

Uloga spolnih hormona u muškoj neplodnosti

Vidas, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:556322>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-10-17**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Patricia Vidas

**ULOGA SPOLNIH HORMONA U
MUŠKOJ NEPLODNOSTI**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Patricia Vidas

**ULOGA SPOLNIH HORMONA U
MUŠKOJ NEPLODNOSTI**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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 23 stranice, 2 tablice i 1 sliku.

Veliku zahvalnost, prije svega, izražavam 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, velika 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. Epidemiologija i etiologija muške neplodnosti	1
1.2. Fiziologija muškog spolnog sustava.....	2
1.3. Endokrinopatije i neplodnost.....	2
1.4. Dijagnostički postupci u ispitivanju muške neplodnosti	3
1.4.1. Analiza sjemene tekućine	3
1.4.2. Evaluacija spolnih hormona	4
2. CILJ	8
3. ISPITANICI I METODE	9
3.1. Ispitanici	9
3.1.1. Prikupljanje uzoraka.....	9
3.2. Metode.....	9
3.2.1. Analiza sjemene tekućine	10
3.2.2. Analiza spolnih hormona.....	10
3.3. Statističke metode.....	11
4. REZULTATI.....	12
5. RASPRAVA.....	15
6. ZAKLJUČAK	18
7. SAŽETAK.....	19
8. SUMMARY	20
9. LITERATURA	21
10. ŽIVOTOPIS	23

1. UVOD

1.1. Neplodnost

Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), neplodnost se definira kao nemogućnost ostvarivanja trudnoće kod seksualno aktivnog para unutar jedne godine bez uporabe kontraceptiva (1). Socijalni fenomen odgađanja rađanja i svakodnevni stres kakav donosi život u velikim sredinama sve češće dovode do pojave bračne neplodnosti.

1.1.1. Epidemiologija i etiologija muške neplodnosti

Neplodnost je ozbiljan javnozdravstveni problem koji zahvaća više od 10 do 15% parova reproduktivne dobi. Neplodnost može biti uzrokovana podjednako muškim i ženskim faktorima, biti prisutna kod oba partnera ili biti neotkrivena čak i modernim dijagnostičkim postupcima. Procjenjuje se da 1 od 6 (15%) parova reproduktivne dobi ne uspijeva ostvariti trudnoću unutar godine dana, a da je približno 50% slučajeva uzrokovano muškim sterilitetom. Zbog vrlo niske kvalitete dokaza trenutno nije moguće utvrditi nepristranu prevalenciju muške neplodnosti u globalnoj, regionalnoj ili nacionalnoj populaciji (2). Osim toga, trenutno nije moguće odrediti koji se omjer neplodnosti u heteroseksualnim parovima može pripisati muškom partneru (2). Različite definicije koje se koriste za mušku neplodnost i činjenice da muškarcima nisu uvijek ispitivani pri procjeni neplodnosti mogu rezultirati pogrešnim zaključcima studija (2). Prevalencija neplodnosti varira u različitim zemljama, a veća je u nerazvijenim zemljama gdje postoje ograničeni resursi za dijagnozu i liječenje. U Hrvatskoj se broj neplodnih parova kreće od 12-15%.

Multidisciplinarni pristup i najnovije spoznaje u reproduktivnoj medicini povećali su razumijevanje čimbenika koji utječu na mušku neplodnost, međutim različitost etioloških uzroka i rastuća prevalencija predstavljaju sve veći izazov modernoj medicini. Muška neplodnost može biti uzrokovana hormonalnom ili anatomskom etiologijom koja može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Svaki postupak koji utječe na proizvodnju i kvalitetu sperme potencijalno je štetan za mušku plodnost (3). Glavni uzroci muške neplodnosti mogu biti: varikokele, opstrukcija genitalnog trakta, zatajenje testisa, problemi u stvaranju sperme, u njezinom transportu, seksualni problemi (erekcija i ejakulacija), genetska predispozicija, hormonalni poremećaj. I čimbenici poput stresnog načina života, alkoholizma, pušenja, pretilosti također mogu rezultirati smanjenjem kvalitete sperme ili uzrokovati odsutnost sperme u sjemenu. Potpuna odsutnost spermija u ejakulatu se definira kao azoospermija, a prisutna je u manje od 1% muškaraca u normalnoj populaciji i u 10-15% neplodnih

muškaraca (4). U nekim slučajevima je nemoguće utvrditi etiologiju pa se takva neplodnost proglašava idiopatskom (5).

1.2. Fiziologija muškog spolnog sustava

Endokrine žlijezde i središnji živčani sustav (SŽS) međusobnim usklađenim djelovanjem reguliraju muški spolni sustav. To se obavlja mehanizmom povratne sprege preko osi hipotalamus-hipofiza-testis. Muške spolne organe čine: sjemenik (*testis*), pasjemenik (*epididymis*), sjemenovod (*ductus deferens*), sjemeni mjehurići (*vesiculae seminales*), mlaznični vod (*ductus ejaculatorius*), predstojna žlijezda (*prostata*), bulbouretralne žlijezde (*glandulae bulbo-urethrales*), mokraćovod (*urethra*) i muški spolni ud (*penis*). U prostorima između sjemenih kanalića nalazi se rahlo vezivo koje sadržava sve vrste vezivnih stanica te intersticijske stanice (Leydigove stanice) koje proizvode androgene. Leydigove stanice nakon stimulacije luteotropnim hormonom (LH) luče testosteron, najvažniji androgeni hormon. Sinteza testosterona regulirana je hipotalamusom i hipofizom. Gonadotropin-oslobađajući hormon koji luči hipotalamus prolazi kroz hipotalamo-hipofiznu portalnu cirkulaciju do prednjeg režnja hipofize gdje stimulira proizvodnju glikoproteinskih hormona: LH i FSH (6). LH i FSH se potom izlučuju u cirkulaciju kako bi na testise prenijeli stimulativne aktivnosti. LH se veže na LH receptore na Leydigovim stanicama koje okružuju sjemene kanaliće stimulirajući proizvodnju testosterona. FSH djeluje na Sertolijeve stanice u sjemenim kanalićima koje pokreću spermatogenezu i sintezu hormona, prvenstveno inhibina i anti-Müllerovog hormona (AMH).

1.3. Endokrinopatije i neplodnost

Sustav za reprodukciju je posebno osjetljiv na različite endogene poremećaje koji mogu biti rezultat bolesti (endokrinološko-metabolički poremećaj) ili djelovanja okoline (poremećaji prehrane, stres). Bolesti hipofize, štitnjače i nadbubrežne žlijezde su najčešći poremećaji endokrinih žlijezda (7). Poremećaji u hipofizi mogu dovesti do smanjenog ili povećanog lučenja hormona. Manjak hormona može biti djelomičan ili potpun. Hormoni adenohipofize koji mogu imati značajan učinak su tireotropni (TSH), adenokortikotropni (ACTH), luteotropni (LH) i folikulstimulirajući hormon (FSH). Oni kontroliraju sintezu i lučenje niza hormona ciljnih žlijezda kao što su štitnjača, nadbubrežna žlijezda i testisi. Sintezu hormona štitnjače regulira TSH. Bolesti štitnjače se pojavljuju u reproduktivnim godinama, a najčešće je riječ o autoimunim bolestima: Hashimotov tireoiditis i Gravesova bolest. U hipotireoidnih muškaraca uočeni su manji broj i slabiji motilitet spermija. Nadbubrežnu žlijezdu čini kora s

trima različitim zonama i srž. Vanjska zona luči aldosteron, srednja zona luči kortizol dok unutrašnja zona luči dehidroepiandrosteron (DHEAS). Bolesti nadbubrežnih žlijezda koje se očituju manjkom hormona u maloj mjeri mogu utjecati na reprodukciju dok višak hormona može uzrokovati neplodnost (6). Najvažniju ulogu u reprodukciji imaju FSH i LH koji se vežu na receptore u testisima i pokreću kaskadu događaja važnih za stvaranje i sazrijevanje spermija.

1.4. Dijagnostički postupci u ispitivanju muške neplodnosti

Obradu neplodnosti treba započeti čim je zadovoljen ranije navedeni uvjet za postavljanje dijagnoze, tj. nakon godinu dana redovitih spolnih odnosa bez uporabe kontraceptiva. Smjernice preporučuju fizikalni pregled i pažljivu anamnezu usmjerenu na reproduktivnu povijest te analizu spermograma (7). Anamneza je standard za obradu bilo kojeg medicinskog problema. Reproductivna povijest treba uključivati trajanje neplodnosti, eventualnu prethodnu plodnost, dječje bolesti i razvoj, medicinsku/kiruršku/seksualnu povijest, izloženost štetnom okolišu, način života (7). U dijagnostici su dostupne i slikovne metode. Ultrazvučni pregled skrotuma se koristi u procjeni varikokele i abnormalnosti testisa. Transrektalni ultrazvuk može pomoći pri detekciji opstrukcije sjemenih mjehurića ili njihova nedovoljnog razvoja. Transrektalna ultrasonografija je preporučena u određenim situacijama: uključujući smanjeni volumen sjemena (<1,5 mL) i poremećaj ejakulacije (anejakulacija, hematospermija, bolna ejakulacija) (3). Laboratorijska obrada neplodnosti započinje analizom sjemene tekućine, neinvazivnom metodom kojom dobivamo uvid u stanje plodnosti muškarca. Nadalje, većina stručnjaka vjeruje da bi svi neplodni muškarci trebali imati početnu endokrinološku obradu, ali još ne postoji suglasje o tome koliko bi opsežna ta procjena trebala biti (7).

1.4.1. Analiza sjemene tekućine

Laboratorijska obrada neplodnosti započinje analizom sjemene tekućine. To je jednostavna, jeftina, brza i neinvazivna metoda kojom dobivamo uvid u stanje plodnosti muškarca. 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 (8). Analiza sjemena obuhvaća makroskopski izgled i pH, mikroskopske analize (pokretljivost, brzina, morfologija i vitalnost) te biokemijske analize (cink, limunska kiselina i fruktoza). Makroskopska analiza treba započeti procjenom likvefakcije, unutar 30 minuta, ali ne dulje od jednog sata nakon

ejakulacije (8). Likvefakcija je pojava pri kojoj se plazma iz sjemene tekućine nakon što biva zgrušana djelovanjem faktora zgrušavanja ponovo „razvodnjava“ zbog utjecaja prostatičkih enzima. Ispitivanjem likvefakcije se doznaje više o poremećaju rada žlijezda, tj. izvodnih kanala jer koagulirajući enzimi potječu iz seminalnih vezikula, a likvefaktirajući iz prostate. pH sjemene tekućine trebao bi se kretati u rasponu od 7.2 do 8.0. pH niži od 7.0 može upućivati na disgenezu sjemenovoda, sjemenih vezikula ili epididimisa (8). pH viši od 8.0 se nalazi u akutnoj upali. Mikroskopskom analizom procjenjujemo pokretljivost, brzinu, morfologiju i vitalnost spermija. Svi parametri dobar su pokazatelj oplodnog potencijala i znatno se razlikuju kod plodnih i neplodnih muškaraca. Loša kvaliteta sjemena može biti posljedica proizvodnje abnormalnog spermatozoida, posttestikularnog oštećenja spermatozoida u epididimisu ili ejakulata iz abnormalne sekrecije pomoćnih žlijezda (8). Kako bi se saznalo više o funkciji pomoćnih žlijezda, koriste se biokemijski markeri. Neki od njih su cink, limunska kiselina i fruktoza. Svaka promjena u biokemijskom sastavu sperme može biti uzrok koji vodi k neplodnosti u muškarca (9). Određivanje ovih parametara može pridonijeti u objašnjenju etiopatogeneze kod poremećaja reproduktivne funkcije te dati smjernice za moguću terapiju i prevenciju spomenutog poremećaja u našoj populaciji.

1.4.2. Evaluacija spolnih hormona

Hormonska kontrola proizvodnje sperme uključuje hipotalamus (gonadotropin-oslobađajući hormon, GnRH), prednji režanj hipofize (gonadotropini-FSH i LH) i testise (testosteron i inhibin) (3). Prednji režanj hipofize, adenohipofiza, pod utjecajem gonadoliberina iz hipotalamusa luči gonadotropine: folikulstimulacijski hormon (FSH) i luteotropni hormon (LH). Nazivaju se glikoproteini jer sadrže složene ugljikohidrate poznate kao glikozidi. Svaki od hormona sastoji se od dva glikopeptidna lanca, od kojih je jedan alfa lanac, identičan u obaju hormona. Drugi lanac, beta lanac, razlikuje se po strukturi svakog hormona, objašnjavajući time različita djelovanja. Testosteron je najvažniji androgeni steroidni hormon koji luče Leydigove stanice testisa nakon podražaja LH-a. Oko 97% cirkulirajućeg testosterona vezano je za protein, najveći postotak vezan je za globulin koji veže spolne hormone (SHBG) te manjim dijelom na albumin.

Androgeni koje proizvode testisi i nadbubrežna žlijezda igraju bitnu ulogu u razvoju muških reproduktivnih organa, puberteta, muške spolne funkcije i plodnosti (7). Procjenjuje se da su niske razine testosterona ili povećane razine luteotropnog hormona (LH) prisutne u oko 20-30% slučajeva muške neplodnosti (7). Prilikom obrade muške neplodnosti, preporuča se i

UVOD

obrada cjelokupnog hormonskog statusa jer će povećanje testosterona povećati broj spermija. Trenutne smjernice kliničke prakse zagovaraju evaluaciju hormona neplodnih muškaraca kada postoje simptomi hipogonadizma ili kada je koncentracija sperme manja od 10 milijuna/mL (6). Međutim, većina stručnjaka vjeruje da bi svi neplodni muškarci trebali imati početnu endokrinološku obradu, premda još ne postoji suglasje o tome koliko bi opsežna ta procjena trebala biti (7). Intratestikularni testosteron od vitalnog je značaja za održavanje spermatogeneze. Kada je naznačeno, minimalna početna hormonalna procjena trebala bi uključivati folikulstimulacijski hormon (FSH) i ukupnu razinu testosterona u serumu (7).

Testosteron

Testosteron je najvažniji androgeni steroidni hormon. Kod muškaraca se izlučuje iz Leydigovih stanica testisa koje stimulira luteotropni hormon (LH). Izlučivanje testosterona kontrolira se mehanizmom negativne povratne sprege u hipotalamusu. Visoka razina intratestikularnog testosterona uglavnom se veže za protein koji veže androgene i izlučuje se u sjemene tubule (7). Unutar Sertolijevih stanica testosteron je vezan za androgene receptore koji kada se aktiviraju dovode do pokretanja i održavanja spermatogeneze i inhibicije apoptoze zametnih stanica (7). Abnormalnosti u receptorima androgena mogu rezultirati abnormalnim muškim spolnim razvojem, ali i biti potencijalni uzrok muške neplodnosti (7). Koncentracije testosterona podložne su biološkoj varijaciji te osciliraju tijekom dana. Koncentracija testosterona najviša je ujutro zbog pulsirajućeg oslobađanja LH-a tijekom noći. Doba dana, dob te različite bolesti, čimbenici su koji utječu na koncentraciju testosterona kod muškaraca te ih treba uzeti u obzir kod interpretacije rezultata. Hipogonadizam, definiran kao neadekvatna funkcija gonada koja se očituje nedostatkom u gametogenezi ili sekreciji hormona, česta je klinička pojava koja utječe na plodnost i seksualno zdravlje muškarca. U Sjedinjenim Američkim Državama otkriveno je da gotovo 39% muškaraca starijih od 45 godina ima nisku razinu testosterona u serumu (7) što navodi na zaključak da razine testosterona opadaju godinama.

Steroidni hormoni, poput testosterona, potrebni su za normalni razvoj i održavanje spermatogeneze. Muškarci s varikokelom i abnormalnim nalazom spermiograma imaju niže koncentracije testosterona (9).

Folikulstimulirajući hormon (FSH)

FSH je glikoprotein koji sadrži dvije nekovalentno vezane podjedinice: alfa i beta. Podjedinica alfa je vrlo slična podjedinicama LH-a, hCG-a i TSH-a dok je podjedinica beta

UVOD

jedinstvene strukture i nositelj je biološke i imunološke specifičnosti. FSH se izlučuje iz adenohipofize u cirkulaciju pod utjecajem hormona koji oslobađa gonadotropine (GnRH). Izlučivanje je pulsirajuće, uz brze promjene u cijelom rasponu normalnih koncentracija, a kontrolirano je mehanizmom negativne povratne sprege. FSH kod muškaraca djeluje na Sertolijeve stanice u sjemenim kanalićima stimulirajući spermatogenezu. Zbog negativne povratne sprege koja kontrolira izlučivanje gonadotropina, povišene koncentracije FSH-a ukazuju na poremećaj gonada ako su udružene s niskim koncentracijama gonadnih hormona. Povišene koncentracije FSH-a se očituju disfunkcijom testisa ili anorhijom (kongenitalna malformacija koju karakterizira odsustvo obaju testisa pri rođenju). Koncentracija FSH-a može biti povišena i kod Klinefelterovog sindroma. Patološke koncentracije FSH-a mogu ukazivati i na disfunkciju hipotalamus-hipofizne osi. Smanjeno oslobađanje GnRH-a dovodi do smanjenih koncentracija FSH-a i LH-a što može biti pokazatelj razvoja panhipopituitarizma.

Luteotropni hormon (LH)

Humani luteinizirajući hormon (LH) se jednako kao i folikulstimulirajući hormon (FSH) izlučuje iz adenohipofize pod utjecajem gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH). Primarna uloga LH-a kod muškaraca je potaknuti sintezu testosterona u Leydigovim stanicama. Stimulirajući sintezu testosterona, LH zajedno s FSH-om regulira spermatogenezu u Sertolijevim stanicama sjemenih kanalića. Negativnom povratnom spregom testosteron regulira lučenje LH-a. Niske koncentracije LH-a kod spolno zrelih osoba su obično pokazatelj ranog razvoja panhipopituitarizma. Nasuprot tome, tumori hipotalamusa i hipofize uzrokuju porast LH-a i FSH-a. Povišene koncentracije hormona, praćene sniženim koncentracijama gonadnih hormona, upućuju na poremećaj u gonadama kao uzrok neplodnosti.

Globulin koji veže spolne hormone (SHBG)

Globulin koji veže spolne hormone (SHBG) je glikoprotein koji pokazuje visoki afinitet prema 17-beta-hidroksisteroidnim hormonima kao što su testosteron i estradiol. SHBG je glavni transportni protein za estrogene i androgene u perifernoj krvi. Koncentracija SHBG-a je glavni regulator distribucije slobodnih i vezanih oblika hormona. U serumu testosteron postoji u ravnoteži između slobodnog testosterona i testosterona vezanog za proteine. Testosteron vezan za proteine se dalje može podijeliti na slabo vezani za albumin, koji lako difundira u ciljna tkiva, i čvrsto vezani za SHBG koji je biološki neaktivan (7). Ukupna razina testosterona se odnosi na sve oblike testosterona, od čega je 2-3% slobodno, oko 50% je

UVOD

vezano za albumin, a otprilike 44% čvrsto je vezano za SHBG (7). Koncentracije SHBG-a podložne su varijaciji kod različitih bolesti, pri čemu se povišene koncentracije nalaze kod hipertireoze, hipogonadizma, ciroze jetre, a snižene koncentracije kod miksedema, hiperprolaktinemije i sindroma suviška androgena. Longitudinalne populacijske studije pokazale su da iako se razina SHBG-a povećava s napredovanjem dobi, razina ukupnog testosterona se smanjuje (7). Iako je poznato da razina testosterona opada s dobi, novi podatci također sugeriraju da genetika ima značajnu ulogu u razvoju hipogonadizma, konkretno, genetskih varijanti u globulinu koji veže spolni hormon koji može rezultirati znatnom varijacijom razine testosterona u serumu (7). Omjer testosterona i SHBG-a poznat je i kao indeks slobodnog androgena, tj. indeks slobodnog testosterona. Povećana sinteza androgena smanjuje vrijednosti SHBG-a što će rezultirati većom količinom slobodnog testosterona i još većim androgenim učinkom.

2. CILJ

Glavni je cilj ispitati razinu spolnih hormona kod neplodnih muškaraca.

Specifični su ciljevi:

1. ispitati učestalost oligospermije i azospermije,
2. ispitati postoji li razlika u serumskim vrijednostima hormona s obzirom na koncentraciju spermija,
3. ispitati postoji li korelacija u vrijednostima hormona testosterona, LH-a, FSH-a i transportnog proteina SHBG-a s obzirom na parametre u spermogramu.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici su pacijenti koji su bili u postupku obrade radi ispitivanja neplodnosti zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku od ožujka do srpnja 2017. godine. Za istraživanje su se rabili uzorci krvi i preostali uzorci sjemene tekućine. 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. Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak kojim su potvrdili da žele sudjelovati u istraživanju.

Podatci o uzorcima i rezultatima istraživanih parametara dobiveni su iz elektronske baze podataka Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine prema koncentraciji spermija: I) pacijenti s azoospermijom i oligospermijom i II) pacijenti s normospermijom.

3.1.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorak je dobiven masturbacijom i ejakulacijom u čistu posudu nakon 4 dana apstinencije u toaletu koji se nalazi u sklopu laboratorija. Uzorak je obilježen imenom i prezimenom ispitanika, datumom te vremenom uzorkovanja.

Osim uzorka ejakulata 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.

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.

U uzorcima venske krvi se nakon centrifugiranja uzorka pri 3500 o/min izmjerila koncentracija spolnih hormona: testosterona, LH-a, FSH-a te transportnog proteina SHBG-a.

3.2.1. Analiza sjemene tekućine

Nakon makroskopske analize sjemene tekućine i procjene likvefakcije, volumena i pH uslijedila je mikroskopska analiza. Za određivanje ukupnog broja i koncentracije spermija korištena je Maklerova komorica. Maklerova komorica je dubine 10 μm , a sastoji se od dvaju optički ravnih stakala, od kojih gornje služi kao pokrovnica (8). Pokrovno stakalce ima mrežicu od 1 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. Maklerova komorica je potom stavljena pod mikroskop te su pod povećanjem od 20 puta brojani spermiji. Spermiji su izbrojani u 10 kvadratića, a zbroj je značio koncentraciju izraženu u milijunima po mililitru. Dobivena koncentracija pomnožena je s volumenom sjemena te je tako izračunat ukupan broj spermija u sjemenoj tekućini.

Kako bi se moglo razlikovati žive od mrtvih spermija, korišteno je vitalno bojenje. Primijenili smo eozin/nigrozinsku metodu bojenja. Kapljica uzorka 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 je napravljen razmaz na stakalcu koji se promatrao pod mikroskopom. Diferencirano je 100 spermija.

U svim je uzorcima procijenjena pokretljivost spermija te je napravljena morfološka analiza. Pokretljivost je određivana u nativnom preparatu na svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem od 400 puta. Nakon pregledavanja četiriju do šest vidnih polja, klasificirano je sto živih spermatozoida i procijenjen postotak za svaku kategoriju. Pokretljivost se klasificirala u četiri kategorije: brzo progresivni, sporo progresivni, stacionarni i nepokretni.

Morfološka je analiza provedena na obojenom preparatu modificiranom metodom po Papanicolaouu, svjetlosnim mikroskopom pod uljnom imerzijom i povećanjem od tisuću puta. Morfološke kategorije su: spermiji normalnog oblika, patološkog oblika glave, patološkog oblika srednjeg dijela i patološkog oblika repa.

3.2.2. Analiza spolnih hormona

Uzorak venske krvi je centrifugiran 10 minuta na 3500 okr./min, nakon čega je odvojen serum koji je poslužio za mjerenje koncentracija testosterona, LH-a, FSH-a i SHBG-a kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom (CMIA) na imunokemijskom analizatoru ARCHITECT i1000SR (Abbott Diagnostics, Lake Forest, USA).

CMIA analiza je simultana imunoenzimska („sandwich“) analiza. Prilikom određivanja testosterona uzorak se dodaje u reakcijsku posudu zajedno s konjugatom testosterona obilježenim akridinom, paramagnetskim mikročesticama obloženim ovčjim monoklonskim antitijelima na testosteron, predaktivacijskom i aktivacijskom otopinom. To aktivira kemiluminiscentnu reakciju koja se mjeri i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU). Količina testosterona u uzorku obrnuto je proporcionalna vrijednosti RLU izmjerenoj ARCHITECT iSystem optikom. Količina analita u uzorku se određuje iz pohranjene, kalibracijske krivulje koja se sastoji od više točaka.

Princip određivanja hormona FSH-a, LH-a i transportnog proteina SHBG-a je isti s promjenama paramagnetskih mikročestica koje su obložene antitijelima na te hormone.

3.3. Statističke metode

Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc, verzija 12.4.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Deskriptivna statistika uz odgovarajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije ili medijane i interkvartilne raspone (ovisno o normalnosti raspodjele) se koristila za prikaz podataka. Kolmogorov-Smirnovljev testom se ispitala raspodjela podataka. Ovisno o normalnosti raspodjele, razlika između grupa se testirala odgovarajućim parametrijskim ili neparametrijskim testom (t-test ili Mann-Whitney U test). Ispitivanje povezanosti varijabli testiralo se izračunavanjem koeficijenta korelacije. $P < 0,05$ je predstavljala razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

4. REZULTATI

U ovom je istraživanju sudjelovalo ukupno 90 muških ispitanika prosječne dobi 33 godine (18-47). 13 ispitanika imalo je azospermiju (potpuni nedostatak spermija u sjemenoj tekućini), 13 ispitanika imalo je oligospermiju ($<15 \times 10^6/\text{mL}$) dok su preostala 64 ispitanika imala normospermiju.

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

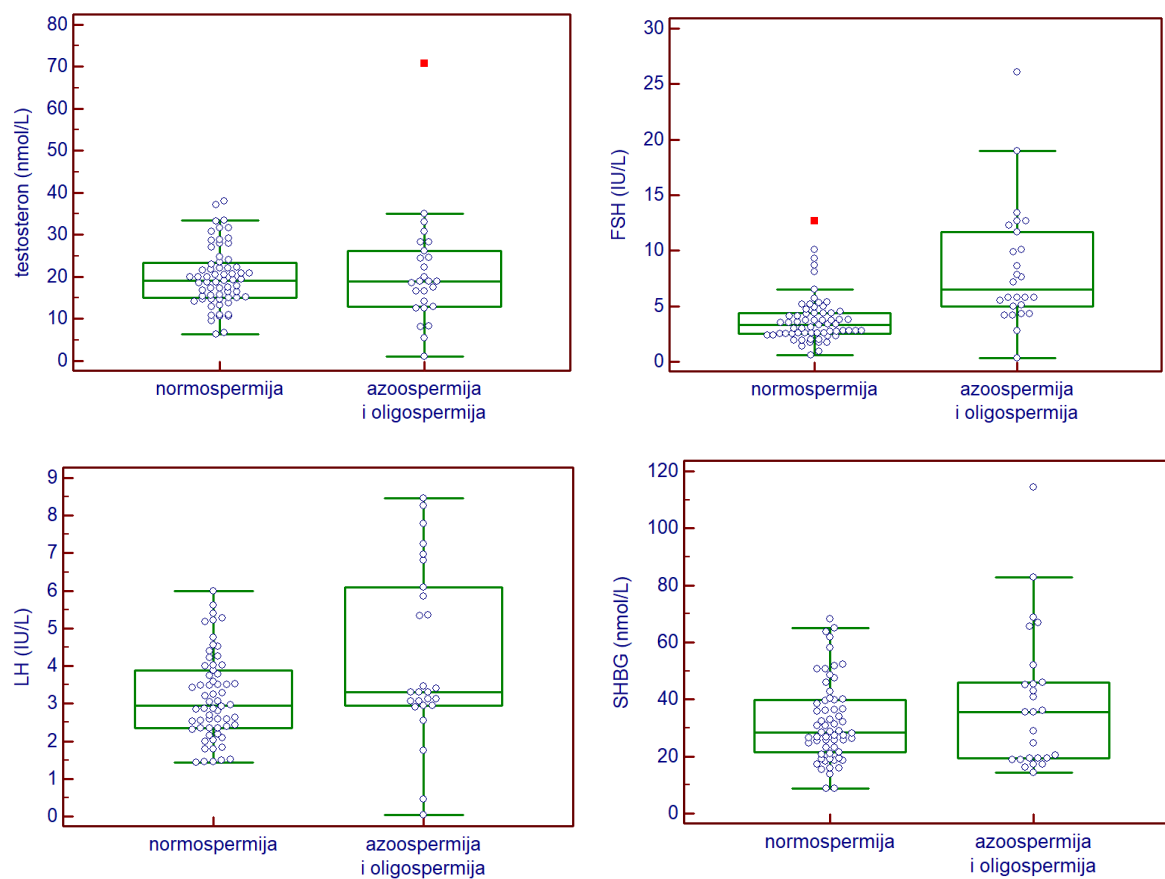
Tablica 1. Demografski i klinički parametri ispitanika

	Ispitanici s azospermijom i oligospermijom N = 26	Ispitanici s normospermijom N = 64	P- vrijednost
Dob (\bar{x}^* , raspon)	32 (18-46)	33 (19-47)	0,820 [§]
Koncentracija spermija ($\times 10^6/\text{mL}$) (medijan, IQ [‡])	1,5 (0-7)	76,5 (32-134)	<0,001 ^l
Testosteron u serumu (pmol/L) (\bar{x}^* , SD [†])	20,9 (13,2)	19,9 (7,1)	0,706 [§]
FSH u serumu (pmol/L) (\bar{x}^* , SD [†])	8,3 (5,4)	3,7 (2,1)	<0,001 [§]
LH u serumu (pmol/L) (\bar{x}^* , SD [†])	4,2 (2,3)	3,1 (1,1)	0,027 [§]
SHBG u serumu (pmol/L) (\bar{x}^* , SD [†])	39 (24,4)	32,1 (14,1)	0,193 [§]

*aritmetička sredina; †standardna devijacija; ‡interkvartilni raspon; § t-test; ^lMann-Whitney test

Vrijednosti koncentracija FSH-a i LH-a u serumu bile su više u skupini ispitanika s azospermijom i oligospermijom (slika 1).

REZULTATI



Slika 1. Usporedba koncentracija testosterona, FSH-a, LH-a i SHBG-a u serumu (četverokut označuje standardnu devijaciju, a njegova središnja linija aritmetičku sredinu, minimalna i maksimalna vrijednost prikazane su vodoravnim linijama, stršuća vrijednost kružićem, a ekstremne vrijednosti kvadratićima).

REZULTATI

Tablica 2. Povezanost parametara spermiograma s koncentracijom hormona reprodukcije

		Testosteron	FSH	LH
Koncentracija spermija	Rho	-0,04	-0,57	-0,32
	P	0,709	< 0,001	0,003
Volumen sjemene tekućine	Rho	0,20	0,13	0,19
	P	0,055	0,224	0,079
Vitalnost spermija	Rho	-0,005	-0,43	-0,25
	P	0,962	< 0,001	0,018
Normalni oblici spermija	Rho	-0,04	-0,50	-0,28
	P	0,712	< 0,001	0,008
Motilitet spermija	Rho	-0,01	-0,43	-0,26
	P	0,908	< 0,001	0,015

Ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije nađeno je da između koncentracije spermija u sjemenjnoj tekućini i koncentracije FSH-a u serumu postoji obrnuta i umjerena povezanost. Koncentracija LH-a u serumu ispitivanjem koeficijenta korelacije pokazuje obrnutu i slabu povezanost s koncentracijom spermija u sjemenjnoj tekućini. Između parametara spermiograma kao što su: normalni oblici i motilitet spermija te koncentracije FSH-a i LH-a u serumu postoji obrnuta i slaba povezanost. Između vrijednosti FSH-a u serumu te vitalnosti spermija u sjemenjnoj tekućini postoji obrnuta i slaba povezanost.

5. RASPRAVA

Hormonska kontrola proizvodnje sperme uključuje hipotalamus, prednji režanj hipofize i testise (3). Androgeni proizvedeni od testisa i nadbubrežne žlijezde igraju ključnu ulogu u razvoju muških reproduktivnih organa, važni su u pubertetu, muškoj spolnoj funkciji i muškoj plodnosti (7). Poremećaji u androgenim receptorima mogu rezultirati nenormalnim muškim seksualnim razvojem, ali mogu biti i potencijalni uzrok muške neplodnosti.

U procjeni muške neplodnosti izuzetno je važno razmatranje razina reproduktivnih hormona (3). Poznato je da su odnosi koncentracije hormona i parametri funkcija testisa prilično promjenjivi te da se nenormalna spermatogeneza često javlja istovremeno s endokrinim abnormalnostima (10). FSH, LH i testosteron su glavni regulatori razvoja zametnih stanica, a kvantitativna proizvodnja spermatozoida općenito zahtijeva prisustvo navedenih hormona. FSH djeluje izravno na sjemene tubule dok LH potiče spermatogenezu neizravno putem testosterona (10). Nemogućnost hipofize da izluči FSH i LH će rezultirati poremećajem funkcije testisa što vodi k neplodnosti. Steroidni hormoni poput testosterona potrebni su za razvoj i održavanje sekundarnih spolnih karakteristika, kao i za pokretanje i održavanje spermatogeneze. Visoka intratestikularna razina testosterona je apsolutni preduvjet za proizvodnju i funkciju sperme.

Ovo je istraživanje provedeno u 90 muških ispitanika prosječne dobi 33 godine koji su prema koncentraciji spermija bili podijeljeni u dvije skupine: ispitanike s normospermijom i ispitanike s oligospermijom i azospermijom.

Istraživanjem su utvrđene povišene koncentracije hormona adenohipofize FSH-a i LH-a u ispitanika s oligospermijom i azospermijom. Međutim, ne postoji značajna razlika u prosječnoj koncentraciji testosterona ($P=0,706$) između navedenih skupina. Time su potvrđeni rezultati sličnih istraživanja koja pokazuju kako veće koncentracije serumskih razina FSH-a i LH-a imaju ulogu stimulirati Sertolijeve i Leydigove stanice za proporcionalnu sintezu i lučenje testosterona i prema tome pojačavanja spermatogeneze (10,12). Primjerice, Babu i suradnici (13) su dokazali da veća koncentracija FSH-a u serumu povećava ozbiljnost uništavanja sjemenog epitela. S obzirom na ulogu hormona FSH-a i LH-a koji se vežu na receptore u testisima i pokreću kaskadu događaja važnih za stvaranje i sazrijevanje spermija, takav je rezultat u skladu s očekivanjem. Zainab i suradnici (10) su u svome radu zaključili da porastom dobi, pad u serumskim razinama testosterona i porast gonadotropina znači smanjenje produkcije sperme i broja normalnih spermija. Shodno tome porast razine FSH-a u

RASPRAVA

azoospermiji, može odražavati smanjenu aktivnost testisa što rezultira promjenom u mehanizmu povratne sprege između testisa i hipofize, oštećenjem Sertolijevih stanica i smanjenom sekrecijom inhibina. Primarna uloga LH-a kod muškaraca je proizvodnja testosterona na poticaj Leydigovih stanica. Dobiveni rezultati ovog istraživanja ne slažu se s rezultatima istraživanja Dalea i suradnika (14) koji su zaključili da većina neplodnih muškaraca s poremećajima u sjemenim tubulima nema prepoznatljivu endokrinopatiju te imaju normalnu razinu LH-a, FSH-a i testosterona u serumu.

Prethodne studije (10,13,14) objavile su da su razine cirkulirajućih reproduktivnih hormona u muškaraca povezane s parametrima kvalitete sjemena. U pogledu koncentracije sjemena u sjemenoj tekućini, testosteron i LH ne pokazuju statistički značajnu korelaciju dok FSH pokazuje obrnutu i umjerenu povezanost. Povećanjem vrijednosti FSH-a u serumu smanjuje se koncentracija spermija u sjemenoj tekućini. Anawalt u svom istraživanju navodi da ukoliko je koncentracija spermija u sjemenoj tekućini snižena ili spermija uopće nema, a serumski gonadotropini su povišeni (s razinama FSH-a >LH-a), pacijenta treba procijeniti zbog mogućeg uzroka primarnog hipogonadizma (5). FSH, iako slabo, korelira i s ostalim parametrima spermograma, kao što su vitalnost spermija, normalni oblici spermija te motilitet. Time je pokazana dijagnostička važnost određivanja hormona kao što je FSH u procjeni muške neplodnosti.

Svaki postupak koji utječe na proizvodnju i kvalitetu sperme potencijalno je štetan za mušku plodnost. Jedan od uzročnika muške neplodnosti su i varikokele koje su zastupljene u 2-22% odrasle muške populacije. Poznato je da muškarci s varikokelama i abnormalnom sjemenom tekućinom imaju niže koncentracije testosterona u serumu (9). Hipogonadizam je još jedan od uzročnika neplodnosti. Snižene koncentracije testosterona u serumu, zajedno s povišenim razinama FSH-a i LH-a mogu upućivati na primarni hipogonadizam. Pretilost također može pridonijeti hipogonadizmu i muškoj neplodnosti (5). Promjene u načinu života doprinose ukupnoj kvaliteti življenja te shodno tome i rješavanju problema neplodnosti.

Ograničavajući faktori ovog istraživanja jesu mali broj ispitanika uključenih u istraživanje te nedostatak informacija o uzrocima koji su uzrokovali oligospermiju i azoospermiju. S druge strane, rezultati rada dobivaju na važnosti jer je relativno mali broj istraživanja te vrste provedenih u Hrvatskoj. Sva dostupna relevantna istraživanja posljednjih nekoliko godina provedena su na uzorcima stanovništva azijskih zemalja. Pri razmatranju dobivenih rezultata treba uzeti u obzir činjenicu da u ispitivanoj populaciji nisu isključeni pacijenti s kroničnim bolestima, pušači, ispitanici koji konzumiraju alkohol te oni koji koriste lijekove koji bi

RASPRAVA

eventualno mogli utjecati na kvalitetu sjemene tekućine. Nadalje, prethodnim je istraživanjima pokazano da visok indeks tjelesne težine može utjecati na broj, koncentraciju i morfologiju spermija (11) 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 pokazana dijagnostička važnost određivanja spolnih hormona adenohipofize u procjeni muške neplodnosti. Pokazano je da padom koncentracije i smanjenjem broja spermija u sjemenu rastu vrijednosti FSH-a i LH-a u serumu. Može li dodatno određivanje hormona kao što su progesteron, estrogen ili prolaktin povećati dijagnostičku vrijednost gonadotropina u procjeni muškog faktora neplodnosti, prognozu ishoda potpomognute oplodnje ili vjerojatnost pronalaženja sperme pomoću testikularne ekstrakcije spermatozoida (TESE), ostaje tek odrediti. Nedavno je dokazano da smanjeni omjer testosterona/estrogena i povećani estrogen mogu biti dobri pokazatelji specifičnog predviđanja azoospermije, posebno u onih s opstrukcijom sjemenovoda (7). Također bi uključivanje dodatnih parametara zajedno sa spolnim hormonima 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. azospermija i oligospermija u ovom se istraživanju pojavljuju s podjednakom učestalošću kao u sličnim istraživanjima objavljenima u posljednjih nekoliko godina,
2. vrijednosti koncentracije hormona FSH-a i LH-a u serumu bile su više u skupini ispitanika s oligospermijom i azospermijom što upućuje na to da određivanje spolnih hormona ima dijagnostičku vrijednost prilikom procjene muške neplodnosti,
3. ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije nađeno je da između koncentracije spermija u sjemenoj tekućini i koncentracije FSH-a u serumu postoji obrnuta i umjerena povezanost. Koncentracija LH-a u serumu pokazuje obrnutu i slabu povezanost s koncentracijom spermija u sjemenoj tekućini. Između parametara spermograma kao što su normalni oblici i motilitet spermija te koncentracije FSH-a i LH-a u serumu postoji obrnuta i slaba povezanost. Između vrijednosti FSH-a u serumu te vitalnosti spermija u sjemenoj tekućini postoji obrnuta i slaba povezanost.

Socijalni fenomen odgađanja rađanja i svakodnevni stres kakav donosi život u velikim sredinama sve češće dovode do pojave bračne neplodnosti. 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, nužno je buduća istraživanja usmjeriti prema tome. Može se reći da se ovim istraživanjem dokazalo da određivanje serumskih razina spolnih hormona FSH-a i LH-a može biti korisno za dobivanje informacija o spermatogenezi u neplodnih muškaraca. Vrijednosti koncentracija hormona bile su više u skupini ispitanika s azospermijom i oligospermijom.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je ispitati razinu spolnih hormona kod neplodnih muškaraca.

Ispitanici i metode

U istraživanje je bilo uključeno 90 muških ispitanika: 13 ispitanika s azospermijom, 13 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. Testosteron, FSH, LH i SHBG u serumu su izmjereni kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom (CMIA) na imunokemijskom analizatoru ARCHITECT i1000SR (Abbott Diagnostics, Lake Forest, USA). Rezultati su obrađeni statističkim programom MedCalc verzija 12.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Rezultati

Prosječne vrijednosti FSH-a u serumu bile su više u ispitanika s oligospermijom i azospermijom (8,3 prema 3,7 pmol/L, $P < 0,001$) u usporedbi s ispitanicima s normospermijom. Vrijednosti LH-a u serumu bile su više u ispitanika s oligospermijom i azospermijom (4,2 prema 3,1 pmol/L, $P = 0,027$) u usporedbi s ispitanicima s normospermijom. Ispitivanjem Spearmanova koeficijenta korelacije utvrđeno je da između vrijednosti FSH-a i LH-a u serumu i parametara spermograma postoji korelacija.

Zaključak

Određivanje spolnih hormona, kao što su FSH i LH može biti korisno za dobivanje informacija o spermatogenezi u neplodnih muškaraca.

Ključne riječi : neplodnost, oligospermija, azospermija, FSH, LH

8. SUMMARY

The role of sex hormones in male infertility

Objective: The aim of the study was examine the level of sex hormones in infertile men.

Materials and Methods: The study included 90 male subjects: 13 subjects with azoospermia, 13 subjects with oligospermia and 64 subjects with normospermia. The study used blood samples and remaining samples of semen fluid of 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. Testosterone, FSH, LH and SHBG in serum were measured by chemiluminescence immunochemical method (CMIA) on the ARCHITECT i1000SR immunochemical analyzer (Abbott Diagnostics, Lake Forest, USA). The results were processed using the statistical software MedCalc version 12.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results: Average values of FSH in serum were higher among subjects with oligospermia and azoospermia (8,3 vs 3,7 pmol/L, $P < 0,001$) compared with subjects with normospermia. Values of LH in serum were higher among subjects with oligospermia and azoospermia (4,2 vs 3,1 pmol/L, $P = 0,027$) compared with subjects with normospermia. Examination of Spearman's correlation coefficient determined that there is a correlation between the values of FSH and LH in serum and the parameters of spermiogramme.

Conclusion: Determination of sex hormones such as FSH and LH may be useful for obtaining information on spermatogenesis in infertile men.

Key words: infertility, oligospermia, azoospermia, FSH, LH

9. LITERATURA

1. Kashanian J, Brannigan R. Male Infertility. American Urology Association. 2015 May; 313(17).
2. Barratt C, Bjorndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance- challenges and future research opportunities. Human Reproduction Update. 2017;23(6):660-680.
3. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. Clinics. 2011;66(4):691-700.
4. Sabetian S, Ardekani AM, Hodjat M, Akhondi MM, Soltanghorae M, 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.
5. Anawalt BD. Approach to Male Infertility and Induction of Spermatogenesis. The Endocrine Society. 2013 September;98(9):3532-3542.
6. Majzoub A, Sabanegh E. Testosterone replacement in the infertile man. Translation Andrology and Urology. 2016;5(6):859-865.
7. Ring J, Lwin A, Köhler T. Current medical management of endocrine-related male infertility. Asian Journal of Andrology. 2016;18:357-363.
8. 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.
9. Al-Daghistani HI, Hamad A, Abdel-Dayem M, Al-Swaifi M, Abu-Zaid M. Evaluation of serum Testosterone, Progesterone, Seminal Antisperm Antibody, and Fructose Levels among Jordanian Males with a History of Infertility. Asian Journal of Andrology. 2010.
10. Zainab KI, Lubna A. AL-Anbari, Hayder AL. Relationship of FSH, LH, DHEA and Testosterone Levels in Serum with Sperm Function Parameters in Infertile Men. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2017;9(11):2056-2061.

LITERATURA

11. Andersen JM, Herning H, Aschim EL, Hjelmsaeth J, Mala T, Hanevik HI, et al. Body Mass Index Is Associated with Impaired Semen Characteristics and Reduces Levels of Anti-Müllerian Hormone across a Wide Weight Range. *PloS ONE*. 2015 June;10(6):1-12.
12. Samal S, Dhadwe K, Gupta U, et al. Epidemiological study of male infertility. *Indian Medical Gazette*. 2012.
13. Babu SR, Sadhnani MD, Swarna M, Padmavathi P, Reddy PP. Evaluation of FSH, LH, and Testosterone levels in different subgroup of infertile males. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2014; 19(1):45-49.
14. McClure RD. *Endocrinology of Male Infertility*, From: *Contemporary Endocrinology: Office Andrology* Edited by: P. E. Patton and D. E. Battaglia. Humana Press Inc., Totowa.

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 medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017.-2019. – Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku