

Značenje koncentracije cinka u sjemenoj tekućini kod muškaraca s dijagnozom neplodnosti

Kuić-Vadlja, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:444036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Vesna Kuić - Vadjla

**ZNAČENJE KONCENTRACIJE CINKA
U SJEMENOJ TEKUĆINI KOD
MUŠKARACA S DIJAGNOZOM
NEPLODNOSTI**

Diplomski rad

Osijek, 2015

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Vesna Kuić - Vadjla

**ZNAČENJE KONCENTRACIJE CINKA
U SJEMENOJ TEKUĆINI KOD
MUŠKARACA S DIJAGNOZOM
NEPLODNOSTI**

Diplomski rad

Osijek, 2015

Rad je ostvaren u Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek

Mentor rada:

doc. dr. sc. Andrea Milostić - Srb

Rad ima 30 stranica, 4 tablice i 6 slika.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Neplodnost	1
1.1.1. Muška neplodnost	1
1.2. Analiza sjemene tekućine (spermogram)	2
1.2.1. Sjeme (sperma).....	2
1.2.2. Spermatogeneza	3
1.2.3. Građa zrelog spermija	4
1.3. Cink	5
1.3.1. Cink u sjemenjnoj tekućini.....	6
1.3.1.1. Cink kao antioksidans	6
2. CILJ	8
3. ISPITANICI I METODE	9
3.1. Ispitanici	9
3.1.1. Prikupljanje uzoraka.....	9
3.2. Ustroj studije	9
3.3. Metode.....	10
3.3.1. Određivanje cinka	10
3.3.2. Određivanje broja spermija	11
3.3.3. Procjena pokretljivosti spermija.....	12
3.3.4. Morfologija spermija.....	13
3.3.5. Korištene statističke metode za obradu dobivenih rezultata	15
4. REZULTATI.....	16
5. RASPRAVA.....	19
6. ZAKLJUČAK	22
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY	24

9. LITERATURA.....	26
10. ŽIVOTOPIS	30

1.UVOD

1.1. Neplodnost

Neplodnost je ozbiljan globalni medicinski i socijalni problem. Demografski podatci koje je objavila Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) ukazuju na zamjetno povećanje stope neplodnosti u razvijenim zemljama svijeta (u posljednjih 30 godina učestalost je neplodnosti porasla za 5 %). Prema SZO-u neplodnost se definira kao nemogućnost spontanog ostvarivanja trudnoće tijekom jedne godine uz normalne spolne odnose, bez uporabe kontraceptiva (1).

Smatra se da u zapadnom svijetu 15 % parova ne uspijeva ostvariti trudnoću u godini dana, (48,5 milijuna parova), a da je približno 50 % slučajeva posljedica muške neplodnosti, samostalno u 20 % slučajeva, a zajedno sa ženskim čimbenikom u 30 – 40 % slučajeva.

Kako je neplodnost u nas i na Zapadu u porastu, postala je važan čimbenik u demografskoj tranziciji i neravnoteži. Umanjena plodnost (fertilnost) postaje važan uzrok depopulacije i jedan od vodećih javnozdravstvenih problema s kojim se susreće sve više parova (2).

1.1.1. Muška neplodnost

Brojni rizični čimbenici i stanja predisponiraju nastanku neplodnosti kod muškaraca te dovode do širokog skupa poremećaja koji kompromitiraju oplodnju jajne stanice i u konačnici ostvarivanje trudnoće. Neki od poremećaja su reverzibilni (npr. varikokela, koja se smatra odgovornom za 25 – 40 % slučajeva neplodnosti), a upravo je cilj prepoznati i liječiti takva stanja (3). Poznavanjem etiologije i uvođenjem novih dijagnostičkih metoda u području spolne medicine postalo je jasno da su čimbenici poput stresnog načina života, pušenja, alkoholizma, pretilosti, pretjerane fizičke aktivnosti, izloženosti toksinima, zračenju, pretjeranoj toplini, samo neki od znanstveno dokazanih uzroka. U 20 – 30 % slučajeva je nemoguće utvrditi etiologiju te se takva neplodnost proglašava idiopatskom. (4).

Muška se neplodnost može opisati (s obzirom na njenu učestalost i važnost) kao drugi entitet po učestalosti s kojim se susreće urolog u androloškoj ambulanti. Pri procjeni muške neplodnosti, liječnik mora imati potpunu medicinsku i reproduktivnu povijest i barem dvije analize spermograma.

1.2. Analiza sjemene tekućine (spermogram)

Spermogram je jedan od prvih postupaka koji se provodi kod sumnje na mušku neplodnost i može otkriti brojne poremećaje kao što je nepostojanje spermija (azoospermija), smanjen broj spermija (oligozoospermija), smanjena pokretljivost spermija (astenozoospermija) ili poremećaje morfologije (teratozoospermija). Ti se poremećaji mogu pojaviti zajedno i tada ih nazivamo oligo-asteno-teratozoospermija (OAT - sindrom).

Budući da je postupak jednostavan i neinvazivan, a informacije nužne za početnu dijagnostiku, brzo se dobivaju. Spermogram danas predstavlja rutinski postupak u procjeni plodnosti muškog partnera.

Analiza sjemene tekućine radi se prema standardima koji je još 1951. godine utvrdila Američka udruga za plodnost (American Fertility Association, AFA) (5), Freund 1966. g. (6), Eliasson 1971. god. (7) te SZO (1).

Najvažnija je uloga spermija je oplodnja jajne stanice. Normalna morfologija i pokretljivost spermija te niz funkcionalnih i biokemijskih promjena samo su neki od kriterija koji trebaju biti zadovoljeni da bi oplodnja bila uspješna. Spermij mora završiti proces funkcionalnog sazrijevanja (kapacitaciju), akrosomsku reakciju i nuklearnu dekonenzaciju. Mora imati sposobnost penetracije kroz cervikalni sluzni čep, *zonu pellucidu* i *vitellina membranu* te se vezati za jajnu stanicu.

Analizu sjemena ne čini samo broj spermija, njihova pokretljivosti i procjena morfoloških nepravilnosti, već i određivanje fizikalnih svojstava sjemene tekućine, određivanje biokemijskog sastava (fruktoza, kisela fosfataza, limunska kiselina, cink, itd.), mikrobiološke analize, određivanje spermalnih antitijela te raznih funkcionalnih i bioloških markera reproduktivnog zdravlja i plodnosti. (8).

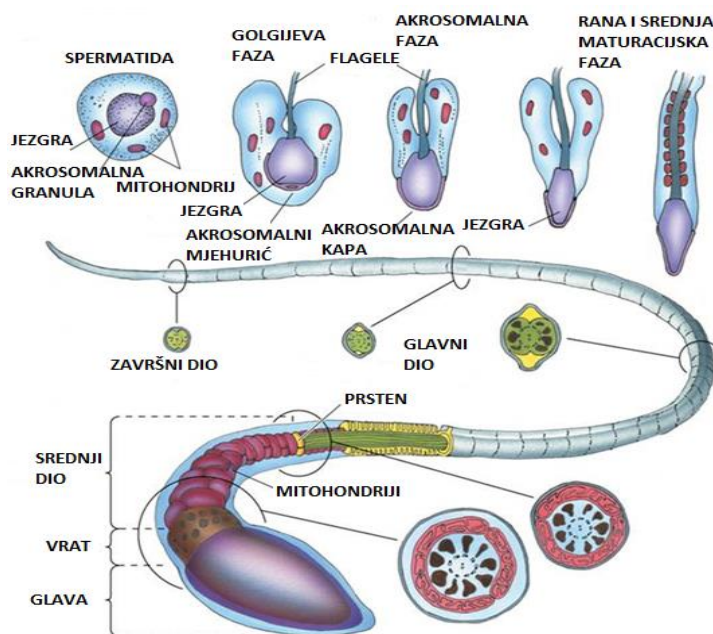
1.2.1. Sjeme (sperma)

Tijekom ejakulacije, sperma nastaje od koncentrirane suspenzije spermija pomiješane i razrijeđene sa sekretima svih pomoćnih žlijezda, uglavnom prostate (13 – 33 %) i sjemenih mjehurića (46 – 80 %) te manjom količinom sekreta iz bulbouretralnih žlijezda (2 – 5 %), testisa i epididimisa (5 %). Pokretljivost, građa i koncentracija spermija te sastav sjemene tekućine iznimno su bitni za funkciju spermija (1).

1.2.2. Spermatogeneza

Spermatogeneza je potaknuta stimulacijskim djelovanjem gonadotropnih hormona adenohipofize i jedan je od najproduktivnijih samoobnavljajućih procesa diferencijacije čiji je konačni rezultat zreli spermij. Počinje u dobi od 13 godina, a nastavlja se do kraja života (9). Trajanje ciklusa spermatogeneze je 69 - 80 dana, prosječno 74 dana (10). Započinje s primitivnom spolnom stanicom, spermatogonijom i dijeli se u više faza.

- **Spermatocitogeneza:** spermatogonalne zametne stanice proliferiraju i diferenciraju se u diploidne spermatogonije i primarne spermatocite (najveće stanice spermatogenetske loze).
- **Mejoza I:** iz diploidnih primarnih spermatocita nastaju sekundarne haploidne spermatocite.
- **Mejoza II:** diobom svake sekundarne spermatocite nastaju dvije spermatide (jedna od najkritičnijih faza dnevnog masovnog gubitka spermija (od 50 %) (9).
- **Spermiogeneza:** nastale jednostavne spermatide prolaze proces složene fiziološke, biokemijske i citomorfološke diferencijacije i pretvaraju se u visoko diferencirane spermije. Proces traje 22 dana (Slika 1).



Slika 1. Prikaz Golgijeve, akrosomalne i maturacijske faze tijekom diferencijacije spermija u spermiogenezi (Izvor: <http://www.austincc.edu/apreview/NursingPics/ReproPics/Picture11.jpg>, pristup: 17.05.2015.)

Tijekom spermiogeneze nastaje akrosom, izdužuje se jezgra, gubi se najveći dio citoplazme, razvija se rep. Nastaje zreli spermij koji se sastoji od glave, vrata i repa.

1.2.3. Građa zrelog spermija (Slika 1)

- **Glava:**

Glava spermija sadrži jezgru s vrlo zgusnutim kromatinom (haploidni broj kromosoma) i akrosom, (izvedenicu Golgijeva aparata koji pokriva prednje 2/3 jezgre), sadrži hijaluronidazu, akrozin i lizosomske enzime (oslobađaju se za vrijeme akrosomske reakcije na početku oplodnje) (11).

- **Vrat:**

Vrat spermija je vrlo kratak i sadrži dva centriola od kojih distalni služi kao bazalno tjelešće za aksonemu te proksimalni koji ostaje u kasnijim stadijima i sudjeluje u prvoj mitotičkoj podjeli zigote (12).

- **Rep:**

Rep spermija čini središnji skelet koji je sastavljen od 11 mikrotubula (aksonema), tanke stanične membrane (obavija aksonemu) i nakupine mitohondrija (oko aksoneme) u proksimalnom dijelu repa (tijelo repa) (8).

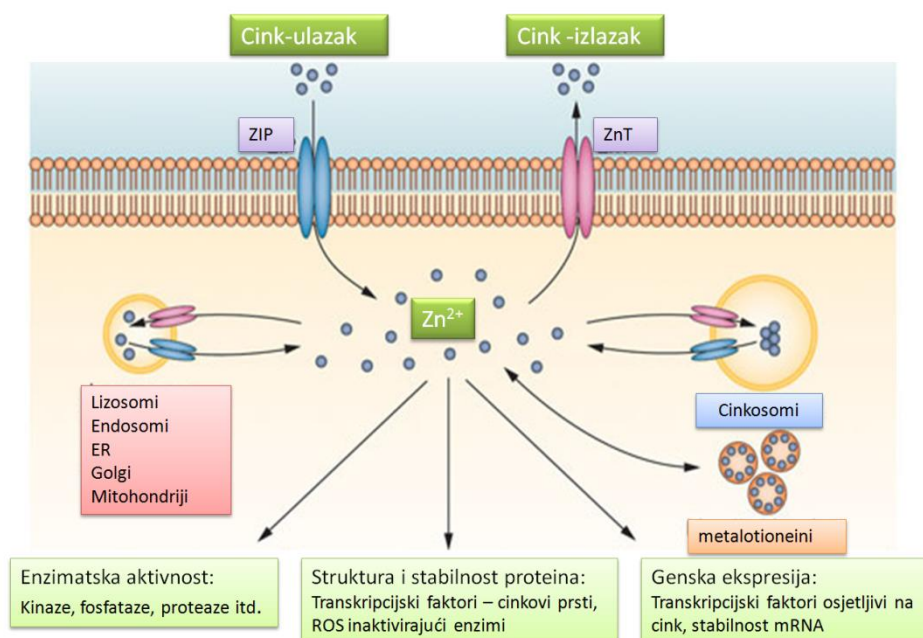
Složen proces nastajanja spermija može biti prekinut u svakom trenutku i tada dolazi do nemogućnosti stvaranja spermija ili nemogućnosti stvaranja dovoljno dobrih spermija što je glavni uzrok muške neplodnosti. Ipak, podatci dobiveni uobičajenim metodama analize humanog ejakulata mogu dosta reći o kvaliteti spermatogenetskih procesa koji odlučuju hoće li nastati funkcionalan spermij sposoban za oplodnju. Kvaliteta sjemeni varira kvalitativno i kvantitativno, a ovisi o dobi, bolesti, seksualnoj aktivnosti, prehrani, čimbenicima okoliša, a mnoga istraživanja ukazuju na važnost biokemijskih parametara u sjemenjnoj tekućini. Mikroelementi predstavljaju veliku skupinu biološki važnih elemenata u tragovima, koji su kritični za održavanje odgovarajuće funkcije vezane uz pokretljivost, građu i broj spermija (13).

Jedna je od rutinskih analiza u Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek, određivanje koncentracije cinka u sjemenjnoj tekućini. Brojna istraživanja ukazuju da cink, kao

antioksidans, ima važnu ulogu u fiziološkim funkcijama spermija i da njegove smanjene razine rezultiraju slabijom kvalitetom sjemene tekućine te na taj način umanjuju naknadnu šansu za oplodnju (14).

1.3.Cink

Cink je esencijalan oligoelement, drugi po važnosti mineral u tragovima u tijelu, odmah iza željeza. U prirodi se nalazi u obliku brojnih spojeva, a u svojim spojevima postoji samo u jednom oksidacijskom stanju, kao Zn^{2+} te se kao takav može vezati na različite vrste molekula. Potreban je za djelovanje više od 300 metaloenzima, preko 500 proteina regulatora gena te ima vodeću ulogu u omogućavanju ispravnog djelovanja različitih tkiva, organa i cijelog organskog sustava (Slika 2). Uključen je u enzimске reakcije na molekularnoj razini. Utječe na regulaciju sinteze proteina, aktivira DNA (eng. *Deoxyribonucleic acid*) i RNA (eng. *Ribonucleic acid*) polimerazu i adenil-ciklazu pa je potreban i za samu transkripciju. Cink kontrolira integritet membrana kao stabilizator i inhibitor. Nadalje, cink je u sastavu brojnih metaloenzima koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina, kao i u sintezi i katabolizmu aminokiselina. Cink je važan mikronutrijent koji sudjeluje u stvaranju tzv. antioksidativnih enzima, nužnih za zaštitu stanica. (15, 16).



Slika 2. Shematski prikaz uloge cinka u organizmu

(Izvor: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490606003279>; Pristup 18.06.2015)

1.3.1. Cink u sjemenoj tekućini

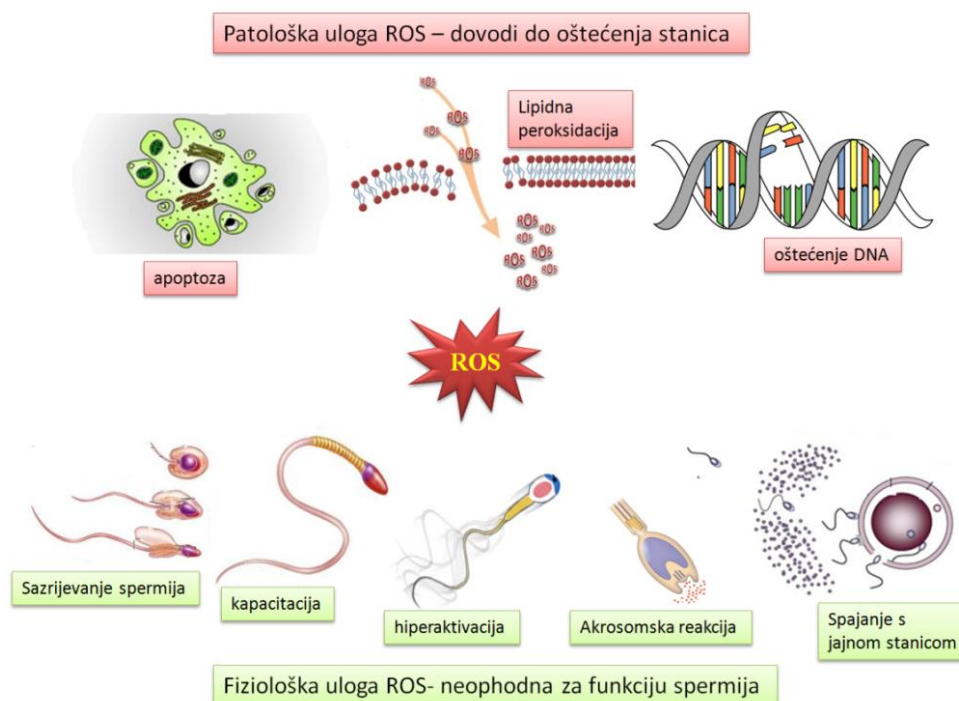
U ljudskom je tijelu količina cinka relativno konstantna i iznosi 24 % svih elemenata u tragovima. S obzirom na njegovu fiziološku funkciju, taj se postotak vrlo razlikuje od organa do organa. Cinka ima najviše u prostati (i do 100 puta više nego u krvi) te je ravnomjerno raspoređen u bubrezima, jetri, mišićima i srcu, dok u nekim tjelesnim tekućinama njegova koncentracija može biti vrlo varijabilna (17). U krvnoj se plazmi cink ponajviše prenosi vezan za albumin (60 – 70 %) i α_2 -makroglobulin (30 – 40 %) i manjim djelom za transferin. Iako se cink često naziva mikroelementom, on zasigurno nije element u tragovima iz perspektive stanice. Na staničnoj razini, 30 – 40 % cinka je lokalizirano u jezgri, 50 % u citoplazmi, a ostatak je povezan s membranama (17). Značajnost i uloga cinka u sjemenoj tekućini opisana je još 1950. god. (18), a s obzirom na brojnost njegovih fizioloških funkcija, njegov nedostatak dovodi do brojnih simptoma koji ovise o težini nedostatka i drugim povezanim čimbenicima pa tako niska razina cinka u sjemenoj tekućini utječe na kvalitetu sjemena i mušku neplodnost na više načina.

1.3.1.1. Cink kao antioksidans

Uloga cinka kao pripadnika antioksidacijskog enzimskog sustava opažena je već 1990-ih. Cink ima antioksidativna svojstva kroz različite mehanizme uključujući sulfhidrilnu zaštitu od oksidacije, indukciju metalotioneina proteina bogatog cisteinom sa sposobnošću vezivanja iona metala i vezivanja redoks aktivnih metala. Metalotioneini su glavni regulatori bioraspoloživosti iona metala, u prvom redu cinka te posjeduju snažno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (19). Cink se, također, nalazi kao sastavni dio unutarstaničnog i izvanstaničnog antioksidativnog enzima Cu/Zn superoksid dismutaze (SOD). SOD pripada "prvoj liniji obrane" enzimatskoga zaštitnog sustava jer katalizira uklanjanje superoksidnog radikala, prvog produkta jednovalentne redukcije molekule kisika, ujedno i izvora spojeva reaktivnijih od njega samog (20).

Poznato je da ljudski spermiji stvaraju reaktivne kisikove spojeve (eng *Reactive oxygen species* – ROS) u fiziološkim vrijednostima potrebnih za kapacitaciju, antibakterijsku obranu, staničnu signalizaciju i diferencijaciju, međutim, kada se prekomjerna količina ROS-a proizvodi izvan antioksidativnog kapaciteta sjemene tekućine i muškog reproduktivnog trakta, rezultat je često oksidativni stres i oštećenje DNA funkcije. (21, 22).

Spermiji su iznimno osjetljivi na oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom, zbog velike količine nezasićenih masnih kiselina u membrani koje su podložne oksidaciji. Te nezasićene masne kiseline daju fluidnost koja je neophodna za kapacitaciju, akrosomsku reakciju i intrakciju spermij/oocita. Međutim, nezasićena priroda tih molekula stvara predispoziciju za slobodne radikale i tijekom lipidne peroksidacije gubi se cjelovitost i integritet membrane spermija što za posljedicu ima inaktivaciju unutarstaničnih enzima, strukturna oštećenja DNA i apoptozu. Lipidna peroksidacija membrane spermija, prikazana na slici 3, smatra se glavnim mehanizmom ROS-induciranog oštećenja sperme koje dovodi do neplodnosti (23).



Slika 3 Shematski prikaz uloge ROS na funkciju spermija

To se u konačnici odražava na karakteristike sjemeni, u smislu smanjenja broja i pokretljivosti spermija i povećanja udjela morfološki promijenjenih spermija, a smanjuje se i sposobnost proboja spermija kroz vanjski omotač jajne stanice te sposobnost oplodnje jajne stanice zbog promjena u spermalnoj DNA (24, 25, 26).

Uloga oksidativnog stresa u muškoj neplodnosti dobila je značajnu znanstvenu podršku te procjena nedostatka cinka može igrati ključnu ulogu u praćenju oštećenja spermija te dalje terapije antioksidansima. Tomu idu u prilog i najnovija znanstvena istraživanja koja pokazuju progresivno opadanje broja spermija, broja pokretnih spermija te morfološki normalnih spermija. Smatra se da je 30 – 80 % slučajeva idiopatske muške neplodnosti uzrokovano ROS-om. (24)

2. CILJ

Relevantna znanstvena istraživanja pokazala su kako većina muškaraca s dijagnozom neplodnosti imaju i deficijenciju cinka u sjemenoj tekućini. Nedostatak cinka utječe na broj, pokretljivost i morfologiju spermija te bi kod njih oralna suplementacija cinkom, kao antioksidansom, mogla pridonijeti poboljšanju sjemenih parametara (27).

Sukladno tomu, ciljevi predloženog istraživanja bili su:

1. Utvrditi demografske osobine pacijenata s normalnim nalazima spermograma i onih s dijagnozom neplodnosti,
2. Utvrditi vrijednosti koncentracija cinka u sjemenoj tekućini u objema skupinama,
3. Utvrditi broj, postotak pokretnih i morfolološki normalnih spermija u objema skupinama,
4. Procijeniti postoje li značajne razlike u koncentracijama cinka u objema skupinama te ukoliko postoje utvrditi kako one djeluju na broj, postotak pokretnih i morfolološki normalnih spermija kod ispitanika.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici su u ovom istraživanju pacijenti s područja Osječko-baranjske županije koji su putem liječničke uputnice, zbog analize spermiograma došli u Klinički bolnički centar Osijek, od 1.9.2014. do 1.6.2015. Uzorci su zaprimljeni i analizirani u rutinskom radu Androloškog i biokemijskog laboratorija Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Za potrebe ovog istraživanja koristili su se demografski podatci ispitanika (dob, mjesto stanovanja) te su utvrđene vrijednosti sjemenih parametara (koncentracija cinka, pokretljivost, morfologija i broj spermija). Za provođenje predloženog istraživanja dobivena je privola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku. U istraživanje je ukupno bilo uključeno 276 ispitanika, 117 s dijagnozom neplodnosti i 159 s normalnim nalazima spermiograma.

Podatci o uzorcima i rezultatima istraživanih parametara dobiveni su iz elektronske baze podataka Odjela za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek. Tijekom promatranog razdoblja uzorci su sjemenske tekućine obrađeni u skladu s kriterijima SZO-a. (1)

3.1.1. Prikupljanje uzoraka

Ispitanici su se usmeno upoznali s načinom predpripreme i davanja uzorka. Uzorci su dobiveni masturbacijom u odgovarajuću posudu, a uzorkovanje se vršilo nakon minimalno četiri dana seksualne apstinencije. Zabilježili su se demografski podatci ispitanika, datum i vrijeme uzorkovanja te vrijeme između uzorkovanja i analize.

3.2. Ustroj studije

Provedeno istraživanje ustrojeno je po načelu *cross-sectional* studije, odnosno kao tipična metoda istraživanja presjeka ili prevalencije (28).

3.3. Metode

3.3.1. Određivanje cinka

Preporučena metoda za određivanje cinka je atomska apsorpcijska spektrofometrija (AAS). U rutinskom radu Odjela za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek, cink se određuje spektrofotometrijskom metodom, direktnom kolorimetrijskom metodom bez deproteinizacije, koja dobro korelira s metodom AAS.

Princip metode

Specifična kompleksirajuća tvar 5-Br-PAPS [(2-5-bromo-2-pyridylaza)-5-(N-propyl-N-sulfo-propylamino) phenol] stvara stabilni obojeni kompleks s cinkom čiji je intenzitet boje na 570 nm pri pH 8,0 i temperaturi 37°C proporcionalan količini cinka u uzorku. Interferencije oligoelemenata kao što su željezo i bakar u uzorku eliminiraju se upotrebom specifičnih reakcijskih uvjeta i maskirajućih agenasa.

Reagensi:

R₁ - Good pufer koncentracije 0,2 mol/L i pH 8,6 sa specifičnim maskirajućim agensom za željezo i bakar i askorbinskom kiselinom kao reducirajućom tvari. Reagensi održavaju stalne pH reakcijske smjese te uklanjaju interferencije drugih metala koji reagiraju s kompleksirajućom tvari.

R₂ - kompleksirajuća tvar 5-Br-PAPS koncentracije 1,1 mmol/L

Svi su reagensi komercijalno dostupni (Sentinel diagnostics REF 17640H) zajedno sa standardom koncentracije 30,6 µmol/L (29)

Postupak

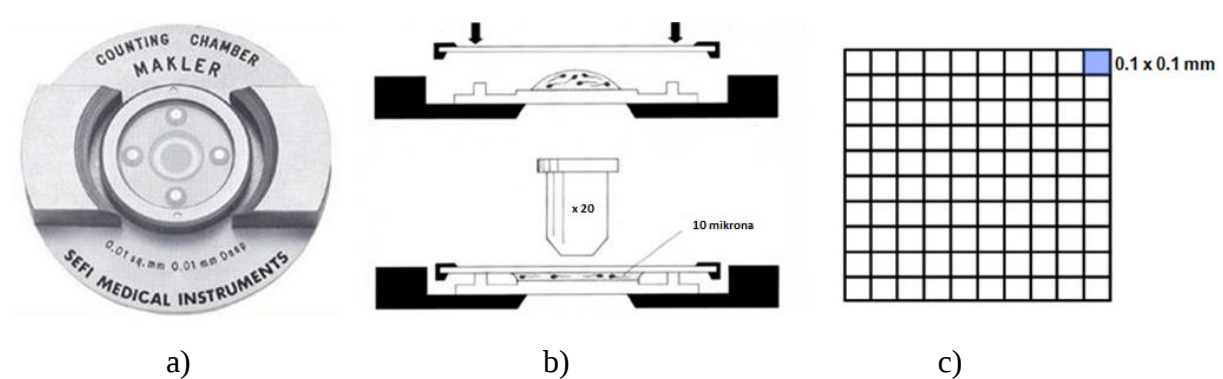
- Sjemena tekućina centrifugirana je 10 minuta na 2000 o/min,
- Supernatant je razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 21 te se odredila koncentracija cinka na automatskom analizatoru OLYMPUS AU 680.

Razina cinka u sjemenu izražava se u mmol/l, a referentni interval je 1,2 – 3,5 mmol/l.

3.3.2. Određivanje broja spermija

Koncentracija spermija predstavlja broj spermija po jedinici volumena i određuje se u Maklerovoj komorici (slika 4) te je najčešće korišten parametar pri dijagnostici muške neplodnosti.

Broj spermija u mililitru manji od $20 \times 10^6/\text{ml}$ (oligozoospermija) ili potpuno odsustvo spermija (azoospermija) ukazuje da je muškarac najčešće neplodan (1).



Slika 4. a) Maklerova komorica, b) Shematski prikaz komorice, c) Mrežica u kojoj se broje spermiji
(Izvor: http://www.sefimedical.com/images/makler_chamber_shema.gif, preuzeto: 11.07.2013)

Maklerova komorica je dubine 10 μm tj., 1/10 dubine uobičajenih hemocitometara što eliminira zamućivanje uzorka i omogućuje slobodno kretanje spermija (slika 10 B). Građena je od dva optički ravna stakla od kojih gornje služi kao pokrovnica na kojoj se nalazi ugravirana mrežica od 1 mm^2 . Mrežica je podijeljena u 100 kvadratića površine 0,1 x 0,1 mm (30). (Slika 4 c)

Postupak:

Mala kapljica dobro promiješanog uzorka staklenim štapićem stavlja se u centar komorice i odmah prekrije pokrovnicom.

Spermiji se broje pod povećanjem od 20 puta, u 10 kvadratića i zbroj predstavlja koncentraciju izraženu u milionima po mililitru sjemeni.

Ukupni broj spermija računa se na cijeli volumen sjemeni, dakle dobivena koncentracija pomnožena s volumenom sjemeni izraženim u mililitrima.

Koncentracija se spermija izražava po mililitru ($\times 10^6/\text{ml}$), a referentne vrijednosti su $> 20 \times 10^6/\text{ml}$.

3.3.3. Procjena pokretljivosti spermija

Pokretljivost spermija odnosi se na postotak pokretnih spermija u uzorku sjemene tekućine, a procjenjuje se u roku od 30, a najkasnije 60 minuta od davanja uzorka kako bi se ograničile štetne posljedice okoliša koji utječe na pokretljivost. Određuje se u nativnom preparatu, svjetlosnom mikroskopijom, pod povećanjem od 400 x.

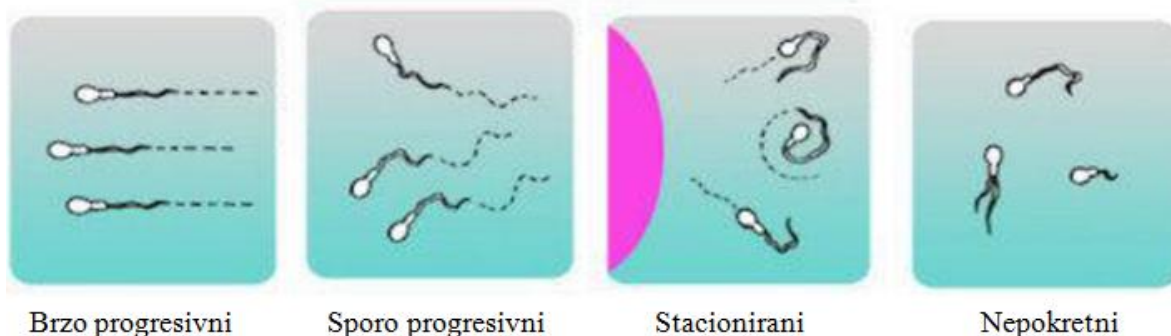
Postupak:

Staklenim štapićem prenese se kap promiješane, nerazrijeđene sjemene tekućine na predmetno stakalce i zatim prekrije pokrovnicom (ostavi se stabilizirati oko 1 min).

Pregledava se 4 do 6 vidnih polja (ovisno o broju spermija). U pojedinom vidnom polju odredi se broj živih spermija i procijeni postotak za svaku pojedinu kategoriju pokretljivosti. Nakon toga ponovi se postupak sa svježom kapi sjemene tekućine, (izdaje se srednja vrijednost između dviju procjena).

Klasifikacija pokretljivosti (%) (Slika 5):

- brzo progresivni - aktivno kretanje, linearno ili u velikim krugovima,
- sporo progresivni - svi oblici pokretljivosti osim aktivnog kretanja (plivanje u malim krugovima, snažne kretnje bičem/glavom ili oboje),
- stacionarni - kretanje u vrlo malim krugovima i ostajanje na istom mjestu,
- nepokretni - bez ikakvih kretnji.



Slika 5. Prikaz pokretljivosti spermija po kategorijama

(Izvor: <http://www.leonsaporta.com/en-male-infertility-physiology-causes.php>; preuzeto: 11.07.2013)

Normalno najmanje 75 % pokretnih spermija pokazuje napredovanje, a ako napredovanje pokazuje manje od 50 %, može se sumnjati na astenozoospermiju (< 50 % progresivnih ili < 25 % brzo progresivnih (tj. a kategorija).

3.3.4. Morfologija spermija

Morfologija spermija određuje se iz preparata obojenog modificiranom metodom po Papanicolu, svjetlosnom mikroskopijom pod uljnom imerzijom i povećanjem 1000 x te dobro korelira s muškim oplodnim potencijalom. Promatra se spermij u cjelini te oblik i veličina glave, vrata i repa, kao i njihov međusobni odnos.

Metoda omogućuje bojanje akrosomalnih i postakrosomalnih dijelova glave, srednjeg dijela i repa te jasno razlikuje bazofilne i acidofilne stanične komponente i omogućuje dobar pregled jezgrinog kromatina. Glave se spermija boje blijedoplavo u akrosomalnom području, a tamnoplavo u postakrosomalnom području. Srednji dijelovi mogu biti crveno obojeni, ali se to smatra abnormalnim samo ako su srednji dijelovi jako napuhnuti ili iregularni. Rep se također boji plavo. Citoplazmatske kapljice, obično smještene iza glave i oko srednjeg dijela, boje se zeleno (Slika 6).

Obrisi svih dijelova spermija moraju biti lako vidljivi.

Postupak:

- kap sjemena razvuče se rubom stakalca preko površine čistog predmetnog stakalca pri čemu se pazi da se ne naprave predebeli razmazi,
- rade se dva razmaza i osuše na zraku,
- razmazi se fiksiraju mješavinom alkohola i etera (omjer 50 : 50 + par kapi octene kiseline),
- vlažan se preparat stavlja u fiksir i stoji najmanje 1 h (može i do 24 h),
- nakon fiksira, razmaz se osuši i boja:
 - A boja – 4 min – ispere se mlazom obične vode,
 - B boja – 2 min – ispere se mlazom obične vode,
 - C boja – 6 min – ispere se mlazom obične vode,
- nakon toga se 2 x ispere 96 % alkoholom i stavi u Xilol 1 - 2 h.

Boje:

A Merck 1.09253.0500 - *Papanicolau's Solution 1a Harris' Hematoxylin Solution*

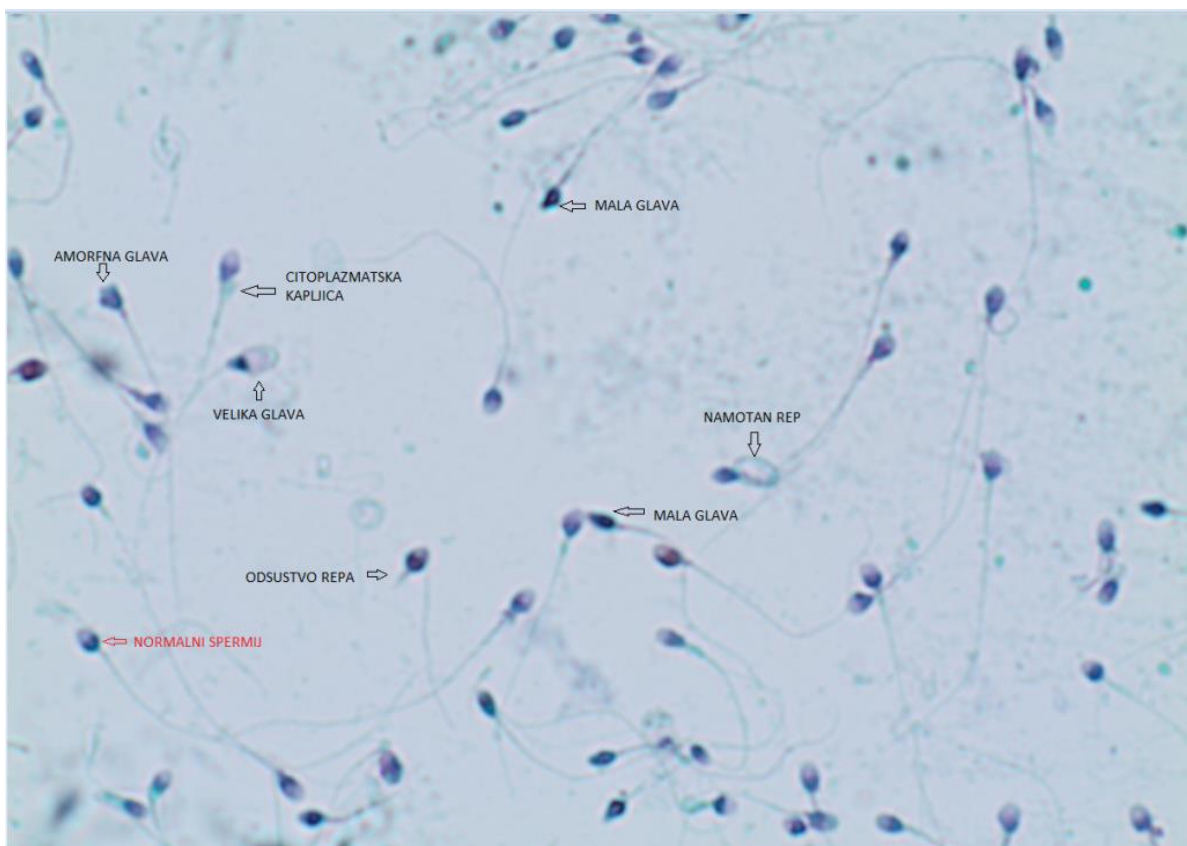
B Merck 1.06888.0500 - *Papanicolau's 2a Orange G Solution (OG6)*

C Merck 1.09272.0500 - *Papanicolau's Solution 3b Polychromatic Solution EA50*

Broji se 100 spermija, a uzimaju se u obzir samo prepoznatljivi spermiji, dok se nezrele stanice spermatogeneze ne broje kao spermiji.

Diferenciraju se sljedeći oblici spermija (Slika 6):

- Promjene u veličini/obliku glave: velike i male glave, plamičaste, amorfne, vakuolizirane i duple glave,
- Promjene na vratu i srednjem dijelu spermija: odsustvo repa, neuklopljenog ili repa u obliku luka te nabreklog/nepravilnog/srednjeg dijela,
- Promjene na repu kao što su kratak rep: u savijen rep, slomljen (pod kutom $> 90^\circ$), namotani rep, dvostruki i rep s kapljicom citoplazme na kraju (veće od jedne trećine područja normalne glave spermija).



Slika 6. Morfološki oblici spermija obojanih modificiranom metodom po Papanicolu (iz arhive OKLD-a)

Patološke promjene mogu se manifestirati pojedinačno na glavi, vratu ili repu, a mogu se pojaviti i kao kombinacija više abnormalnosti.

3.3.5. Korištene statističke metode za obradu dobivenih rezultata

- Za statističku analizu korišten je statistički program SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).
- Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$.

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli u slučaju 3 i više skupina testirana je Kruskal-Wallisovim testom. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je zbog odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). (31)

4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na uzorku od 276 muškaraca, od kojih je 159 (57,6 %) s normalnim nalazima spermograma, a 117 (42,4 %) muškaraca s dijagnozom neplodnosti.

Muškarci s dijagnozom neplodnosti značajno su stariji, srednje dobi 35 godina (interkvartilnog raspona 31 – 38,5 godina) u odnosu na muškarce s normalnim nalazom spermograma (Mann Whitney U test, $p = 0,003$). Broj spermija od 14 (interkvartilnog raspona 5 – 25,5), pokretljivost je od 33 % (interkvartilnog raspona 14,5 – 45) te morfologija od 29 % (interkvartilnog raspona 14,5 – 34) značajno su niži u usporedbi s muškarcima koji imaju normalne nalaze spermograma.

Vrijednosti su cinka (Zn) u sjemenjnoj tekućini također značajno niže kod skupine muškaraca s dijagnozom neplodnosti (Mann Whitney U test, $p < 0,001$) (Tablica 1).

Tablica 1. Srednje vrijednosti dobi ispitanika, broja i pokretljivosti spermija, morfologije i vrijednosti cinka u sjemenjnoj tekućini

	Medijan (interkvartilni raspon)		p*
	Kontrolna skupina	Neplodni muškarci	
Dob ispitanika	32 (30 - 37)	35 (31 - 38,5)	0,003
Broj spermija > 20 x 10 ⁶ /ml	126 (82 - 186)	14 (5 - 25,5)	<0,001
Pokretljivost >50 %	64 (60 - 67)	33 (14,5 - 45)	<0,001
Morfologija > 30 %	40 (34 - 47)	29 (14,5 - 34)	<0,001
Cink (Zn) mmol/l	1,9 (1,3 - 2,7)	1,4 (0,85 - 2,1)	<0,001

*Mann Whitney U test

Prema dobivenim vrijednostima cinka, ispitanici su svrstani u tri skupine, ispod referentnog intervala i iznad referentnog intervala te ispitanici čije se vrijednosti nalaze u referentnom intervalu.

Ispod referentnih vrijednosti je 70 (25,4 %) ispitanika, u referentnom intervalu je 191 (69,2 %), a iznad referentnog intervala je 15 (5,4 %) ispitanika. Značajno više muškaraca, njih 42 (35,9 %) ima razinu cinka ispod referentnih vrijednosti (χ^2 test, $p = 0,002$) (Tablica 2).

Tablica 2. Ispitanici prema vrijednostima cinka i prema skupinama

Vrijednosti cinka 1,2 -3,5 mmol/l	Broj (%) ispitanika			p*
	Kontrolna skupina	Neplodni muškarci	Ukupno	
ispod normale < 1,2	28 (17,6)	42 (35,9)	70 (25,4)	0,002
referentni interval 1,2 - 3,5	120 (75,5)	71 (60,7)	191 (69,2)	
Iznad referentnog intervala	11 (6,9)	4 (3,4)	15 (5,4)	
Ukupno	159 (100)	117 (100)	276 (100)	

* χ^2 test

U skupini svih ispitanika s vrijednostima cinka ispod referentnih vrijednosti, muškarci s dijagnozom neplodnosti imaju niže vrijednosti broja spermija, pokretljivosti i morfologije, no bez značajnih razlika. (Tablica 3)

Tablica 3. Srednje vrijednosti broja spermija, pokretljivosti i morfologije prema vrijednostima cinka (mmol/l)

	Medijan (interkvartilni raspon)			p*
	Ispod referentnog intervala < 1,2	Referentni interval 1,2 - 3,5	Iznad referentnog intervala	
Broj spermija > 20 x 10 ⁶ /ml	10 (0 - 23)	14 (6 - 27)	21 (10,8 - 34,3)	0,257
Pokretljivost >50 %	30 (0 - 40,3)	35 (22 - 45)	36 (19,3 - 43,8)	0,137
Morfologija > 30 %	28,5 (0 - 34)	29 (16 - 34)	29,5 (19,8 - 34,8)	0,512

*Kruskal Wallis test

U skupini neplodnih ispitanika, kod kojih su nađeni spermiji, značajno su više vrijednosti cinka, 1,6 (interkvartilnog raspona 0,9 – 2,1) u odnosu na ispitanike sa azoospermijom (Mann Whitney test, p = 0,009). (Tablica 4)

Tablica 4. Srednje vrijednosti dobi ispitanika i vrijednosti cinka u skupini ispitanika s dijagnozom neplodnosti

	Medijan (interkvartilni raspon)		p*
	azoospermija	Imaju spermije	
Dob ispitanika	34 (28 – 40)	35 (31 – 38)	0,800
Cink (Zn)	1,1 (0,6 – 1,7)	1,6 (0,9 – 2,1)	0,009

*Mann Whitney U test

Spearmanovim koeficijentom korelacije, na cijelom uzorku ispitanika, dokazano je da se povećanjem vrijednosti cinka povećava i broj spermija ($\rho = 0,282$ p < 0,001), morfologija ($\rho = 0,120$ p = 0,047) te pokretljivost ($\rho = 0,174$ p = 0,004).

5. RASPRAVA

Cink je esencijalni oligoelement nužan za brojne metaboličke procese. Potreban je za djelovanje više od 300 metaloenzima, preko 500 proteina regulatora gena te je uključen u enzimске reakcije na molekularnoj razini. Koncentracija cinka u muškim spolnim organima i sjemenoj tekućini izuzetno je visoka u usporedbi s drugim tjelesnim tekućinama i tkivima te njegov nedostatak utječe na kvalitetu sjemena i mušku neplodnost na više načina (17, 32).

Istraživanje je provedeno na uzorku od 276 muškaraca, od kojih je 159 (57,6 %) s normalnim nalazima spermiograma, a 117 (42,4 %) muškaraca s dijagnozom neplodnosti. Kod 27 (23,1 %) muškaraca s dijagnozom neplodnosti utvrđena je azoospermija.

Vrijednosti cinka u sjemenoj tekućini kod muškaraca s dijagnozom neplodnosti je 1,4 mmol/l, što je značajno niže od vrijednosti 1,9 mmol/l u kontrolnoj skupini te su potvrđeni rezultati sličnih istraživanja gdje je utvrđeno kako se kod manje plodnih (neplodnih) muškaraca često nalaze snižene koncentracije cinka u sjemenoj tekućini (18, 19, 24 - 26).

Pri razmatranju dobivenih rezultata treba uzeti u obzir kako u ispitivanoj populaciji nisu isključeni slučajevi s kroničnim bolestima, pušači, ispitanici koji konzumiraju alkohol te oni koji koriste lijekove ili bilo kakvu dodatnu suplementaciju vitaminima/mineralima koji bi mogli utjecati na kvalitetu sjemene tekućine. Nadalje, nisu poznati okolišni čimbenici i način prehrane ispitanika, stil života, profesionalna izloženost teškim metalima, temperaturi itd, budući da su mnoge studije dugoročni utjecaj tih čimbenika povezale s muškom neplodnošću (15).

U ovoj su studiji muškarci s dijagnozom neplodnosti značajno stariji, srednje dobi od 35 godina u odnosu na muškarce s normalnim nalazom spermiograma, čija je srednja dob iznosila 32 godine. Najmlađi ispitanik u kontrolnoj skupini je imao 18 godina, a najstariji 49 godina, dok je kod muškaraca s dijagnozom neplodnosti najmlađi ispitanik imao 20 godina, a najstariji 50.

O učinku dobi na reproduktivnu funkciju muškaraca, još se uvijek malo zna, međutim, nedavna istraživanja u Francuskoj koja su obuhvatila 8515 parova i utvrdila da muškarci stariji od 35 godina imaju 50 % manje šanse za roditeljstvo u odnosu na muškarce ispod 25 godina (33).

Razlog tomu je, vjerojatno, dulja izloženost nepovoljnim uvjetima koji mogu dovesti do nastanka mutacija u DNA spermija, dulje izlaganje oksidativnom stresu te češći kontakt s raznim upalnim čimbenicima kojima su muškarci izloženi tijekom života (34). Dulja akumulacija toksičnih teških metala (olovo, živa, kadmij) u tkivima testisa također može utjecati na smanjenu plodnost čemu doprinosi i smanjena koncentracija cinka u spermijima (35). Istraživači iz Sveučilišta Newcastle otkrili su da su oštećenja DNA u spermijima kod muškaraca u dobi od 36 do 57 godina tri puta veća, nego kod muškaraca mlađih od 35 godina. (36).

Dobiveni broj spermija od $14 \times 10^6/\text{ml}$, pokretljivost od 33 % te morfologija od 29 % u skupini muškaraca s dijagnozom neplodnosti, također pokazuju statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolnom skupinom. Pojedini autori su primijetili da je viša koncentracija cinka povezana s poboljšanim sjemenim parametrima, uključujući i broj (37), pokretljivost i normalnu morfologiju (38). U istraživanju iz 2005. godine primijećena je korelacija vezana uz poremećaj nastanka spermija i njihove pokretljivosti s nižim sadržajem cinka u sjemennoj tekućini neplodnih ispitanika (39).

Prema dobivenim vrijednostima cinka, obje su grupe svrstane u tri skupine; ispod referentnog intervala i iznad referentnog intervala te ispitanici čije se vrijednosti nalaze u referentnom intervalu. Ispod referentnih vrijednosti je 70 (25,4 %) ispitanika, u referentnom intervalu je 191 (69,2 %), a iznad referentnog intervala je 15 (5,4 %) ispitanika.

Značajno više muškaraca, njih 42 (35,9 %) ima razinu cinka ispod referentnih vrijednosti, dok su vrijednosti cinka u skupini muškaraca s dijagnozom neplodnosti očekivano niže od kontrolne skupine, što je u skladu s prethodno navedenim istraživanjima. 15 % ispitanika iz obje skupine zajedno imaju vrijednosti iznad referentnog intervala, što može ukazivati na oralnu suplementaciju minerala u koju je uključen i cink.

Nadalje, 71 ispitanik s dijagnozom neplodnosti ima razinu cinka u referentnom intervalu, ali s obzirom na nedostatak podataka o dijagnozi neplodnosti i njihovom načinu života, moguće je da primijenjuju nadomjesnu terapiju koja uključuje cink. Nekoliko istraživanja je pokazalo da oralna suplementacija cinkom poboljšava broj, pokretljivost i morfologiju spermija kod muškaraca s idiopatskom neplodnošću te kod djelomično plodnih, tj. kod muškaraca sa astenozoospermijom i/ili oligozoospermijom (40, 41).

Smanjena razina cinka kod muškaraca iz kontrolne skupine može ukazivati na upalne procese i promjene u prostati (42) što ne možemo isključiti s obzirom na to da se tijekom istraživanja nije koristio upitnik u kojem bi dobili informacije o zdravstvenom stanju pacijenta (40).

U skupini ispitanika s dijagnozom neplodnosti, kod kojih je utvrđena azoospermija, također su utvrđene značajno niže vrijednosti cinka, 1,1 mmol/l u odnosu na ispitanike iz iste skupine (s dijagnozom naplodnosti) kod koji su vrijednosti cinka iznosile 1,6 mmol/l. Ti su rezultati slični onima iz 2012. god (43), međutim, u suprotnosti sa istraživanjima koja govore da nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji cinka ispitanika sa azoospermijom u odnosu na ispitanike sa astenozoospermijom i oligozoospermijom (44, 45).

Azoospermija je zabilježena u 1 % opće populacije te u 10 – 15 % neplodnih muškaraca (46). Na području naše županije prema ovom istraživanju taj postotak iznosi 23,1 %, što je više u odnosu na podatke iz navedene literature.

Spearmanovim koeficijentom korelacije, na cijelom uzorku ispitanika, dokazano je da se povećanjem vrijednosti cinka u sjemenoj tekućini povećava i broj spermija ($\rho = 0,282$ $p < 0,001$), postotak morfološki normalnih spermija ($\rho = 0,120$ $p = 0,047$) te njihova pokretljivost ($\rho = 0,174$ $p = 0,004$).

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju na značajnost cinka u dijagnostici muške neplodnosti i mogli bi pridonijeti u objašnjenju etiopatogeneze kod poremećaja reproduktivne funkcije u muškaraca te dati smjernice za moguću terapiju i prevenciju spomenutog poremećaja u našoj populaciji. Prehrambene se navike ispitanika regionalno razlikuju i neko bi buduće istraživanje moglo uključiti opsežne upitnike s pomoću kojih bi jasnije isključivali/uključivali ispitanike. S obzirom na to da se ovo istraživanje odnosi na ispitanike s područja Osječko-baranjske županije, kao takvo može poslužiti kao izvor podataka za buduća istraživanja vezana uz ovu problematiku.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti sljedeće:

- U provedenom su istraživanju muškarci s dijagnozom neplodnosti značajno stariji, srednje dobi od 35 godina u odnosu na muškarce s normalnim nalazom spermograma čija je srednja dob iznosila 32 godine.
- Vrijednosti cinka u sjemenoj tekućini kod muškaraca s dijagnozom neplodnosti je 1,4 mmol/l što je značajno niže od vrijednosti dobivenih u kontrolnoj skupini od 1,9 mmol/l. Prema dobivenim vrijednostima cinka ispod referentnih vrijednosti je 25,4 % ispitanika, u referentnom intervalu je 69,2 %, a iznad referentnog intervala je 5,4 % ispitanika. Značajno više muškaraca, njih 35,9 %, ima razinu cinka ispod referentnih vrijednosti. 15 % ispitanika iz obje skupine zajedno imaju vrijednosti iznad referentnog intervala (što može ukazivati na oralnu suplementaciju minerala u koju je uključen i cink). Nadalje, ispitanici s dijagnozom neplodnosti, njih 71 %, imaju razinu cinka u referentnom intervalu.
- U skupini svih ispitanika s vrijednostima cinka ispod referentnih vrijednosti, muškarci s dijagnozom neplodnosti imaju niže vrijednosti broja spermija, pokretljivosti i morfologije, no bez značajnih razlika.
- U skupini ispitanika s dijagnozom neplodnosti, kod kojih je utvrđena azoospermija, također su utvrđene značajno niže vrijednosti cinka, 1,1 mmol/l u odnosu na ispitanike iz iste skupine (s dijagnozom neplodnosti) kod koji su vrijednosti cinka 1,6 mmol/l.
- Dobiveni broj spermija od $14 \times 10^6/\text{ml}$, pokretljivost od 33 % te morfologija od 29 % u skupini muškaraca s dijagnozom neplodnosti, također pokazuje statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolnom skupinom.
- U cijelom uzorku ispitanika dokazano je da se povećanjem vrijednosti cinka u sjemenoj tekućini povećava i broj spermija, postotak morfološki normalnih spermija te njihova pokretljivost.

7. SAŽETAK

Cilj: Cilj provedenog istraživanja bio je utvrditi postoji li značajna razlika u koncentraciji cinka u sjemennoj tekućini kod muškaraca s dijagnozom neplodnosti u odnosu na muškarce s normalnim nalazom spermograma te ukoliko postoji, kako utječe na broj, pokretljivost i morfologiju spermija.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao *cross-sectional* studija na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek.

Ispitanici i metode:

- Istraživanje je provedeno na 276 muškaraca s područja Osječko-baranjske županije.
- Uzorci sjemene tekućine obrađeni su u skladu s kriterijima SZO-a, a koncentracija cinka određena je spektrofotometrijskom, direktnom kolorimetrijskom metodom bez deproteinizacije na Olympusu AU 680.
- Za statističku obradu podataka primijenjeni su Mann Whitney U test, χ^2 test, Kruskal Wallis test i Spearmanov koeficijent korelacije.

Rezultati:

- U provedenom istraživanju muškarci s dijagnozom neplodnosti značajno su stariji, imaju značajno niže vrijednosti cinka, manji broj spermija, slabiju pokretljivost te manje morfološki normalnih spermija u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Prema dobivenim vrijednostima cinka značajno više muškaraca iz skupine s dijagnozom neplodnosti ima razinu cinka ispod referentnih vrijednosti.
- U skupini pacijenata s dijagnozom neplodnosti, kod kojih su nađeni spermiji, značajno su više vrijednosti cinka u odnosu na ispitanike kojima je utvrđena azoospermija.

Zaključak: Postoji povezanost sniženih razina cinka u sjemennoj tekućini s postavljenom dijagnozom neplodnosti te bi procjena koncentracije cinka mogla biti korisna informacija za predviđanje muškog oplodnog potencijala. Prehrambene se navike ispitanika regionalno razlikuju i neko bi buduće istraživanje moglo postaviti dobre temelje za daljnji pristup liječenju s odgovarajućom terapijom.

Ključne riječi: cink, muška neplodnost, spermogram

8. SUMMARY

THE IMPORTANCE ZINC-CONCENTRATION IN SEMEN OF MEN DIAGNOSED WITH INFERTILITY

Aim: The aim of this research was to compare zinc-concentration in semen of men diagnosed with infertility and men with normal spermiogram in order to determine if there is a significant difference and, if there is one, how it affects the number, mobility and morphology of sperm.

Study design: The research was conducted as a cross-sectional research in the Department of clinical laboratory diagnostics of Clinical Hospital Centre Osijek

Participants and methods:

- There were 276 participants from Osijek-Baranja County included in this research.
- Standardized WHO criteria was used in analyzing semen samples. Spectrophotometric, direct colorimetric method without deproteinization on Olympus AU 680 was used to determine Zinc-concentration.
- Mann-Whitney U test, χ^2 test, Kruskal-Wallis test and Spearman's correlation coefficient were used in statistical data analysis.

Results:

- The research showed that men with diagnosed infertility are significantly older, have lower zinc-concentration, lower number of sperm, less mobility of sperm and lower number of morphologically normal sperm when compared with the control group.
- Significantly higher number of men diagnosed with infertility has a zinc-concentration under the normal referential value.
- In the group of men diagnosed with infertility there is a higher level of zinc-concentration than in patients diagnosed with azoospermia.

Conclusion: There is a correlation between low zinc-concentration in semen and diagnosed infertility. Thus, the assessment of zinc-concentration could be useful information when determining male fertilizing potential. Eating habits differ regionally for all participants, so future research should set good foundation in further study of appropriate treatment.

Key words: zinc, male infertility, spermiogram

9. LITERATURA

1. 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
2. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za godine 2011-2013, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb
3. Bokarica Pero, doktorska disertacija, Značaj preoperativnih vrijednosti koncentracije spermija i ukupnog broja progresivno pokretnih spermija u procjeni uspješnosti varikokelektomije, (2010), Sveučilište u Zagrebu
4. Miro Kasum, Idiopatska neplodnost, pregledni članak, Klinika za ženske bolesti i porode Medicinskog fakulteta Sveučilišta i KBC-a u Zagrebu
5. American Urological Association. The Optimal Evaluation of the Infertile Male. AUA Best Practice Statement. Revised 2010. Fritz M.A. i Speroff L. Clinical Gynaecologic endocrinology and infertility, Wolters-kluwer, 8th ed., Philadelphia, 2011
6. Freund, M, Standards for the rating of human sperm morphology, A cooperative study. Int. J. Fertil.1966, 11, str. 97 – 118.
7. Eliasson R. 1971, Standards for investigation of human semen, Andrologie 1971 3 str. 49 - 64
8. Velimir Šimunić & suradnici, Ginekologija, Medicinska biblioteka,Zagreb, 2001, str. 61 - 69
9. Guyton i Hall, Medicinska fiziologija udžbenik, jedanaesto izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2006 str. 996 - 1009
10. Junqueira LC, Carneiro J, Osnove histologije udžbenik i atlas prema 10.američkom izdanju, Školska knjiga, Zagreb, 2005, str. 431 - 447
11. Lynn R. Fraser,Sperm capacitation and the acrosome reaction, Anatomy and Human Biology Group,2010, King's College London, Strand, London WC2R2LS,UK
12. A. H. Sathananthan¹AS, S.S.Ratnam, S.C.Ng, J J.Thrin, L.GianaroIi, and A.Trounson,The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos, Hainan Reproduction,1996 ,vol.11 no.2 p p. str. 345 - 356
13. Massányi, P., Trandzik, J., Nad, P., Koreneková, B., Skalicka,M., Toman, R., Lukac, N., Halo, M., Stražak, P. 2004. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead,

- and nickel in bull and ram semen and relation to the occurrence of pathological spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 39, 3005-3014.
14. Marzec-Wróblewska, U., Kamiński, P., Łakota, P. 2013. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)*, 58, 7-15.
 15. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci*. 2013; 18(2): 144-157.
 16. Vallee, BL; Falchuk, KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev* 1993, 73, 79–118
 17. Tus, A.; Rakipović, A.; Peretin, G.; Tomić, S.; Šikić, M. BioMe: Biologically relevant metals, *Nucleic Acids Research*. v40 (Web Server Issue) (2012).
 18. Colagar, A.H., Marzonya, E.T., Chaichib, M.J. 2009. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, 29, 82–88
 19. . Natthiya Sakulsak, Metallothionein: Metal Homeostatic Regulation in Mammals *Int. J. Morphol.*, An Overview on its 30 (3):1007-1012, 2012
 20. Bray, T. M. & Bettger, W. J. (1990) The physiologic role of zinc as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 8:281-291
 21. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM . Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;8:616-627.
 22. de Lamirande E, Hon J, Armand Z, Hideya K, Claude G (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2: 48–54
 23. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity, *J Androl*. 1987 Sep-Oct;8(5):338-48.
 24. Sharma, R.K., Pasqualotto, F.F., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. Jr. The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*.1999;14:2801–2807
 25. Yamaguchi S., Miura C., Kikuchi K., Celino F.T., Agusa T., Tanabe S., Miura T.: Zinc is an essential trace element for spermatogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009

26. Ryan T. Schulte, Dana A. Ohl, Mark Sigman, and Gary D. Smith Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Jan; 27(1): 3–12
27. Ashok Agarwal & Lucky H. Sekhon The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility *Human Fertility*, December 2010; 13(4): 217–225
28. Puntarić D, Ropac D. Metodologija epidemiološkog istraživanja. U: Puntarić D, Ropac D, ur. Opća epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. str. 31-42
29. Sentinel Diagnostics. Direct colorimetric determination without deproteinization of zinc (Zn) concentration in serum, plasma and seminal fluid. Milano: Sentinel Diagnostics; 2011
30. A. Makler, The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility*, 1980, 33: str. 337 – 338
31. Petz. Osnove statističke metode za nematematičare. 1. izdanje, Zagreb, Slap, 1997
32. Caldamone, A.A., Freytag, M.K., Cockett, A.T. 1979. Seminal zinc and male infertility. *Urology*, 13, 280-281
33. B. Eskenazi, A.J. Wyrobek, E. Slotter, S.A. Kidd, L. Moore¹, S. Young¹ and D. Moore; The association of age and semen quality in healthy men *Hum. Reprod.* 2003 18 (2): 447-454
34. Al-Bader A, Omu AE, Dashti H. Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. *Arch Androl.* 1999 Sep-Oct;43(2):135-40
35. Kruse, W.E., Zwick, E.M., Batschulat, K., Rohr, C., Ambruster, F.R., Petzoldt, D. 2002. Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leucocytes and other determinations of semen quality? *Fertility and Sterility*, 77, 260-269.
36. Sharon A Kidd, Brenda Eskenazi, Andrew J Wyrobek, Effects of male age on semen quality and fertility: *Fertility and sterility*, 2001, Volume 75, issue 2, pages 237-248
37. Mankad, M., Sathawara, N.G., Doshi, H., Saiyed, H.N., Kumar, S. 2006. Seminal plasma zinc concentration and α -glucosidase activity with respect to semen quality. *Biological Trace Element Research*, 110, 97-106.
38. Chia, S.E., Ong, C., Chua, L., Ho, L., Tay, S. 2000. Comparison of zinc concentration in blood and seminal plasma and various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 21, 53-57.

39. Zhao, R.P., Xiong, C.L. 2005. Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic patients. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 11, 680-682.
40. Ebisch, I.M.W., Thomas, C.M.G., Peters, W.H.M., Braat, D.D., Steegers-Theunissen, R.P.M. 2007. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*, 13, 163-174
41. Kumar H, Verm RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS (2006) Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* x *Bos taurus*) bulls. *Reprod Nutr Dev* 46:663–675
42. Feng Pet al. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptosis in prostate cells. *Prostate* 2002;52: 311–318
43. Ali MA Hassan, Atef F. El Hadad, Abd El Shakour AH El-Mohammady, Olfat G. Shaker, Magdy EH Attaby Faculty of Science.- Al-Azhar University –Cairo Estimation of Zinc in Seminal Fluid among Infertile Men, *Egyptian Journal of Environmental Research EJER*, 2012: 34-41,43
44. Lin, YC, Chang, TC, Tseng, FJ, Kung, FT, Chang, SY Seminal plasma zinc levels and sperm motion characters in infertile samples. *Changgeng Yi Xue Za Zhi* 2000; 23: 260-266
45. Eggert-Kruse, W., Zwick, EM, Batshulat, K., Rohr, G., Armbrster, FP, Petzoldt D. et al. Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and others determinants of semen quality. *Fertil steril* 2002; 77: 260-269
46. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril* 2006; 86:Suppl 1 210 -215

10. ŽIVOTOPIS

VESNA KUIĆ - VADLJA

Datum i mjesto rođenja:

- 5. studeni 1963. g., Osijek

Adresa:

- Zagrebačka 9a, Osijek

Obrazovanje:

- 1980 – 1982., Školski centar „Ruđer Bošković“ Osijek; Sanitarno - laboratorijski stručni radnik
- 2011 – 2013., Preddiplomski sveučilišni studij biomedicinsko laboratorijskih tehnologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2013 – 2015., Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Dosadašnje profesionalno iskustvo:

- 1983. do danas – Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra u Osijeku

Članstvo u udrugama:

- Hrvatska komora zdravstvenih radnika