktora neplodnosti, prognozu ishoda potpomognute oplodnje ili vjerojatnost pronalaženja sperme s pomoću testikularne ekstrakcije spermatozoida (TESE), ostaje tek odrediti. Također bi uključivanje dodatnih parametara zajedno s AMH-om i analizom spermiograma vjerojatno rezultiralo povećanjem ukupne specifičnosti i osjetljivosti u dijagnosticiranju muške neplodnosti.

### 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci.

1. Oligospermija i azospermija u ovom se istraživanju pojavljuju s podjednakom učestalošću kao u sličnim istraživanjima objavljenima u posljednjih nekoliko godina,
2. Vrijednosti koncentracije AMH-a u serumu bile su mnogo niže u skupini ispitanika s oligospermijom i azospermijom, što upućuje na to da padom broja i koncentracije spermija pada i vrijednost AMH-a.
3. Ispitanici s azospermijom i oligospermijom imali su niže vrijednosti koncentracije AMH u sjemenjnoj plazmi nego ispitanici s normospermijom. Ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije utvrđeno je da između vrijednosti koncentracija AMH-a u serumu i AMH-a u sjemenjnoj plazmi nema korelacije.

S obzirom na to da danas postoji veliki interes za smanjenje postotka neplodnosti koji pogađa više od 10 do 15 % parova reproduktivne dobi i da je znatan udio neplodnosti uzrokovan muškim sterilitetom različita uzroka, nužno je svoja istraživanja usmjeriti prema tome. Možemo reći da smo našim istraživanjem dokazali da određivanje AMH-a može biti korisno za dobivanje informacija o spermatogenezi u neplodnih muškaraca. Vrijednosti koncentracije AMH-a u serumu i u sjemenjnoj plazmi bile su mnogo niže u skupini muškaraca s azospermijom i oligospermijom.



## 7. SAŽETAK

### Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je ispitati dijagnostičku važnost određivanja AMH-a u procjeni spermatogeneze.

### Ispitanici i metode

U istraživanje je bilo uključeno 87 muških ispitanika: 12 ispitanika s azospermijom, 11 ispitanika s oligospermijom i 64 ispitanika s normospermijom. Za istraživanje su se rabili uzorci krvi i preostali uzorci sjemene tekućine pacijenata koji su bili u postupku obrade radi ispitivanja neplodnosti zaprimljeni u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku od ožujka do srpnja 2017. godine. U uzorcima sjemene tekućine, prema protokolu Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*), postupkom mikroskopske analize napravljena je analiza sjemene tekućine. AMH u serumu i sjemenjnoj plazmi izmjeren je kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom (CLIA) na UniCel DXI 600 imunokemijskom analizatoru (Beckman Coulter Inc., Brea, SAD). Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc verzija 12.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### Rezultati

Vrijednosti AMH-a u sjemenjnoj plazmi i serumu bile su niže u ispitanika s oligospermijom i azospermijom (serum: 34,4 prema 51,2 pmol/L,  $P = 0,007$ ; sjemenjna plazma: 3,4 prema 13,2 pmol/L,  $P = 0,030$ ) u usporedbi s ispitanicima s normospermijom. Ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije utvrđeno je da između vrijednosti koncentracija AMH-a u serumu i AMH-a u sjemenjnoj plazmi nema korelacije.

### Zaključak

Određivanje koncentracije AMH-a može biti korisno za dobivanje informacija o spermatogenezi u neplodnih muškaraca.

**Ključne riječi** : AMH, spermatogeneza, oligospermija, azospermija, neplodnost

### 8. SUMMARY

**Objective:** The aim of the study was to examine the diagnostic significance of AMH determination in spermatogenesis assessment.

**Materials and Methods:** The study included 87 male subjects: 12 subjects with azoospermia, 11 subjects with oligospermia and 64 subjects with normospermia. The study used blood samples and remaining samples of semen fluid from patients who were in the process of examination for infertility testing received at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics from March to July 2017. Microscopic analysis of semen liquid samples was made according to the World Health Organization (WHO) protocol. The AMH in serum and semen plasma was measured by chemiluminescence immunochemical method (CLIA) on the UniCel DXI 600 immunochemical analyzer (Beckman Coulter Inc., Brea, USA). The results were processed using the statistical software MedCalc version 12.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

**Results:** Values of AMH in semen plasma and serum were lower among subjects with oligospermia and azoospermia (serum: 34.4 vs 51.2 pmol/L,  $P=0.007$ ; semen plasma: 3.4 vs 13.2 pmol/L;  $P=0.030$ ) in comparison with normospermia subjects. Examination of Spearman's correlation coefficient showed no correlation between AMH concentration in serum and AMH in semen plasma.

**Conclusion:** Determination of AMH concentration may be useful for receiving spermatogenesis information in infertile men.

**Key words:** AMH; spermatogenesis; oligospermia; azoospermia; infertility

## 9. LITERATURA

1. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C et al. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology 2015.
2. Sabetian S, Ardekani AM, Hodjat M, Akhondi MM, Soltanghoreae H, Amirjannati N, et al. Comparing Seminal Plasma Biomarkers between Normospermic and Azoospermic Men. *Journal of reproduction and fertility*. 2010 Apr/Jun;11(1):39-46.
3. Bauman R. Obrada i terapija neplodnosti. [Http://hrcak.srce.hr/medicina](http://hrcak.srce.hr/medicina) 2009; 45(4): 300-312
4. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 5th edition, Published on behalf of the WHO by Cambridge University Press, 2010
5. Håkonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, et al. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reproductive Health*. 2011;1-8
6. Tüttelmann F, Dykstra N, Themmen A, Visser JA, Nieschlag E, Simoni M. Anti-Müllerian hormone in men with normal and reduced sperm concentration and men with maldescended testes. *Fertility and Sterility*. 2009;91(5):1-8
7. Matuszczak E, Hermanowicz A, Komarowska M, Debek W. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. *International Journal of Endocrinology*. 2013:1-7
8. Marca AL, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Update*. 2010;16(2):113-130
9. Andersen JM, Herning H, Aschim EL, Hjelmæsæth J, Mala T, Hanevik HI, et al. Body Mass Index Is Associated with Impaired Semen Characteristics and Reduced Levels of Anti-Müllerian Hormone across a Wide Weight Range. *PloS ONE*. 2015 June; 10(6):1-12.
10. Liu K.S., Yao H, Mao X.D., Tang X.Y., Chen Y.J. Application of Anti-Müllerian Hormone in Diagnosis of Male Infertility. *J Int Transl Med*. 2017; 5(1):19-22

## **10. ŽIVOTOPIS**

**PATRICIA VIDAS**

**Datum i mjesto rođenja:**

14. ožujka 1994., Osijek

**Obrazovanje :**

2009. – 2013., Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija „Ruđer Bošković“ u Osijeku

2013. – 2017., Preddiplomski sveučilišni studij biomedicinsko laboratorijskih tehnologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku