

Prediktivni model prisutnosti spermija u sjemeniku muškaraca s azoospermijom temeljen na oslikavanju magnetskom rezonancijom

Planinić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:326200>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Planinić

**Prediktivni model prisutnosti spermija
u sjemeniku muškaraca s
azoospermijom temeljen na
oslikavanju magnetskom
rezonancijom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Planinić

**Prediktivni model prisutnosti spermija
u sjemeniku muškaraca s
azoospermijom temeljen na
oslikavanju magnetskom
rezonancijom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Istraživačka jedinica Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja te uz potporu projekta „Reproduktivna i regenerativna medicina - istraživanja novih platformi i potencijala” kojeg sufinancira Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj, u okviru Operativnog programa Konkurentnost i kohezija, pod brojem ugovora KK.01.1.1.01.0008. MRI snimanja izvedena su u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost (GlowLab) Sveučilišta u Zagrebu Medicinski fakultet (RRID:SCR_022701).

Voditelji rada: prof.dr.sc. Davor Ježek i dr.sc. Siniša Škokić, viši znanstveni suradnik

CERM

Znanstveni centar izvrsnosti za
reproduktivnu i regenerativnu medicinu



**EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDOVI**



**Operativni program
KONKURENTNOST
I KOHEZIJA**



Europska unija
Zajedno do fondova EU

ZAHVALE

Zahvaljujem svojem mentoru prof.dr.sc. Davoru Ježeku na pomoći i podršci tijekom ovog procesa, vjeri koju je imao u mene i moje ideje te na svim prilikama koje mi je pružio.

Zahvaljujem svojem mentoru dr.sc. Siniši Škokiću na pomoći i podršci u svakom aspektu ovog rada, od početne ideje i optimizacije metodologije istraživanja do same provedbe te svom znanju i iskustvu koje je nesebično dijelio.

Zahvaljujem se svojim kolegama na svim savjetima, podršci i nezaboravnim trenucima bez kojih ovaj put ne bi bio to što je bio.

Hvala i mojoj užoj i široj obitelji, a i svima ostalima koji su prošli kroz moj život i bili mi podrška na ovom putu.

I za kraj, hvala mojim prijateljima na podršci tijekom ovog dugotrajnog procesa u svim aspektima života te na svim uspomenama bez kojih moj život ne bi bio to što je.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Muška neplodnost.....	1
1.1.1. Kvantitativni poremećaji spermatogeneze.....	1
1.1.2. Kvalitativni poremećaji spermatogeneze.....	2
1.1.3. Idiopatska neplodnost.....	3
1.1.4. Specifična stanja u muškoj neplodnosti.....	3
1.2. Azoospermija	4
1.2.1. Duktalna opstrukcija ili disfunkcija	5
1.2.2. Poremećaji hipotalamo-hipofizne osovine	5
1.2.3. Primarni poremećaji spermatogeneze.....	6
1.3. Dijagnostika i liječenje neplodnog muškarca	8
1.3.1. Prvi pregled.....	8
1.3.2. Dodatna evaluacija i liječenje	9
1.3.3. Metode potpomognute oplodnje	11
1.4. Predikcija uspješnosti ekstrakcije spermija	14
1.4.1. Histološka analiza	14
1.4.2. Neinvazivne metode predikcije SRR	14
1.4.3. Neinvazivna predikcija SRR pomoću snimanja magnetskom rezonancijom ..	17
2. HIPOTEZA.....	20
3. SVRHA I CILJEVI RADA	21
4. MATERIJALI I METODE.....	22
4.1. Pacijenti	23
4.2. TESE (Testikularna ekstrakcija spermija)	23
4.3. Programirano zamrzavanje uzoraka	24
4.4. Snimanje magnetskom rezonancijom.....	25

4.5. Obrada slika i određivanje parametara	27
4.5.1. Određivanje srednjeg T2 vremena relaksacije uzorka.....	28
4.5.2. Određivanje prividnog koeficijenta difuzije (ADC) i frakcionalne anizotropije (FA) uzorka.....	30
4.5.3. Određivanje omjera prijenosa magnetizacije (MTR) uzorka	31
4.6. Određivanje koncentracije metabolita iz spektara	32
4.6.1. Izrada kapilare s TMS-om	32
4.6.2. Kreiranje referentnog seta spektara metabolita.....	33
4.6.3. Procesiranje spektara u jMRUI programu	36
4.6.4. Uklanjanje signala glicerola iz krioprezerviranih uzoraka	36
4.6.5. Određivanje volumena uzorka sjemenika.....	36
4.7. Histološko procesiranje tkiva.....	37
4.8. Klasično histološko bojenje hemalaun-eozinom.....	37
4.9. Analiza obojenih stakala i bodovanje po Johnseni.....	38
4.10. Imunofluorescentno bojenje.....	40
4.11. Analiza ekspresije PRM-1.....	41
4.12. Statistička obrada podataka.....	42
4.12.1. Graphpad.....	42
4.12.2. Umjetne neuronske mreže (ANN).....	43
5. REZULTATI	44
5.1. Histološka analiza uzoraka	44
5.2. Imunofluorescentna analiza uzoraka	48
5.3. Dijagnostička obrada pacijenata (FSH, LH, kriptorhizam).....	52
5.4. MRI parametri.....	53
5.4.1. Vrijeme relaksacije T2.....	53
5.4.2. Prividni koeficijent difuzije (ADC).....	57
5.4.3. Frakcionalna anizotropija (FA).....	58
5.4.4. Omjer prijenosa magnetizacije (MTR).....	58

5.5. Parametri spektra MRS signala.....	59
5.5.1. Volumen uzoraka	60
5.5.2. Koncentracije metabolita	61
5.6. Utjecaj krioprezervacije na MRI i MRS parametre.....	64
5.7. Prediktivni modeli	69
5.7.1. Procjena korisnosti nezavisnih varijabli u prediktivnom modelu	69
5.7.2. Analiza odnosa nezavisnih varijabli s količinom spermija i zrelih spermatida (PRM1LOG)	79
5.7.3. Prediktivni modeli za varijablu H	82
5.7.4. Prediktivni modeli za varijablu P	90
6. RASPRAVA	99
6.1. Karakterizacija uzoraka histološkom i imunohistokemijskom analizom	99
6.2. Nezavisne varijable	101
6.2.1. Parametri dobiveni dijagnostičkom obradom pacijenata	101
6.2.2. Parametri dobiveni MRI snimanjem.....	102
6.2.3. Parametri dobiveni MR spektroskopijom	104
6.3. Utjecaj krioprezervacije na parametre	106
6.4. Prediktivnost nezavisnih varijabli	107
6.5. Usporedba prediktivnih modela	107
6.6. Translacijski potencijal istraživanja i budući razvoj	109
7. ZAKLJUČAK.....	111
8. SAŽETAK	114
9. SUMMARY	115
10. LITERATURA.....	116
11. BIOGRAFIJA	128

POPIS KRATICA

ADC - prividni difuzijski koeficijent (engl. *Apparent diffusion coefficient*)

ADGRG2 - (engl. *Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2*)

AMH - anti - Müllerov hormon (engl. *Anti-Müllerian hormone*)

AUC - površina ispod ROC krivulje (engl. *Area under the ROC curve*)

BMI - indeks tjelesne mase (engl. *Body mass indeks*)

CAVD - kongenitalni nedostatak vas deferensa (engl. *Congenital absence of the vas deferens*)

CFTR - (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

CHH - kongenitalni hipogonadotropni hipogonadizam (engl. *Congenital hypogonadotropic hypogonadism*)

DTI - snimanje difuzijskog tenzora (engl. *Diffusion tensor imaging*)

DWI - difuzijsko snimanje (engl. *Diffusion weighted imaging*)

FA - frakcionalna anizotropija (engl. *Fractional anisotropy*)

FSH - folikulostimulirajući hormon (engl. *Follicle-stimulating hormone*)

GCNIS - neoplazija sjemenskih stanica *in situ* (engl. *Germ cell neoplasia in situ*)

GnRH - gonadotropin-oslobađajući hormon (engl. *Gonadotropin-releasing hormone*)

HS - hipospermatogeneza (engl. *Hypospermatogenesis*)

ICSI - intracitoplazmatska injekcija spermija (engl. *Intracytoplasmic sperm injection*)

INHB - inhibin B (engl. *inhibin B*)

IVF - *in vitro* oplodnja (engl. *In vitro fertilization*)

JS - Johnsenova ocjena spermatogeneze (engl. *Johnsen score*)

KS - Klinefelterov sindrom (engl. *Klinefelter syndrome*)

LH - luteinizirajući hormon (engl. *Luteinizing hormone*)

MA - maturacijski arest (engl. *Maturation arrest*)

mi-RNA - mikro- RNA (engl. *Micro-RNA*)

MIXA - mješovita atrofija (engl. *Mixed atrophy*)

MPO - metode medicinski pomognute oplodnje

MTI - snimanje prijenosa magnetizacije (engl. *Magnetization transfer imaging*)

MTR - omjer prijenosa magnetizacije (engl. *Magnetization transfer ratio*)

NOA - neopstruktivna azospermija (engl. *Non-obstructive azoospermia*)

NPV - negativna prediktivna vrijednost (engl. *negative predictive value*)

OA - opstruktivna azospermija (engl. *Obstructive azoospermia*)

pi-RNA - piwi-komunicirajuća (engl. *Piwi-interacting RNA*)

PPV - pozitivna prediktivna vrijednost (engl. *Positive predictive value*)

PRM1 - protamin 1 (engl. *Protamine 1*)

SCOS - sindrom 'samo Sertolijevih stanica' (engl. *Sertoli-Cell-Only syndrome*)

SRR - uspješnost ekstrakcije spermija (engl. *Sperm retrieval rate*)

TESE - testikularna ekstrakcija spermija (engl. *Testicular sperm extracion*)

1. UVOD

1.1. Muška neplodnost

Neplodnost je bolest reproduktivnog sustava definirana kao nemogućnost ostvarivanja kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih seksualnih odnosa, a pogađa 10-15 % parova (1,2). Smatra se da je 50 % svih slučajeva neplodnosti uzrokovano isključivo ženskim čimbenicima, 20-30 % isključivo muškim čimbenicima, a preostalih 20-30 % je posljedica kombinacije muških i ženskih čimbenika. Prevalencija neplodnosti uzrokovana muškim faktorom varira u svijetu između 20 % do 70 %, a postotak neplodnih muškaraca kreće se od 2,5 % do 12 %. Stope muške neplodnosti su najviše u Africi te srednjoj i istočnoj Europi (3). Na temelju analize ejakulata muška neplodnost se može etiološki podijeliti u kvalitativne i kvantitativne poremećaje spermatogeneze te idiopatsku neplodnost s normalnim spermiogramom (4).

1.1.1. Kvantitativni poremećaji spermatogeneze

Kvantitativni poremećaj spermatogeneze je najčešći uzrok muške neplodnosti i dijeli se u nekoliko podvrsta ovisno o količini spermija u ejakulatu. Oligozoospermijom se smatra manje od 15 milijuna spermija po mililitru ejakulata, kriptozoospermijom manje od 1 milijun spermija po mililitru, a azoospermija je potpuni nedostatak spermija u ejakulatu (5). Oligozoospermija je prisutna u oko 60 % neplodnih muškaraca, dok je azoospermija prisutna u oko 15 % (5,6). Spermatogeneza je složen i visoko reguliran proces koji se odvija u sjemeniku i dovodi do proizvodnje zrelih spermija. Proces počinje od matičnih stanica, spermatogonija, koje se samoobnavljaju mitozom i diferenciraju u primarne spermatocite koje onda započinju mejozu. Prva mejotička dioba proizvodi dvije sekundarne spermatocite, a druga četiri haploidne spermatide. Tijekom spermiogeneze okrugle spermatide se izdužuju, razvijaju akrosomalnu kapicu i rep te ih Sertolijeve stanice otpuštaju u lumen sjemenog kanalića. Cijeli proces traje oko 74 dana. Broj spermatogonija se smanjuje starenjem, ali je gubitak vrlo spor i postaje relevantan tek oko 80. godine života (7). Poremećaji spermatogeneze mogu dovesti do smanjene proizvodnje spermija i neplodnosti. Uzroci poremećaja spermatogeneze mogu biti genetski i negenetski. Mogući genetski uzroci su mikrodelecije Y kromosoma, Klinefelterov

sindrom (47, XXY), muški sindrom XX, izodicentrični Y kromosom, strukturne anomalije kromosoma te X-vezane genetske anomalije. Negenetski uzroci uključuju varikokele, prethodnu kemoterapiju ili radioterapiju, virusne upale sjemenika, torziju sjemenika, maligne bolesti sjemenika te teške traume u području skrotuma. Potencijalni genetski ili okolišni uzroci uključuju kriptorhizam te idiopatske poremećaje spermatogeneze. U spermatogenezu je uključeno više od 1500 gena te je moguće da su ti poremećaji uzorkovani mutacijom jednog gena ili utjecajem okoliša na osjetljivu genetsku podlogu (4).

1.1.2. Kvalitativni poremećaji spermatogeneze

Kvalitativni poremećaji spermatogeneze uključuju poremećaje morfologije i pokretljivosti spermija. Teratozoospermija označava poremećaj gdje je više od 85 % spermija abnormalne morfologije, a može se podijeliti na dvije vrste. Makrozoospermija označava poremećaj u kojem spermiji imaju veliku glavu i često više repova, dok globozoospermija označava poremećaj gdje je glava spermija okrugla (8). Teratozoospermija je prisutna u oko 12 % neplodnih muškaraca (9). Astenozoospermija je naziv za stanje gdje je ukupna pokretljivost spermija manja od 40 %, a progresivna pokretljivost manje od 32 %. Progresivna pokretljivost označava kretanje spermija većinom ravno ili u velikim krugovima (10). Astenozoospermija je prisutna u oko 15-20 % neplodnih muškaraca (9,11). Mogu se podijeliti na one genetskog i negenetskog podrijetla. Globozoospermija, makrozoospermija te sindrom nepokretnih cilija su povezane s različitim mutacijama i kromosomskim anomalijama. Kako muškarac stari smatra se da se povećava broj mutacija u spermatogonijama koje onda dovode do kvalitativnih poremećaja spermatogeneze. Vjerojatno je i da barem dio slučajeva idiopatske astenozoospermije i teratozoospermije ima još neotkrivenu genetsku podlogu s obzirom na veliki broj gena uključenih u spermatogenezu i njenu kompleksnu regulaciju. Negenetski uzrok kvalitativnih poremećaja spermatogeneze može biti oksidativni stres zbog upale u urogenitalnom traktu. Reaktivni kisikovi radikali mogu inducirati kemijske i strukturne promjene DNK spermija te oštetiti proteine i lipide u membranama spermija i tako negativno utjecati na pokretljivost i vitalnost spermija (4).

1.1.3. Idiopatska neplodnost

Idiopatska neplodnost se odnosi na slučajeve u kojima muškarac ne može začeti dijete unatoč normalnoj analizi sjemeni i bez utvrđenog uzroka neplodnosti. Procjenjuje se da neobjašnjiva muška neplodnost čini otprilike 10-20 % svih slučajeva muške neplodnosti. Postoji nekoliko mogućih čimbenika koji mogu pridonijeti neobjašnjivoj muškoj neplodnosti, uključujući genetske abnormalnosti, hormonsku neravnotežu i čimbenike okoliša kao što je izloženost toksinima ili zračenju. Međutim, u mnogim slučajevima točan uzrok neplodnosti ostaje nepoznat (3,12).

1.1.4. Specifična stanja u muškoj neplodnosti

1.1.4.1. Kriptorhizam

Kriptorhizam je poremećaj u razvoju muške djece gdje ne dolazi do spuštanja jednog ili oba sjemenika u skrotum i pogađa oko 1 % novorođenčadi (13). Degeneracija i smanjenje broja spolnih stanica se događa unutar prve godine života te se stoga preporučuje operacija upravo do prve godine života kako bi se smanjio rizik od tumora sjemenika i povisio broj spermija u ejakulatu u odrasloj dobi (14–16). Zlatni standard liječenja kriptorhizma je orhidopeksija, dok poticanje spuštanja sjemenika hormonskom terapijom ima nisku uspješnost (17). Muškarci s unilateralnim kriptorhizmom u anamnezi nemaju narušenu plodnost dok su muškarci s bilateralnim kriptorhizmom plodni u 35-53 % slučajeva (18). Povijest kriptorhizma znači i povišeni rizik od hipogonadizma i malignih tumora sjemenika te se pacijenti moraju adekvatno pratiti (19,20). Unilateralni kriptorhizam koji se otkrije u odrasloj dobi (drugi je sjemenik funkcionalan) liječi se orhidektomijom dok se bilateralni kriptorhizam i unilateralni gdje drugi sjemenik nije funkcionalan liječe orhidopeksijom te višestrukim biopsijama sjemenika kako bi se isključio *in situ* tumor spolnih stanica (GCNIS) (21,22).

1.1.4.2. Tumori spolnih stanica

Prema teoriji sindroma testikularne disgeneze, povećana incidencija malignih tumora sjemenika, kriptorhizma, neplodnosti i hipospadije je uzrokovana izlaganjem endokrinim disruptorima za vrijeme fetalnog razvoja (23). Od muškaraca s malignim tumorima sjemenika, 24 % njih ima NOA, dok 50 % ima oligozoospermiju te bi svi trebali proći savjetovanje u vezi

neplodnosti (24). Kemoterapija može uzrokovati SDF i aneuploidiju spermija, no taj je učinak privremen i nakon 18-24 mjeseca se parametri vraćaju na razine prije liječenja (25).

1.1.4.3. Varikokele

Varikokela je proširenje vena spermatičnog pleksusa koje odvođe krv iz sjemenika. Varikokele su prisutne u 15 % populacije te u 35-50 % neplodnih muškaraca(26). Meta-analize su pokazale da liječenje kliničkih varikokela popravlja parametre analize ejakulata te se preporučuje kod muškaraca koji imaju abnormalan nalaz ejakulata ili idiopatsku neplodnost (27,28).

1.1.4.4. Upale muških pomoćnih spolnih žlijezda

Prema smjernicama WHO, u upale muških pomoćnih spolnih žlijezda spadaju uretritis, orhitis, prostatitis i epididimitis (29). Rezultati studija o utjecaju simptomatskih i asimptomatskih infekcija i njihovog liječenja na funkciju spermija su oprečni (28). Leukocitospermija u neplodnih muškaraca je povod za kulturu ejakulata ili PCR testiranje na najčešće patogene urogenitalnog trakta (30). Ureaplasma Urealyticum, Mycoplasma hominis, HPV te Chlamydia su povezani s neplodnošću, no trenutna literatura je kontradiktorna, a dokazi su niske kvalitete (28). Epididimitis je uvaženi uzrok neplodnosti budući da može uzrokovati stenozu duktusa epididimida i atrofiju sjemenika te tako dovesti do OA ili NOA dijagnoze (30).

1.2. Azoospermija

Azoospermija je potpuni nedostatak spermija u ejakulatu i nalazi se kod 15 % neplodnih muškaraca te oko 1 % svih muškaraca. Etiološki se može razviti zbog poremećaja hipotalamo-hipofizne osi, primarnih poremećaja spermatogeneze ili duktalne opstrukcije (31). Ako je uzrok azoospermije duktalna opstrukcija spermatogeneza je neoštećena i stanje se naziva opstruktivnom azoospermijom (OA). Ako je uzrok azoospermije primarno ili sekundarno zatajenje funkcije sjemenika stanje se naziva neopstruktivnom azoospermijom (NOA). NOA može imati raznoliku histološku sliku sjemenika, ali može se generalno klasificirati u tri vrste: sindrom 'samo Sertolijevih stanica' (SCOS), maturacijskim arestom (MA) u različitim fazama spermatogeneze te hipospermatogenezom (HS).

1.2.1. Duktalna opstrukcija ili disfunkcija

Nakon što se spermiji proizvedu u sjemeniku moraju proći kroz sustav odvodnih kanala kako bi ejakulacijom mogli završiti u ženskom spolnom sustavu. Taj sustav se sastoji od rete testis, eferentnih duktusa, epididimisa, vas deferensa, ejakulatornih duktusa i uretre. Prostata i sjemenski mjehurići izlučuju sekret koji čini sjemenu tekućinu, a zajedno sa spermijima ejakulat. Bilo kakav poremećaj u ovom sustavu može negativno utjecati na plodnost muškarca (4). Urođeni (kongenitalni) nedostatak vas deferensa (CAVD) dovodi do nedostatka repa epididimisa, vas deferensa i sjemenih mjehurića koji proizvode 70 % sjemene tekućine te se ejakulat sastoji samo od sekreta prostate. Incidencija CAVD-a u pacijenata s azoospermijom je između 4 % i 17 % (4). CAVD je objašnjiv mutacijom CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) gena u 75-85 % slučajeva, mutacijom ADGRG2 (engl. *Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2*) gena u 5-10 % slučajeva, a preostalih 10-15 % slučajeva je trenutno neobjašnjive genetske etiologije (31). CAVD se redovito nalazi u oboljelih od cistične fibroze te se sam za sebe smatra blagim oblikom te bolesti (32). Bilo koja namjerna ili idiopatska ozljeda duktalnog sustava može dovesti do neplodnosti. Primjeri su vazektomija, okluzija epididimisa te prethodna operacija ingvinalne hernije (33).

1.2.2. Poremećaji hipotalamo-hipofizne osovine

Gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH) i gonadotropini folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH) su ključni za reproduktivnu i seksualnu funkciju. FSH stimulira proizvodnju spermija u sjemeniku, dok LH stimulira proizvodnju testosterona u Leydigovim stanicama sjemenika. Produkcija spermija ovisna je o djelovanju FSH i LH u sjemeniku. Djelovanje LH odvija se preko stimulacije Leydigovih stanica na proizvodnju testosterona te tako održavaju koncentraciju testosterona u sjemeniku oko 100 puta višom nego što je koncentracija u krvi. Budući da spolne stanice nemaju receptore za FSH i androgene, oni svoj utjecaj na spermatogenezu ostvaruju preko Sertolijevih stanica (34,35). Sertolijeve stanice potaknute kompleksnom interakcijom spolnih stanica i FSH izlučuju inhibin B koji pak negativnom povratnom spregom inhibira izlučivanje FSH (36,37). Negativna povratna sprega preko testosterona zaslužna je i za regulaciju razine LH (38). Izlučivanje FSH i LH regulirano je hipotalamo-hipofizno-gonadalnom osovinom, što uključuje izlučivanje gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) iz hipotalamusa, koji zauzvrat stimulira

izlučivanje FSH i LH iz hipofize (39). Hipogonadotropni hipogonadizam je karakteriziran nedovoljnim izlučivanjem FSH i LH koje može biti uzrokovano primarnom lezijom u hipofizi ili sekundarno insuficijencijom GnRH iz hipotalamusa. Poremećaji hipotalamo-hipofizne osovine mogu biti prirođeni (Kallmanov sindrom) ili mogu biti uzrokovani ablacijom (resekcija ili radioterapija), infiltracijom (sarkoidoza, tuberkuloza, gljivična infekcija, hemokromatoza), kompresijom (adenom hipofize) ili supresijom (upotreba egzogenih androgena) hipofize (40). Oko 50 % kongenitalnog hipogonadotropnog hipogonadizma (CHH) se može objasniti poznatim genetskim mutacijama (31).

1.2.3. Primarni poremećaji spermatogeneze

U oko 35-40 % slučajeva radi se o stečenim stanjima kao što su varikokela, prethodna kemoterapija ili radioterapija, virusne upale sjemenika, torzija sjemenika, maligne bolesti sjemenika te teške traume u području skrotuma (4). Oko 30 % ostalih slučajeva ima poznatu genetsku podlogu, a 70 % se smatra idiopatskom azoospermijom iako je vjerojatno da barem dio tih slučajeva ima još nepoznatu genetsku podlogu (31).

1.2.3.1. Anomalije kariotipa

Klinefelterov sindrom (KS) je najčešći genetski uzrok NOA-e, a karakterizira ga prisutnost dodatnog X kromosoma. Prisutan je u 3-4 % neplodnih muškaraca te 10-12 % muškaraca s azoospermijom (41). Više od 60 % pacijenata je i dalje krivo dijagnosticirano ili ostaje nedijagnosticirano tijekom života zbog blagih oblika bolesti s manjim brojem simptoma. 80-90 % pacijenata ima oblik 47,XXY dok ostatak ima aneuploidiju višeg reda (48, XXXY ili 48, XXYY), strukturne anomalije X kromosoma ili mozaicizam (47, XXY/ 46, XY) (42). Dodatni X kromosom potječe od neuspješnog razdvajanja spolnih kromosoma za vrijeme oogeneze ili spermatogeneze, a rjeđe i za vrijeme početnih dioba zigote (43). Muškarci koji imaju KS su često visoki i mršavi, s dužim nogama i rukama, a KS uključuje i širok spektar drugih simptoma kao što je hipergonadotropni hipogonadizam, ginekomastiju, manji volumen sjemenika (<4 mL) i neurokognitivne deficite (31). Nije u potpunosti jasno što je uzrok poremećaja spermatogeneze u KS, ali primjećuje se fibroza tubula i apoptoza 47, XXY spermatogonija. Spermatogeneza se može odvijati u nekim tubulima što se objašnjava mozaicizmom koji je nastao tijekom embriogeneze ili testikularnim mozaicizmom do kojeg dolazi kad se 47,XXY spermatogonije dijele mitozom (44).

Od ostalih anomalija kariotipa koje uzrokuju azoospermiju treba izdvojiti muški sindrom 46,XX sindrom koji je najčešće uzrokovan translokacijom SRY segmenta Y kromosoma na X kromosom tijekom mejoze. Najčešće su potpuno razvijene vanjske i unutarnje muške genitalije, ali je smanjen volumen sjemenika (45). Sindrom može rjeđe biti uzrokovan i duplikacijom SOX9 i drugih gena bez translokacije SRY segmenta (46).

Nedostatak dugog kraka kromosoma Y (Yq) također uzrokuje azoospermiju budući da se tamo nalazi AZF regija kromosoma koja regulira spermatogenezu. Pacijenti imaju SCOS i manje sjemenike što odgovara fenotipu mikrodelecije AZFa regije kromosoma.

1.2.3.2. Mikrodelecije Y kromosoma

Azoospermia „factor“ (AZF) regija na dugom kraku kromosoma Y (Yq) sadrži mnogo gena povezanih sa spermatogenezom te mikrodelecije u tom području mogu biti uzrokom neplodnosti. Učestalost AZF mikrodelecija u neplodnih muškaraca je oko 3 % dok je učestalost u muškaraca s azoospermijom oko 7 % (47). Postoji 5 fragilnih mjesta u AZF regiji na kojima najčešće dolazi do mikrodelecija. Najčešće je to AZFc podregija (80 %), a delecija u toj podregiji uzrokuje varijabilnu kliničku sliku od oligozoospermije do azoospermije. Pacijenti koji imaju azoospermiju imaju različitu histološku sliku sjemenika, od dijagnoze SCOS do HS (31). Delecija u AZFa podregiji je sljedeća po učestalosti (0.5-4 %) te uzrokuje histološku sliku SCOS-a, a nakon nje slijede delecija u AZFb podregiji (1-5 %) koja uzrokuje histološku sliku MA te delecija u AZFbc podregiji (1-3 %) (48).

1.2.3.3. Monogenska azoospermija

Azoospermija može biti uzrokovana i mutacijama pojedinačnih gena. 1 % slučajeva NOA-e je uzrokovana mutacijom gena TEX11 koji klinički uzrokuje histološku sliku MA. Još oko 4 % slučajeva NOA-e je uzrokovano mutacijama drugih poznatih gena. Geni koji su kandidati za SCOS fenotip su FANCA, PLK4 i WKN3, dok su ostali geni kandidati za MA fenotip MEI1, MEIOB, SYCE1, STAG3 i SETX. Mutacije nekih gena nisu povezane s jedinstvenom histološkom slikom, već su povezane s histološkom slikom koja varira od SCOS do HS. Ti geni su DMRT1, FANCM, NANOS2, TEX14, TEX15, NR5A1, WT1, TAF4B, TDRD9 te M1AP (31).

1.3. Dijagnostika i liječenje neplodnog muškarca

1.3.1. Prvi pregled

Pri prvom pregledu neplodnog muškarca potrebno je uzeti anamnezu pacijenta s naglaskom na moguće uzroke neplodnosti (Slika 1). U dijagnostičku procjenu neplodnog muškarca treba uključiti i paralelnu procjenu statusa plodnosti ženske partnerice uključujući procjenu rezerve jajnika, budući da to može utjecati na donošenje odluka u smislu vremena i terapijskih strategija. Anamneza ženske partnerice uključuje pitanja o menstruaciji, prethodnoj plodnosti ili neplodnosti te prethodnom liječenju neplodnosti. U anamnezu neplodnog muškarca treba uvrstiti pitanja o seksualnom razvoju, uključujući spuštanje sjemenika, razvoj u pubertetu, gubitak dlakavosti i smanjenu frekvenciju brijanja. Treba uklopiti i pitanja o sistemskim bolestima ili povijesti ozbiljnih trauma glave, operacije ili zračenja koji bi mogli uzrokovati hipogonadotropni hipogonadizam. Važno je pitati i o infekcijama kao što su zaušnjaci, spolno prenosive bolesti i upale genitourinarnog trakta te operacijama i traumama u zdjelici i genitalnom području. Dodatno treba uključiti i pitanja o lijekovima i okolišnim čimbenicima koji mogu negativno utjecati na hipotalamo-hipofizno-testikulanu os kao što su alkohol, nikotin, opiodi, steroidi, kemoterapija i radioterapija te seksualnoj povijesti koja uključuje pitanja o libidu i učestalosti seksualnih odnosa(12). Neplodni muškarci imaju veći rizik od malignih bolesti te veći mortalitet od kardiovaskularnih bolesti tako da ih je potrebno i prikladno savjetovati i dijagnostički obraditi (28).

Pri prvom pregledu potrebno je i pregledati pacijenta kako bi se utvrdilo opće zdravlje, pretilost te znakovi određenih endokrinopatija koje mogu utjecati na plodnost muškarca (Slika 1). Pregledom kože može se utvrditi hiperpigmentacija koja bi mogla ukazivati na prezasićenost željezom, tanka koža, ekhimoze i strije koje mogu ukazivati na Cushingov sindrom te gubitak muške dlakavosti i smanjena masnoća kože koja može ukazivati na dugotrajni nedostatak testosterona. Pregled vanjskih genitalija može otkriti smanjeni volumen sjemenika i druge znakove nepotpunog puberteta te uputiti na nepotpuni seksualni razvoj kao uzrok neplodnosti. Pregled može otkriti i nedostatak sjemenovoda, zadebljanje epididimisa i velike varikokele koji mogu ukazivati na probleme u sazrijevanju i transportu spermija. Budući da 90 % volumena sjemenika čine sjemenski kanalići, manji volumen sjemenika korelira s

nižom koncentracijom spermija u ejakulatu. Volumen sjemenika se može mjeriti Praderovim orhidometrom ili ultrazvukom (12).

Analiza ejakulata je ključni dio pregleda neplodnog muškarca (Slika 1). Analiza ejakulata sastoji se od određivanja volumena ejakulata te njegovog pH. Mikroskopom se također određuje koncentracija, broj, pokretljivost i morfologija spermija. Utvrđuje se i prisutnost debrisa i aglutinacije spermija, broj leukocita te broj nezrelih spolnih stanica. Uzorak ejakulata bi se trebao prikupiti nakon 2 do 7 dana apstinencije. Analiza ejakulata se treba obavljati prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (49). Ako se nađu ikakve abnormalnosti potrebno je ponoviti analizu (50). Referentne vrijednosti WHO za analizu ejakulata su navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Referentne vrijednosti WHO za analizu ejakulata

Parametri analize ejakulata	Referentna vrijednost
Volumen	1.5 mL (95 % CI 1.4-1.7)
Koncentracija spermija	15 milijuna/mL (95 % CI 12-16)
Ukupni broj spermija	39 milijuna (95 % CI 33-46)
Morfologija	4 % normalnog oblika (95 % CI 3-4)
Vitalnost	58 % živih (95 % CI 55-63)
Progresivna pokretljivost	32 % (95 % CI 31-34)
Ukupna (progresivna i neprogresivna) pokretljivost	40 % (95 % CI 38-42)

1.3.2. Dodatna evaluacija i liječenje

1.3.2.1. Muškarci s normalnim nalazom analize ejakulata

Muškarcima s normalnom analizom ejakulata dodjeljuje se dijagnoza idiopatske neplodnosti. Nakon kompletne evaluacije ženske partnerice za moguće uzroke neplodnosti par se upućuje na metode umjetne oplodnje (12,51). Fragmentacija DNK spermija (SDF) se pokazala kao mogući novi biomarker koji može identificirati neplodne muškarce i pružiti informacije o mogućim ishodima MPO. Glavna prednost izvođenja SDF testiranja u kliničkoj praksi je da upućuje muškarce s normalnim nalazom analize ejakulata na pregled urologu/andrologu. SDF testiranje tim muškarcima može pružiti priliku da isprave reverzibilne

uzroke SDF-a, uključujući promjenu načina života, prepoznavanje infekcija pomoćnih žlijezda i liječenje varikokela kako bi se optimiziralo prirodno začeće ili ishod MPO (Slika 1) (28) .

1.3.2.2. Muškarci s normalnom koncentracijom i abnormalnom morfologijom i/ili smanjenom pokretljivošću spermija

Muškarce s normalnom koncentracijom i abnormalnom morfologijom (teratozoospermija) i smanjenom pokretljivošću spermija (astenozoospermija) upućuje se na MPO (Slika 1) (12,51).

1.3.2.3. Muškarci sa smanjenom koncentracijom spermija

Muškarci s manje od 15 milijuna spermija/ mL ejakulata imaju kvantitativni poremećaj spermatogeneze, a onima koji imaju više od 10 milijuna spermija/mL pristupa se kao idiopatskoj neplodnosti te se upućuju na MPO (51). Muškarci koji imaju manje od 10 milijuna spermija/mL ejakulata se upućuju na daljnje endokrinološko i genetsko testiranje koje se sastoji od određivanja razina FSH, LH i testosterona u krvi te analize kariotipa i testiranja na Y mikroleucije (Slika 1).

Niska razina FSH, LH i testosterona upućuje na hipogonadotropni hipogonadizam kao etiologiju poremećaja spermatogeneze. U toj situaciji postoji opcija hormonske terapije, odnosno kombinirane terapije hCG i FSH. Budući da normalna spermatogeneza traje oko 3 mjeseca, rezultati se očekuju za 3 do 6 mjeseci. Za liječenje neplodnosti ne preporučuje se koristiti nadomjesnu terapiju testosteronom (28). Tim pacijentima potrebno je odrediti i koncentraciju prolaktina budući da hiperprolaktinemija može uzrokovati hipogonadizam. Ako je hiperprolaktinemija uzrokovana lijekovima, prekida je uzimanje lijekova ako je to moguće, a ako je uzrokovana laktotropnim adenomom hipofize, liječi se agonistima dopamina (Slika 1) (51).

Kod pacijenata s primarnim zatajenjem funkcije sjemenika može se naći snižena razina testosterona i povišena razina FSH i LH, odnosno hipergonadotropni hipogonadizam. Ti pacijenti često imaju jako oštećene tubule i azoospermiju te se upućuju na MPO. Pacijenti mogu imati i normalnu razinu testosterona i LH te povišeni FSH te različite razine oštećenja spermatogeneze, od oligospermije do nedostatka spermija u sjemeniku te se ovisno o utvrđenom stanju upućuju na odgovarajuće MPO. Muškarci mogu imati i normalne razine svih hormona. Ti pacijenti najčešće imaju spermije u ejakulatu, a ako nemaju upućuju se na daljnje pretrage (Slika 1) (51).

Pacijente s normalnim nalazima FSH, LH i testosterona te azoospermijom upućuje se na transrektalni ultrazvuk kako bi se utvrdila moguća OA. Pacijente kod kojih je utvrđena OA upućuje se i na genetsko testiranje na CFTR mutacije, a potrebno je testirati i partnericu kako bi se par moglo genetski savjetovati oko vjerojatnosti prenošenja mutacije na potomke (28). OA koja je uzrokovana opstrukcijom epididimisa ili vas deferensa može se liječiti kirurški vazovazostomozom ili epididimovazostomozom. Za pacijente kod kojih se utvrdi CBAVD jedina opcija liječenja su metode umjetne oplodnje. Pacijente kod kojih se ne utvrdi OA tretira se kao pacijente s idiopatskom neplodnosti (Slika 1) (51).

Pacijenti kod kojih se utvrdi Klinefelterov sindrom imaju viši rizik od hipogonadizma, trombofilije, metaboličkih, kardiovaskularnih i malignih bolesti te ih je potrebno prikladno savjetovati i pratiti. Pacijenti se upućuju na TESE koji je uspješan u oko 50 % slučajeva (52). Pacijenti s AZFa i AZFb mikrodelecijama se ne upućuju na TESE, a pacijente s AZFc mikrodelecijama treba informirati kako će se mikrodelecije prenijeti sinovima, ali ne i kćerima (28). Uspješnost TESE kod AZFc mikrodelecija je 50-60 % (53).

1.3.3. Metode potpomognute oplodnje

1.3.3.1. IVF/ICSI

Parovima čija neplodnost je primarno rezultat muškog faktora preporučuje se IVF/ICSI metoda. Tijekom klasičnog IVF (*In vitro* fertilization) postupka u laboratoriju se omogućuje najboljim spermijima da oplode jajnu stanicu. ICSI (intracitoplazmatska injekcija spermija) je zahvat kojim se injektira spermij u jajnu stanicu te je primarno metoda liječenja muške neplodnosti. Ako je moguće izolirati spermije uspješnost metode je oko 60 %, a stopa kliničke trudnoće je oko 20 % (54–56).

1.3.3.2. Izolacija spermija

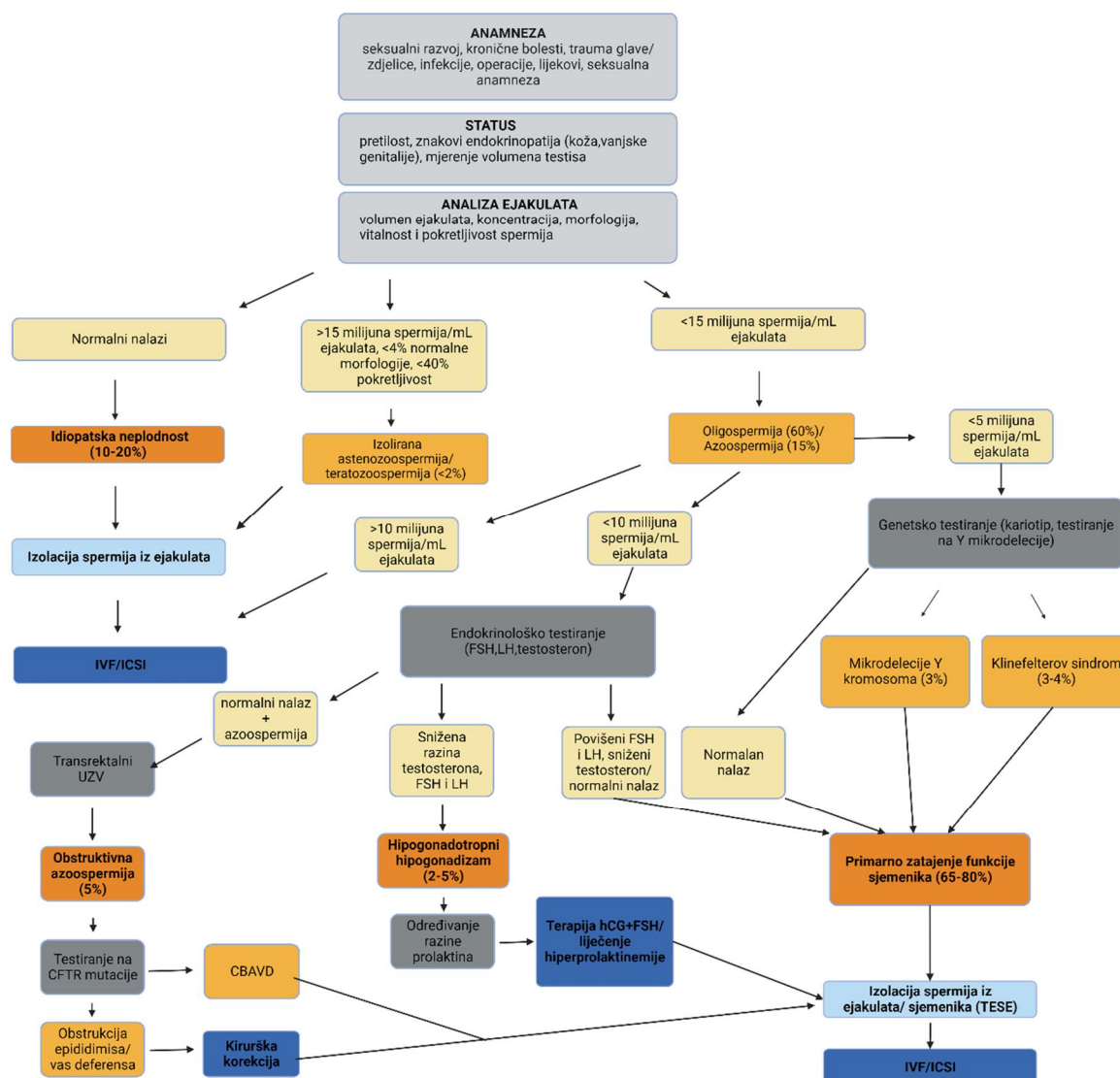
Za potrebe MPO spermiji se mogu izolirati iz ejakulata ili iz urina u slučajevima retrogradne ejakulacije. U slučaju azoospermije potrebno je izolirati spermije iz sjemenika kirurškim metodama. Tri metode su dostupne: testikularna aspiracija spermija (TESA), klasična testikularna ekstrakcija spermija (cTESE) i mikrokirurška testikularna ekstrakcija spermija (mTESE).

TESA se izvodi tako da se tankom iglom iz sjemenika vade vrlo tanki komadići tkiva koje onda klinički embriolog analizira i provjerava ima li u njima spermija. cTESE je metoda

koja uključuje biopsiju sjemenika, odnosno nekoliko manjih rezova na sjemeniku iz kojih se onda vade komadići tkiva kako bi se iz njih mogli ekstrahirati spermiji. mTESE je modificirani oblik TESE koji uključuje disekciju sjemenika pod mikroskopom kako bi se otkrila područja u sjemeniku s održanom spermatogenezom (57). Komplikacije ovih postupaka uključuju hematome, infekcije, fibrozu, atrofiju sjemenika, hipogonadizam te rizike povezane s anestezijom (5). Meta-analiza radova koji su uspoređivali uspješnost TESA i cTESE pokazala je da je ukupna uspješnost ekstrakcije spermija za cTESE bila 2 puta veća, dok je meta-analiza radova koji su uspoređivali uspješnost cTESE i mTESE pokazala da je ukupna uspješnost ekstrakcije spermija za mTESE je bila 1.5 puta veća. Opća uspješnost cTESE je oko 45 %, a mTESE do 63 % (58). TESA je povezana s najvišom stopom komplikacija koje se javljaju kod 24 % pacijenata, dok se kod cTESE javljaju u 3-10 % pacijenata, a kod mTESE u oko 2 % pacijenata. Niža stopa komplikacija u mTESE u usporedbi s cTESE pripisuju se uklanjanju manje količine tkiva sjemenika te održavanju krvne opskrbe (59,60). I konvencionalni TESE i mTESE smatraju se kirurškom metodom izbora za muškarce s azoospermijom (28).

1.3.3.3. Krioprezervacija uzoraka

Tkivo sjemenika koje se dobije TESE postupkom može se krioprezervirati kako bi se izbjeglo ponavljanje TESE i nepotrebna hiperstimulacija partnerice. Nedostatak krioprezervacije je oštećivanje tkiva do kojeg dolazi zbog stvaranja ledenih kristala i dehidracije stanica što uzrokuje oštećenje membrane i organela (61). Morfologija, motilitet i vitalnost spermija se značajno smanjuju nakon odmrzavanja, a oštećuje se i DNK spermija (62,63). Zamrzavanje utječe i na histološku sliku tkiva, većinom na bazalni dio epitela (64). Kako bi se smanjilo stvaranje kristala, tkivo se zamrzava u krioprotektivnom mediju u tekućem dušiku, naglo ili postupnim smanjivanjem temperature (tzv. programirano zamrzavanje) (65). Određene razlike u proteomu i lipidnoj kompoziciji spermija su primijećene nakon zamrzavanja ejakulata (66,67), a moguć je i utjecaj krioprezervacije na epigenetički profil spolnih stanica sjemenika (68). Uočeno je i povećanje oksidativnog stresa u tkivu sjemenika s dijagnozom NOA nakon krioprezervacije, dok u tkivu sjemenika s dijagnozom OA nije primijećena razlika što ukazuje na njegovu veću otpornost na oksidativni stres (69). Većina studija ne ukazuje na utjecaj krioprezervacije na klinički ishod MPO, no u nekima je primijećen negativni utjecaj na oplodnju i razvoj embrija (70).



Slika 1. Algoritam dijagnostičke evaluacije i liječenja neplodnog muškarca. Svijetlo siva boja označava dijagnostičke postupke koji se odrađuju prilikom prvog pregleda neplodnog muškarca, dok tamno siva boja prikazuje dijagnostičke postupke koji se odrađuju tijekom daljnje evaluacije. Svijetlo narančasta boja prikazuje rezultate dijagnostičkih testova, dok tamno narančasta boja prikazuje etiologije neplodnosti. Plava boja prikazuje postupke u liječenju neplodnosti.

1.4. Predikcija uspješnosti ekstrakcije spermija

1.4.1. Histološka analiza

Histološka analiza je trenutno jedina metoda koja se koristi za predikciju uspješnosti ekstrakcije spermija (SRR) u sklopu konvencionalne TESE. Muškarci s azoospermijom se upućuju na TESE te se uzima po nekoliko uzoraka tkiva iz svakog sjemenika. Polovica uzorka se histološki procesira i analizira te se ocjenjuje koliko tubula sadržava spermije i zrele spermatide. Na temelju toga se donosi procjena SRR iz druge polovice uzorka koja je krioprezervirana. Uspješnost ekstrakcije spermija je značajno viša u pacijenata s HS nego s dijagnozom MA ili SCOS (71). Ako se procijeni da postoje izgledi za uspješnu ekstrakciju spermija, krioprezervirano tkivo se izdaje ovlaštenoj ustanovi za medicinski pomognutu oplodnju. Ženska partnerica prolazi IVF ciklus koji traje 2 do 3 tjedna i sastoji se od stimulacije jajnika kako bi se što više jajnih stanica razvilo do folikula te aspiracije jajnih stanica. Predikcija SRR se radi kako bi se izbjegla nepotrebna stimulacija partnerice.

Histološka analiza kao predikcija SRR ima i svoje nedostatke. Budući da ova metoda predikcije SRR iziskuje biopsiju sjemenika, ona je invazivna te nosi sa sobom rizike od komplikacija kao što su stvaranje hematoma, infekcija, fibroza, atrofija sjemenika, hipogonadizam te rizike povezane s anestezijom (5). Komplikacije se razvijaju u 3-10 % pacijenata (59,60). Također, histološka slika u pacijenata s dijagnozom NOA može biti dosta heterogena te ne mora biti reprezentirana uzorcima tkiva koji su uzeti za vrijeme biopsije.

1.4.2. Neinvazivne metode predikcije SRR

Neinvazivne metode predikcije omogućile bi izbjegavanje rizika operacije i anestezije za 50-60 % pacijenata (59). Od početaka testikularne ekstrakcije spermija javljaju se pokušaji predikcije uspješnosti, a korišteni su parametri iz anamneze i statusa pacijenata, parametri dobiveni iz krvi, ejakulata, genetskim testiranjem i ultrazvukom te kombinacije navedenih parametara.

O utjecaju anamneze pacijenata pozitivne na kriptorhizam postoje oprečni rezultati u studijama (72)(73), dok je pušenje povezano sa smanjenom uspješnošću ekstrakcije spermija (74). Volumen sjemenika je smanjen u pacijenata s NOA (75), a volumen veći od 12.5 mL

povezan je s većom uspješnosti ekstrakcije spermija (73). Nije primijećena povezanost indeksa tjelesne mase (BMI) s prisutnošću spermija u sjemeniku (76).

Koncentracije hormona u krvi su također korištene za predikciju uspješne ekstrakcije spermija. Prvi koji se koristio bio je FSH i pokazao se prediktivnim u nekoliko studija, no meta-analizom je utvrđeno da ima samo umjerenu prediktivnu vrijednost (77–79). Inhibin B (INHB) i anti-Müllerov hormon (AMH) su u nekim studijama pokazali dobru do odličnu prediktivnu vrijednost, a umjerenu prediktivnu vrijednost je pokazao i njihov omjer INHB/AMH (80), no druge studije su pokazale oprečne rezultate (81,82). Opservirana je i dobra prediktivna vrijednost omjera AMH i testosterona za uspješnost ekstrakcije spermija (83), te koncentracija tRF-Gly-GCC-002 i tRF-Glu-CTC-005 iz egzosoma (84), a značajnima su se pokazali i parametri imunološkog sustava, specifično omjer neutrofila i limfocita, omjer trombocita i limfocita te sistemski indeks upale (85).

Koncentracije određenih proteina u sjemenoj plazmi bi također mogle biti korisne u neinvazivnoj predikciji uspješne ekstrakcije spermija. ECM1 se pokazao korisnim u razgraničavanju između pacijenata s normalnom spermatogenezom i OA te OA i NOA, dok je koncentracija TEX101 mogla razgraničiti između dijagnoze SCOS i ostalih NOA dijagnoza (86). Leptin (87) te PGK2 i ACR (88) su pokazali umjerenu prediktivnost za uspješnu ekstrakciju spermija. Ukupni oksidativni status (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI) su bili viši u sjemenoj plazmi muškaraca kod kojih je ekstrakcija spermija bila neuspješna (89). Koncentracije različitih miRNA i piRNA u sjemenoj plazmi su također značajno različite među skupinama pacijenata s uspješnom i neuspješnom ekstrakcijom spermija te bi se mogle koristiti za predikciju istoga (90–93).

Veličina sjemenskih kanalića određena ultrazvukom pokazala je dobru prediktivnost za uspješnost ekstrakcije spermija (94). Ultrazvučna elastografija, odnosno sonoelastografija, je novija ultrazvučna metoda koja koristi zvučne valove kako bi procijenila mehaničke karakteristike tkiva kao što su elastičnost i krutost u odgovoru na mehanički pritisak. Jedna studija je pokazala da je metoda prediktivna za uspješnost ekstrakcije spermija (95).

Konstruiran je prediktivni model s pomoću umjetnih neuronskih mreža (ANN) koji je sadržavao volumen sjemenika, parametre analize ejakulata, razine FSH, LH, testosterona, prolaktina, estradiola te razinu leptina u krvi i sjemenoj plazmi te je demonstrirao dobru prediktivnu vrijednost (96). Prediktivni model konstruiran koristeći logističku regresiju koji je sadržavao razinu AMH, inhibina B, prisutnost KS i mikrodelecija Y kromosoma, povijest kriptorhizma te dijagnozu idiopatske NOA bio je umjereno prediktivan za uspješnu ekstrakciju

spermija (97). Model konstruiran uz pomoć strojnog učenja na temelju razine FSH, LH i testosterona, volumena ejakulata, dobi, BMI, etničkog podrijetla te volumena sjemenika pokazao je dobru prediktivnost (98). Drugi model konstruiran uz pomoć strojnog učenja koristio je varijable godina, BMI, pušenje u anamnezi, razine hormona (FSH, LH, testosteron, inhibin B i prolaktin), genetske varijable (kariotip, mikrolelecije Y kromosoma), i podatke iz anamneze (kriptorhizam, infekcije, traume, gonadotoksičnu terapiju, urogenitalne operacije i varikokele) te je imao odličnu prediktivnost za uspješnu ekstrakciju spermija (99). Svi neinvazivni parametri koji su korišteni za predikciju SRR te vrijednosti AUC, osjetljivost, specifičnost te pozitivna i negativna prediktivna vrijednost prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Ocjena prediktivnosti neinvazivnih metoda predviđanja SRR. Za svaku metodu prikazani su AUC, osjetljivost, specifičnost te pozitivna i negativna prediktivna vrijednost ako su bili raspoloživi u literaturi. Parametri s AUC između 0.7 i 0.8 smatraju se umjereno prediktivnim, parametri s AUC iznad 0.8 imaju dobru prediktivnost, dok se AUC iznad 0.9 smatra odličnim.

Parametar	AUC	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV
FSH (S) (77)	0.72	-	-	-	-
INHB (S) (82)	0.801	59.14 %	92 %	-	-
INHB/AMH (S) (80)	0.76	86.3 %	53.8 %	-	-
INHB/FSH (S) (81)	0.814	56.99 %	96 %		
AMH (S) (83)	0.93	100 %	82 %	79 %	100 %
AMH/testosteron (S) (83)	0.95	100 %	82 %	79 %	100 %
tRF-Gly-GCC-002 (S)	0.921	-	-	-	-
tRF-Glu-CTC-005 (S) (84)	0.954				
Leptin (E) (87)	0.747	73.3 %	75 %	-	-
Veličina sjemenskih kanalića (UZV)(94)	0.82	76.7 %	80.7 %	-	-
Shear wave elastografija (SWE) (95)	0.869	75 %	85.71 %	50 %	94.7 %

Prediktivni model (FSH, LH, testosteron, prolaktin, estradiol, leptin) (96)	0.83	-	-	-	-
Prediktivni model (AMH, inhibin B, KS i mikrolelecije Y kromosoma, kriptorhizam) (97)	0.72	65.7 %	72.2 %	-	-
Prediktivni model (FSH, LH, testosteron, volumen ejakulata, dob, BMI, etničko podrijetlo, volumen sjemenika) (98)	0.807 0.75	91 % 97 %	57 % 25 %	-	-
Prediktivni model (godine, BMI, pušenje, genetski testovi, razine hormona, podaci iz anamneze) (99)	0.9	100 %	69.2 %	-	-

1.4.3. Neinvazivna predikcija SRR pomoću snimanja magnetskom rezonancijom

Magnetska rezonancija (MR) je fenomen u kojem jezgre molekula apsorbiraju radiofrekvencijsko zračenje (RF) kad frekvencija zračenja postane jednaka frekvenciji precesije jezgre izložene jakom magnetskom polju. Količina apsorbirane energije ovisi o biokemijskom okruženju jezgre vodika što se koristi za snimanje anatomskih i fizioloških procesa u tijelu. Različite sekvence snimanja magnetskom rezonancijom (MRI) omogućuju prikupljanje različitih informacija o samom tkivu. Nakon RF ekscitacijskog pulsa dolazi do relaksacije spina jezgre od transverzalne ravnine prema longitudinalnom vektoru magnetskog polja, a sekvenca koja demonstrira razlike u vremenu relaksacije naziva se T1 sekvenca. U isto vrijeme spinovi jezgre se relaksiraju u transverzalnoj ravnini, a sekvenca koja demonstrira razlike u tom vremenu relaksacije naziva se T2 sekvenca. Difuzijsko snimanje (DWI) koristi

difuziju molekula vode za generiranje kontrasta, budući da ista može biti smanjena u tkivima s većom gustoćom stanica. Taj efekt se kvantificira računanjem prividnog difuzijskog koeficijenta (ADC) koji je u takvim tkivima niži (100). Studije su pokazale da pacijenti s HS (101), NOA (75,102,103) te stariji muškarci (104,105) imaju viši ADC. Medijan vrijednosti ADC-a za cijeli sjemenik je bio prediktivan za uspješnu ekstrakciju spermija (106). Snimanje difuzijskog tenzora (DTI) omogućuje izračun dodatnih parametara poput frakcionalne anizotropije (FA) koja opisuje usmjerenost difuzije. Neka istraživanja ukazuju na povišeni FA u pacijenata s NOA u usporedbi s kontrolama, što se povezuje s kompleksnim histološkim promjenama do kojih dolazi u takvom tkivu od faktora koji povećavaju usmjerenost difuzije kao što je sužavanje tubula, do faktora koji smanjuju usmjerenost difuzije kao što je smanjeni broj stanica i prisutnost ostataka oštećenih stanica (102). Snimanje prijenosa magnetizacije (MTI) je bazirano na prijenosu energije između protona vezanih za makromolekule i mobilnih protona u molekulama vode. Kad RF impuls pobudi makromolekule, magnetska energija prenosi se slobodnoj vodi, što rezultira smanjenim signalom vode. Ova pojava kvantificira se omjerom prijenosa magnetizacije (MTR), koji je veći u tkivima s većom gustoćom makromolekula (101). MTR je u studijama bio niži kod starijih muškaraca (104) i muškaraca s hipospermatogenezom (101), ali i viši u muškaraca s azospermijom u usporedbi s kontrolama (75).

Jezgre atoma vodika u različitim molekulama imaju različite rezonantne frekvencije, na temelju čega s pomoću spektroskopije magnetskom rezonancijom (MRS) možemo odrediti koncentracije određenih metabolita u tkivu. Kolin i fosfokolin su prekursori fosfolipida, specifično fosfatidilkolina i sfingomijelina, koji su dijelovi stanične membrane i membrane organela (107). Kreatin i fosfokreatin su prekursori u sintezi ATP-a te se nalaze 95 % u skeletnim mišićima, dok se ostatak nalazi u ostalim tkivima koja zahtijevaju puno energije kao što su mozak, jetra, bubrezi i sjemenik (108). Mio-inozitol je šećer koji se sintetizira iz glukoze i prisutan je najviše u mozgu, a služi kao drugi glasnik više receptora, kao što su receptori za FSH i inzulin. Mio-inozitol i njegova sposobnost da poveća osjetljivost receptora na inzulin koristi se i u liječenju sindroma policističnih jajnika (109). Mio-inozitol se u visokoj koncentraciji nalazi u tubulima u sjemeniku, a enzimi za sintezu se nalaze u spolnim i Sertolijevim stanicama. Važan je osmoregulator u sjemenim kanalčićima, dio je fosfolipidne membrane i djeluje kao antioksidans (109). Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor, a sintetizira se iz aminokiseline glutamina (110). Utjecaj glutamata na funkciju sjemenika je i dalje nejasan, no receptori za glutamat prisutni su u sjemeniku te postoje teorije da utječe na

funkciju Sertolijevih i Leydigovih stanica (111). Poveznica između više koncentracije glutamata i neuspješne ekstrakcije spermija je objašnjena s mogućnošću da Sertolijeve stanice za proizvodnju laktata koriste glutamat te se tako smanjuje njegova koncentracija u tkivu (112). Prethodne studije su utvrdile da su u sjemenicima muškaraca s više spermija prisutne više razine kolina, fosfokolina, mio-inozitola, kreatina, određenih lipida i makromolekula, a niže razine taurina. Povišena razina glutamata je primijećena u muškaraca kod kojih je ekstrakcija spermija bila neuspješna, dok je viša razina kolina, kreatina i mio-inozitola bila prediktivna za uspješnu ekstrakciju spermija (112–119). Povezanost parametara dobivenih snimanjem magnetskom rezonancijom prikazana je u Tablici 3.

Niti jedna studija do sad nije istražila mogućnost predikcije histološke slike odnosno prisutnosti spermija u tkivu sjemenika. Snimanje sjemenika magnetskom rezonancijom je neinvazivna metoda kojom bi se izbjegli potencijalni rizici za pacijente koje nosi biopsija sjemenika. Također je moguće snimiti cijeli sjemenik te tako dobiti kompletnu sliku spermatogeneze u sjemeniku. Iz tih razloga, u ovoj studiji konstruirat će se prediktivni model koristeći logističku regresiju i ANN temeljen na snimanju magnetskom rezonancijom.

Tablica 3. Povezanost parametara dobivenih snimanjem magnetskom rezonancijom s količinom spermija u tkivu.

MR parametar	Povezanost s količinom spermija u tkivu
ADC	- (106)
FA	- (102)
MTR	+ (101) / - (75)
Kolin	+ (119)
Kreatin	+ (119)
Mio-inozitol	+ (119)
Glutamat	- (112)
Taurin	- (112)

2. HIPOTEZA

Parametri tkiva sjemenika dobiveni magnetskom rezonancijom omogućuju predikciju prisutnosti spermija u uzorku te ukazuju na promjene u metabolizmu i morfologiji tkiva uslijed krioprezervacije.

3. SVRHA I CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

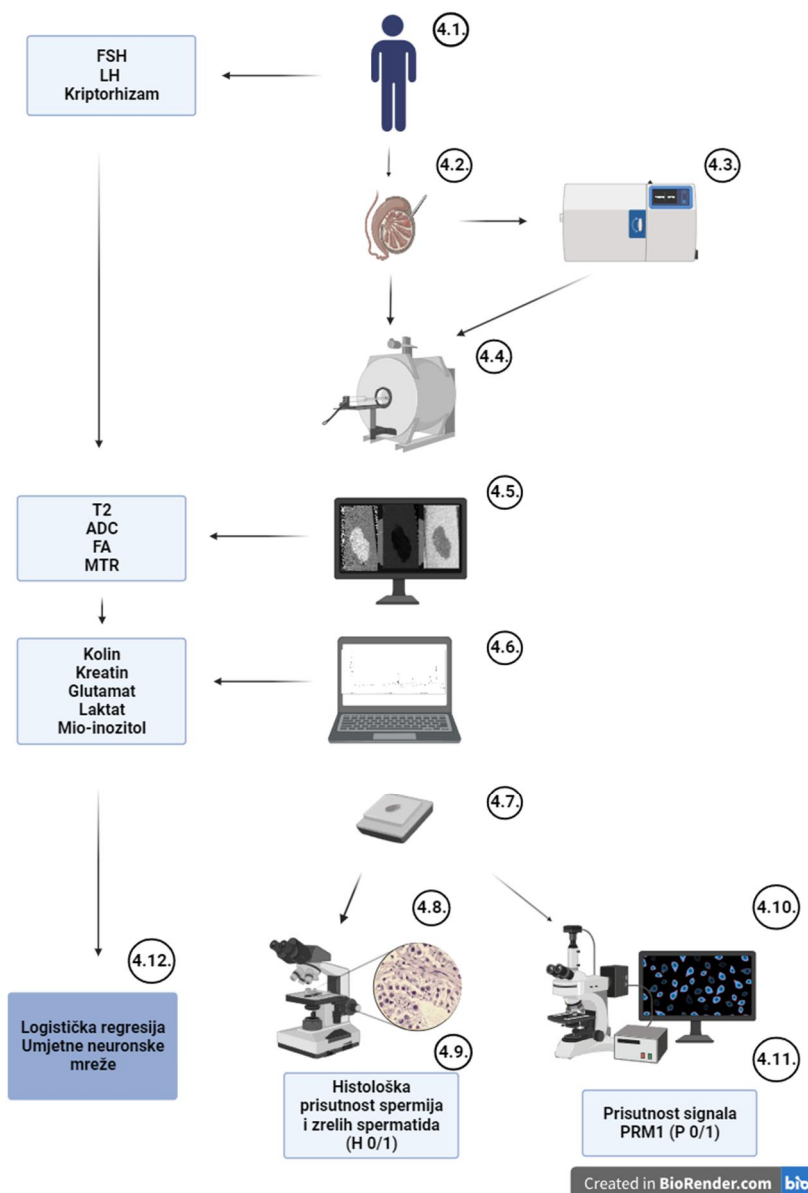
Uspostaviti prediktivni model za prisutnost spermija u tkivu sjemenika temeljen na parametrima dobivenim MRI i MRS snimanjima i podacima iz anamneze pacijenata te odrediti utjecaj krioprezervacije na tkivo sjemenika.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti i usporediti parametre dobivene MRI snimanjem u svježim i krioprezerviranim bioptatima sjemenika, u bioptatima s i bez spermija te između različitih histoloških skupina.
2. Odrediti i usporediti razine metabolita dobivene MRS snimanjem u svježim i krioprezerviranim bioptatima sjemenika, u bioptatima s i bez spermija te između različitih histoloških skupina.
3. Histološki analizirati i ocijeniti bioptate sjemenika prema Johnsenovoj skali te usporediti svježe i krioprezervirane uzorke.
4. Razviti prediktivni model za prisutnost spermija u bioptatima sjemenika temeljen na parametrima tkiva dobivenim snimanjima magnetskom rezonancijom te podacima iz anamneze pacijenta.

4. MATERIJALI I METODE

Proces istraživanja prikazan je u obliku dijagrama u Slici 2.



Slika 2. Dijagram toka istraživanja: proces se sastojao od probira pacijenata (4.1.) za testikularnu ekstrakciju spermija (4.2.), programiranog zamrzavanja uzoraka (4.3.), snimanja uzoraka magnetskom rezonancijom (4.4.), obrade slika i određivanja parametara (4.5.), određivanja koncentracije metabolita iz spektara (4.6.), histološkog procesiranja tkiva (4.7.), klasičnog histološkog bojenja hemalaun-eozinom (4.8.), analize obojenih stakala (4.9.), imunofluorescentnog bojenja (4.10.), analize ekspresije PRM1 (4.11.) te statističke obrade podataka (4.12.).

4.1. Pacijenti

Neplodnost se definira kao nemogućnost ostvarivanja kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih spolnih odnosa. Muškarci sa sumnjom na neplodnost su upućeni u urološku ambulantu gdje su im uzeti status i anamneza. Anamneza je uključivala pitanja o seksualnom razvoju uključujući povijest i liječenje kriptorhizma i varikokele, kroničnim i malignim bolestima, traumama glave i zdjelice, infekcijama kao što su zaušnjaci ili bakterijskim infekcijama reproduktivnih organa, prethodnima operacijama, lijekovima, seksualnoj anamnezi te izloženosti pesticidima, teškim metalima ili dimu cigareta. Status je uključivao procjenu pretilosti, znakova endokrinopatija, pregled vanjskih genitalija (kriptorhizam, varikokela) te procjenu volumena sjemenika. Pacijenti su upućeni i na analizu ejakulata gdje im je analiziran broj, morfologija i pokretljivost spermija. Pacijenti s azoospermijom (nedostatkom spermija u ejakulatu) su upućeni na endokrinološku obradu koja je uključivala određivanje razina FSH, LH i testosterona te na genetsko testiranje koje se sastojalo od kariotipizacije te testiranja na mikrolelecije Y kromosoma. Pacijenti s normalnim nalazima upućeni su i na dodatne obrade kao što je analiza CFTR mutacija te ultrazvuk za utvrđivanje opstrukcije ili disfunkcije sjemenovoda kao mogućeg uzroka azoospermije. Ako je utvrđenu opstrukciju bilo moguće kirurški liječiti pacijenti su upućeni na operaciju. Pacijentima kod kojih je utvrđen hipogonadotropni hipogonadizam (sniženi FSH, LH i testosteron) uvedena je hormonska terapija. Pacijenti s azoospermijom koju nije moguće liječiti te oni kod kojih je liječenje bilo neuspješno upućeni su na TESE. U ovo istraživanje su bili uključeni pacijenti (n=31) s dijagnosticiranom azoospermijom koji su upućeni na testikularnu ekstrakciju spermija (tzv. cTESE).

4.2. TESE (Testikularna ekstrakcija spermija)

TESE se izvodio pod spinalnom anestezijom. Kirurški rez prošao je kroz kožu, dartalni mišić i tunicu vaginalis. Nakon što su sjemenik i pasjemenik vizualizirani, napravljena su tri reza kroz tunicu albugineu na svakom sjemeniku (Slika 3) i uzeto je nekoliko uzoraka iz svakog sjemenika za eventualnu ekstrakciju spermija. Polovica svakog uzorka je odvojena u medij za zamrzavanje (Quinn's Advantage™ Sperm Freezing Medium, CooperSurgical,

Danska) dok je druga polovica odvojena za histološko procesiranje i analizu te odmah stavljena u 10 %-tni formalin (Formalin FC10, BioGnost, Hrvatska). Za potrebe istraživanja prikupljen je po jedan dodatni uzorak iz lijevog i jedan iz desnog sjemenika. Jedan uzorak je podijeljen na pola i jedna polovica je odvojena u medij za zamrzavanje, dok je druga polovica stavljena u transportni medij (Sydney IVF Gamete Buffer, Cook, SAD ili ORIGIO® Sperm Wash, CooperSurgical, Danska) i odvojena za snimanje magnetskom rezonancijom. Uzorak iz drugog sjemenika je cijeli određen za snimanje magnetskom rezonancijom.



Slika 3. Prikaz biopsije sjemenika.

4.3. Programirano zamrzavanje uzoraka

Programirano zamrzavanje uzoraka se odvijalo u uređaju Nicoool LM 10 (Air Liquide). Uzorci u krioampulama s medijem za zamrzavanje su stavljani u postolje uređaja, a u posudu uređaja koja se nalazi u podnožju je uliven tekući dušik. Nakon što se uređaj uključi, ventilator raspršuje pare tekućeg dušika po uzorcima te temperatura u roku 5 minuta pada na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. U narednom koraku tijekom sat vremena, uređaj snižava temperaturu na $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ te se pali zvučni alarm nakon kojeg se uzorci manualno spuštaju u tekući dušik. Uzorci su nakon toga preneseni do kriospremišta u transportnom spremniku za tekući dušik (Agar Scientific) te premješteni u

spremnike s tekućim dušikom u Banci sjemenika gdje su skladišteni do eventualnog izdavanja tkiva za ekstrakciju spermija.

4.4. Snimanje magnetskom rezonancijom

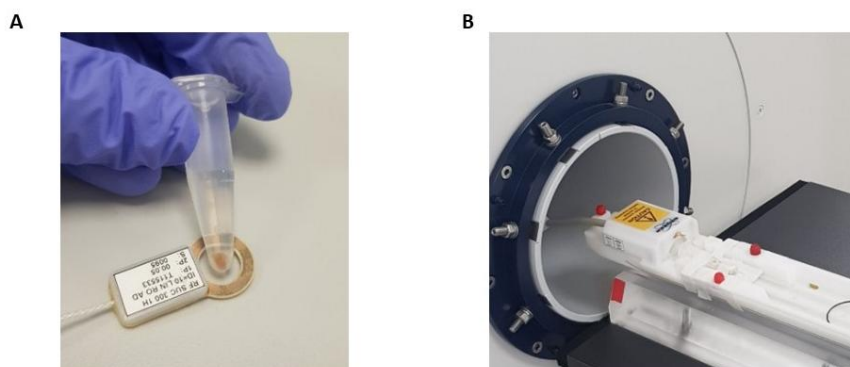
Svježi uzorci su prebačeni iz transportnog medija u plastičnu tubicu od 1.5 mL s fiziološkom otopinom (0,9 % NaCl otopina, Gram-mol, Hrvatska) Zamrznuti uzorci su prvo stavljeni u vodenu kupelj temperature 37 °C na 5 minuta kako bi se odmrznuli te su onda prebačeni u plastičnu tubicu od 1.5 mL s fiziološkom otopinom. U tubicu je dodana staklena kapilara koja sadrži tetrametilsilan (TMS), tvar koja je korištena kao unutarnji standard za kalibriranje spektra dobivenog snimanjem spektroskopijom magnetskom rezonancijom. Uzorci su snimani na pretkliničkom uređaju Bruker BioSpec 70/20 USR (Bruker BioSpin, Ettlingen, Njemačka) magnetskog polja jakosti 7T u Tx/Rx konfiguraciji koristeći volumnu zavojnicu od 86 mm (MT0381, Bruker BioSpin) za odašiljanje (Tx) i planarnu zavojnicu promjera 10 mm (MT0105-10; Bruker Biospin) za prijam (Rx) (Slika 4).

Program Paravision 7 (Bruker BioSpin) korišten je za praćenje snimanja i upravljanje sekvencama. Protokol za snimanje sastojao se iz pripremnih i glavnih snimanja.

Pripremna snimanja uključivala su pilot snimke tipa T2 u tri ortogonalne ravnine (koronalna, aksijalna i sagitalna) realizirane sekvencom TSE (Turbo Spin Echo) kako bi se mogle postaviti pozicije snimanih presjeka tkiva ostalih sekvenci te dodatnu TSE snimku više rezolucije (T2_30ms) koja je služila kao provjera zadane geometrije prije glavnih snimki. Pripremno snimanje uključivalo je također, i sekvencu za lokalnu optimizaciju homogenosti magnetskog polja tipa MAPSHIM radi postizanja maksimalne moguće kvalitete kasnijih difuzijskih snimaka.

Glavna snimanja uključivala su PRESS sekvencu za snimanje spektra odziva jezgre vodika radi kvantifikacije metabolita u uzorku te 3D TSE sekvencu za snimanje T2 snimke istog vokselu, kako bi se mogao precizno izmjeriti volumen uzorka. Dio PRESS sekvence je suprimiranje signala vode kako voda, čija koncentracija je oko 10000 puta veća od koncentracije metabolita u tkivu, ne bi dominirala spektrom do razine da se ne mogu izmjeriti koncentracije metabolita. U našem protokolu supresija je optimizirana dok signal vode nije bio maksimalno 3 puta veći od signala metabolita najveće koncentracije. Osim toga, snimljene su Spin Echo (SE) sekvence za snimanje relaksometrijske T2 mape uzorka te dvije uparene Gradient Echo (GE) T2* snimke, s i bez dodatnog impulsa za pobuđivanje makromolekula,

radi mapiranja omjera prijenosa magnetizacije (Magnetization Transfer Ratio, MTR) na uzorku. Konačno, realizirana su i Spin Echo snimanja difuzijskog tenzora (Spin Echo Diffusion Tensor Imaging, SE-DTI) radi generiranja ADC i FA mapa. Parametri snimanja i geometrijske postavke svih sekvenci navedeni su u Tablici 4. Neto trajanje protokola snimanja bilo je oko 90 min, a cijeli postupak trajao je oko 2.5 h po uzorku.



Slika 4. Snimanje uzoraka magnetskom rezonancijom.

Tablica 4. Protokol snimanja uzoraka sjemenika magnetskom rezonancijom. (TR=vrijeme ponavljanja, TE=vrijeme odjeka, NA= broj usrednjavanja, ES = razmak odjeka, RARE = faktor ubrzanja, NE=broj odjeka, BW= širina frekvencijskog pojasa prijavnika, RES= rezolucija, N_{sl}= broj presjeka, D_{sl}= debljina presjeka)

NAZIV SEKVENCE	TIP SEKVENCE	PARAMETRI SNIMANJA	GEOMETRIJSKE POSTAVKE
00_WOBBLE_POSITION	Position	TR = 500 ms NA = 1	FOV= 86x86x86 mm ³
01a_Localizer_axi_TurboRARE	TSE	TE = 45 ms TR: 2500 ms NA: 2 RARE = 8	Orijentacija: aksijalna N _{sl} : 7 D _{sl} = 0,7 mm RES: 200x200 μm
01b_Localizer_sag_TurboRARE	TSE	TE: 45 ms TR: 2500 ms NA: 2 RARE = 8	Orijentacija: sagitalna N _{sl} : 5 D _{sl} : 0,7 mm RES: 200x200 μm
01c_Localizer_cor_TurboRARE	TSE	TE: 45 ms TR: 2500 ms NA: 2 RARE = 8	Orijentacija: sagitalna N _{sl} : 5 D _{sl} : 0,7 mm RES: 200x200 μm
02_Localized_shim	MAPSHIM	NA: 4	
03_T2_30ms	TSE	TE: 30 ms	Orijentacija: sagitalna

		TR: 3000 ms NA: 12 ES: 7.5 ms RARE: 8	N _{sl} : 9 D _{sl} : 0,4 mm RES: 100x100 μm
04a_CERRM_PRES S_spectroscopy_navi gator_OVS	PRESS	TE: 13.184 ms TR: 6000 ms BW: 3000 Hz NA: 128	FOV: 40x40x40 mm ³
04b_T2_3D_voxelVo lumetry	3D-TSE	TE: 56 ms TR: 3000 ms NA: 2 RARE: 16 ES = 7 ms	FOV: 6.5 x 5.5 x 6.5 mm ³ Orijentacija: aksijalna N _{sl} : 1 D _{sl} : 5 mm RES: 162.5x157.14x162.5 μm
05_T2map_MSME	MSME	TE: {8,16, ...,120} ms TR: 2700 ms NE: 15 NA: 8	Orijentacija: sagitalna N _{sl} : 9 D _{sl} : 0,4 mm RES: 120x120 μm
06_T2star- MTC_25ut-2000	MGE	TE: 2,5 ms TR: 332,358 ms NA: 8 BW: 500 Hz Offset: 2000 Hz B: 25.6 μT	Orijentacija: sagitalna N _{sl} : 9 D _{sl} : 0,4 mm RES: 100x100 μm
07_DTI_SE	Spin echo DTI	TE: 16,5 ms TR: 2500 ms NA: 1 n _B : 2x15 n _{A0} :5 B: 500/1000 s/mm ²	Orijentacija: sagitalna N _{sl} : 9 D _{sl} : 0,4 RES: 120x120 μm

4.5. Obrada slika i određivanje parametara

Obrada i analiza izmjerenih rezultata i snimaka izvršena je u programima ImageJ i MATLAB. Prije analize, nativne snimke iz Paravisiona (2dseq binarni dokument) pretvorene su u univerzalni „NifTI“ format pomoću programa Bru2Nii (GitHub Inc., San Francisco, SAD) kako bi se mogli učitati u ImageJ (ImageJ1.53i software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Kensington, SAD) program za analizu slika.

4.5.1. Određivanje srednjeg T2 vremena relaksacije uzorka

Budući da su uzorci odvojeni od sjemenika i snimani ex-vivo u fiziološkoj otopini ona je u jednoj mjeri prodrla u tkivo te maskirala signal tkiva. Kako bi se odvojio signal vode od signala tkiva za analizu T2 snimki uzoraka napisana je skripta u MATLAB-u (MATLAB, MathWorks, Portola Valley, SAD) koja primjenom dvokomponentnog modela relaksacije iz sirovih podataka MSME sekvence istovremeno izračunava T2 vrijednosti vode i tkiva te njihov relativni udio u volumenu danog vokselu. Kreirana je i makronaredba koja iz tako dobivenih podataka o postotku tkiva u vokselima i T2 vrijednosti tkiva računa korigiranu srednju vrijednost T2 vrijednost uzorka (Slika 5).

Spin-spin relaksacija koja proizvodi T2 tip kontrasta pri snimanju magnetske rezonancije uobičajeno se opisuje monoekspencijalnom funkcijom (120)

$$S = S_0 e^{-TE/T2} \quad (4.1)$$

gdje TE označava vrijeme odjeka, a $T2$ konstantu relaksacije za promatrano tkivo. S_0 je početna jakost signala koja je proporcionalna broju jezgara u magnetskom polju pobuđenih RF impulsom. Jednadžba (4.1) pretpostavlja da je sastav tkiva u promatranom vokselu jednolik te ga se dovoljno približno može opisati koristeći samo jednu konstantu relaksacije.

Kada volumen promatranog vokselu zauzima više različitih materijala ili tkiva, ukupni izmjereni signal superpozicija je doprinosa pojedinih komponenata. U slučaju tkiva konstante relaksacije $T2_m$ uronjenog u vodu konstante relaksacije $T2_v$, jakost signala može se opisati biexponencijalnom funkcijom kao zbroj signala tih dviju komponenata:

$$S = S_m e^{-TE/T2_m} + S_v e^{-TE/T2_v}, \quad (4.2)$$

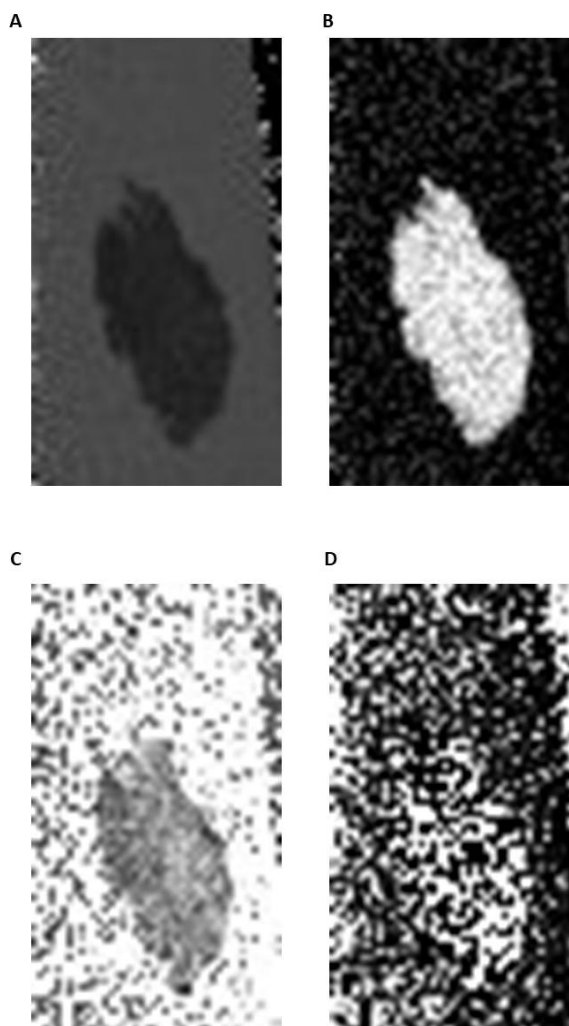
gdje su S_m i S_v amplitude signala proporcionalne količini jezgara vodika u pobuđenom tkivu, odnosno pobuđenoj vodi.

Izraz (4.2) predstavlja nelinearnu jednadžbu s četiri nepoznanice za koju ne postoji analitičko rješenje, no uz dovoljan broj izmjerenih vrijednosti S pri različitim vremenima odjeka TE_1, TE_2, \dots, TE_K , moguće je numeričkim putem približno odrediti parametre $S_m, S_v, T2_m$ i $T2_v$ metodom najmanjih kvadrata. Pritom je od kritične važnosti ograničiti raspon traženih rješenja kako bi se algoritam usmjerio prema fizikalno i biološki smislenom rješenju. U tu svrhu, izraz (4.2) prepravljen je u sljedeći oblik:

$$S = N V_{uk} (C_m e^{-TE/T2_m} + (1 - C_m) e^{-TE/T2_v}), \quad (4.3)$$

Gdje C_m označava volumni udio tkiva u vokselu, a $(1-C_m)$ predstavlja razliku do ukupnog volumena, odnosno volumni udio vode u vokselu. Time su dvije nezavisne varijable S_m i S_v iz izraza (4.2) međusobno povezane i ograničene na raspon mogućih vrijednosti $[0, 1]$, dok se kao nova nezavisna varijabla javlja iz bieksponecijalnog izraza izlučena ukupna količina jezgara $N V_{uk}$, opisana produktom ukupnog volumena vokselu V_{uk} i parametra skaliranja N , koji je za potrebe analize rezultata nebitan.

Dodatna ograničenja na parametre $T2_m$ i $T2_v$ postavljena su iz postojećih T2 mapa koje izračunava program Paravision. Za polazne vrijednosti optimizacijskog algoritma $T2_{m,0}$ i $T2_{v,0}$ uzete su vrijednosti $T2_v$ i $T2_m$ izračunate u programu Paravision jednostavnim monoeksponecijalnim modelom za čitav uzorak, dok je područje traženja optimalnog rješenja ograničeno na raspon $[0.3 T2_m, 1.3 T2_m]$, odnosno $[0.9 T2_v, 1.1 T2_v]$.

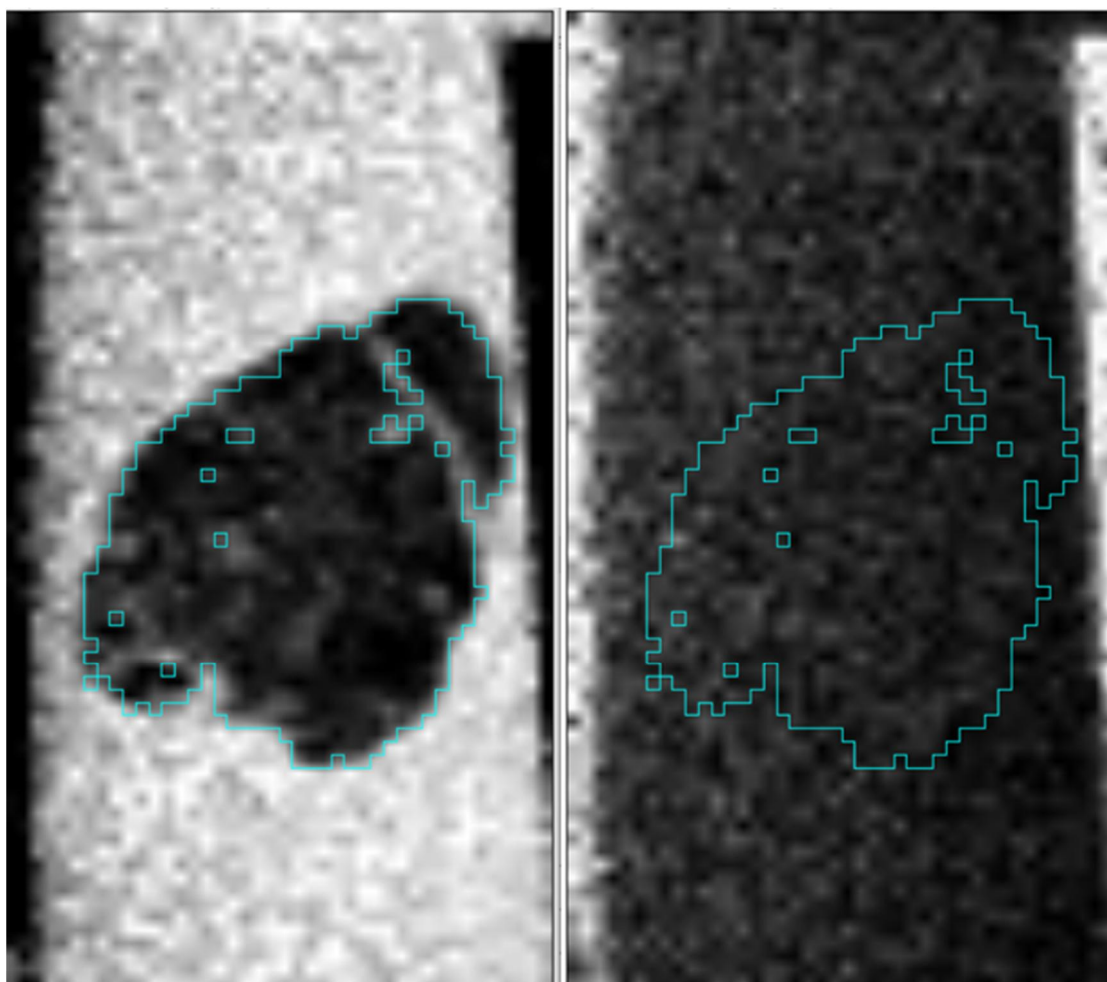


Slika 5. Određivanje srednjeg T2 vremena relaksacije tkiva. Prikazane su T2 mapa (A), T2 mapa s podacima o udjelu tkiva u vokselima (B), T2 mapa s podacima o odvojenim T2 vrijednostima tkiva (C), T2 mapa s podacima o odvojenim T2 vrijednostima vode (D)

4.5.2. Određivanje prividnog koeficijenta difuzije (ADC) i frakcionalne anizotropije (FA) uzorka

Iz snimki DTI sekvence izdvojile su se mape FA i ADC. Kako bi se umanjio učinak maskiranja mjerenog signala tkiva signalom vode iz fiziološke otopine, analiza se provela samo na dijelu uzorka koji sadrži preko 50 % tkiva (Slika 5), prema mapama dobivenima postupkom opisanim u prethodnom poglavlju.

Na slici koja prikazuje postotak tkiva u vokselu su se odredili ROI-evi koji sadržavaju voksele s 50 % tkiva. Za te ROI-eve se na FA i ADC mapi odredio srednji ADC i FA na svakom snimljenom presjeku. Svaka vrijednost se pomnožila s volumnim udjelom presjeka u uzorku, te je zbroj tih vrijednosti predstavljao srednji FA, odnosno ADC za taj uzorak (Slika 6).

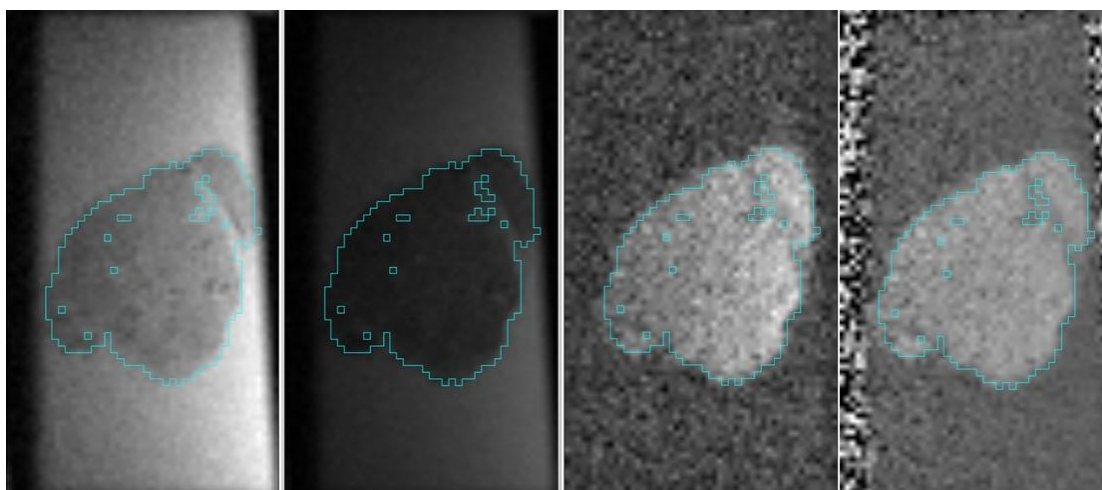


Slika 6. ADC (lijevo) i FA (desno) mape tkiva sjemenika. Plava crta označava područje unutar kojeg je najmanje 50 % tkiva u vokselu

4.5.3. Određivanje omjera prijenosa magnetizacije (MTR) uzorka

Snimanje prijenosa magnetizacije (MTI) je bazirano na prijenosu energije između protona vezanih za makromolekule i mobilnih protona u molekulama vode. Kad RF impuls pobudi makromolekule, magnetska energija prenosi se slobodnoj vodi, što rezultira smanjenim signalom vode. Ova pojava kvantificira se omjerom prijenosa magnetizacije (MTR), koji je veći u tkivima s većom gustoćom makromolekula (101).

MTI snimke sadrže jednu sliku prije impulsa (nativna) i jednu sliku nakon impulsa za prijenos magnetizacije (MT). Od nativne slike oduzme se MT slika te se onda dobivena slika podijeli s nativnom. Tako se dobije slika koja prikazuje veličinu efekta impulsa za prijenos magnetizacije (MTR) (Slika 7). Na toj slici se na ROI-evima koji sadržavaju voksele s 50 % tkiva odredio MTR. Svaka vrijednost se pomnožila s volumnim udjelom presjeka u uzorku, te je zbroj tih vrijednosti predstavljao srednji MTR za taj uzorak.



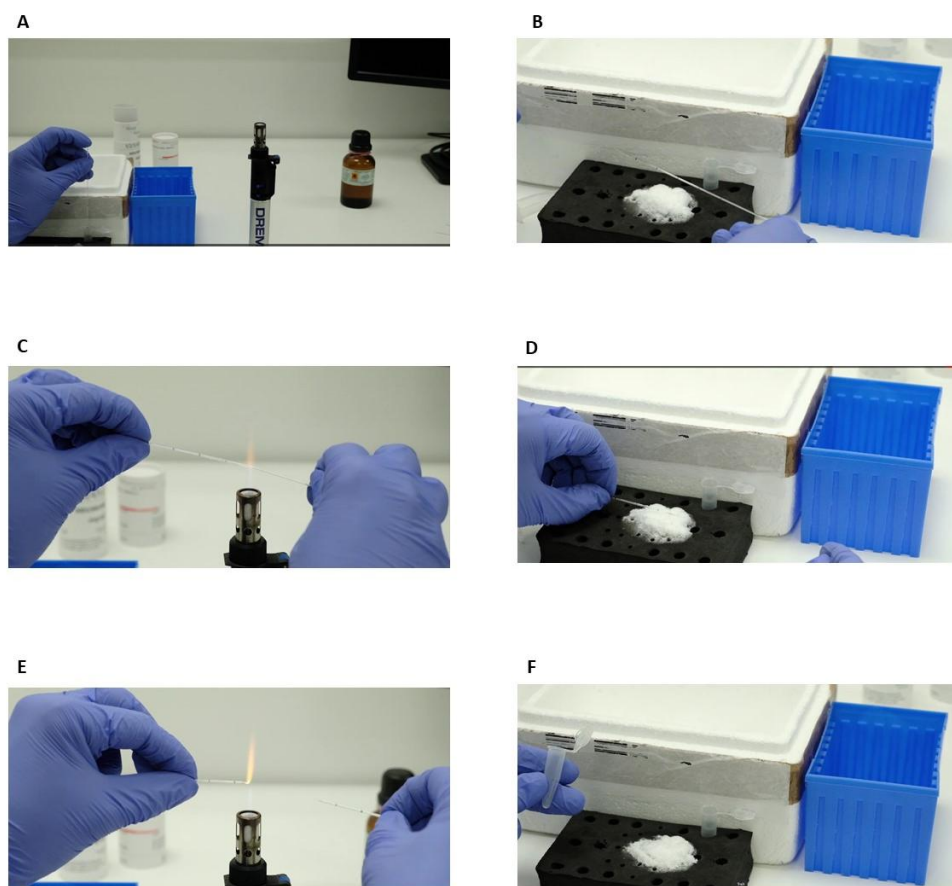
Slika 7. Određivanje MTR uzorka. Od lijevo prema desno prikazane su nativna slika (native), slika nakon impulsa za prijenos magnetizacije (MT), slika koja prikazuje razliku signala s i bez potiskivanja signala makromolekula (Native-MT) i slika koja prikazuje veličinu efekta impulsa za prijenos magnetizacije (MTR). Na slikama su prikazani ROI-evi koji označavaju voksele s 50 % tkiva.

4.6. Određivanje koncentracije metabolita iz spektara

Za kvantifikaciju u MR spektroskopiji bitno je korištenje unutarnjeg standarda jer djeluje kao pouzdana referentna točka, dopuštajući korekciju varijacija signala koje proizlaze iz eksperimentalnih uvjeta, instrumentalnih čimbenika i varijacije u volumenu prikupljenih uzoraka. Normiranjem signala izmjerenih spektara na signal dobro karakteriziranog internog standarda, MRS ne samo da kompenzira fluktuacije povezane s instrumentom, već također pruža način za apsolutno određivanje koncentracija spojeva od interesa.

4.6.1. Izrada kapilare s TMS-om

Tetrametilsilan (TMS) je najčešće korišteni unutarnji standard u MR spektroskopiji. Simetrična je molekula koja sadrži jedan atom ugljika na koji su vezane četiri metilne skupine. Budući da sadrži 12 atoma vodika, njegov spektar se sastoji od jednog uskog šiljka koji se također ne nalazi blizu šiljaka većine molekula čiji spektri se istražuju MR spektroskopijom. Zbog tih svojstava njegov kemijski pomak se označava s 0 i pomaci ostalih molekula se određuju u odnosu na njegov šiljak. Za snimanje uzoraka sjemenika bilo je potrebno izraditi staklenu kapilaru s TMS-om koja stane u plastičnu tubicu od 1,5 mL u kojoj su uzorci snimani. Postupak izrade kapilare prikazan je na Slici 8. Staklena kapilara promjera 0,18 mm uronjena je u TMS koji u nju ulazi zbog efekta kapilarnosti. Oba kraja kapilare su zatvorena plamenom na plameniku. Budući da je tekućina niske viskoznosti (0,4 cSt), niskog vrelišta (26,6 °C) te je vrlo zapaljiva, za kontroliranje njene pozicije u kapilari je korišten suhi led.

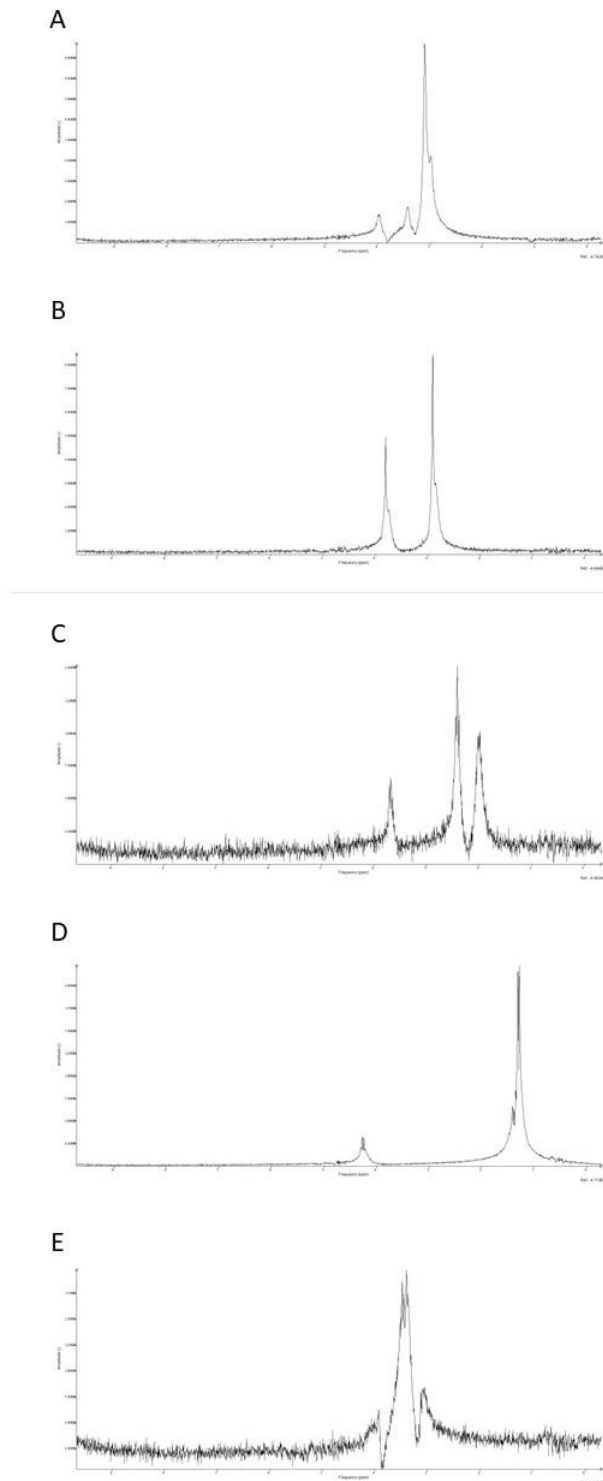


Slika 8. Proces izrade kapilare s TMS-om. U staklenu kapilaru se uvuče TMS (A) te se kapilara ohladi suhim ledom kako bi se TMS pomaknuo (B) i kako bi se omogućilo zatvaranje kapilare plamenom (C). Kapilara se ponovno hladi suhim ledom i TMS se pomiče (D) kako bi se i drugi kraj kapilare mogao zatvoriti plamenom (E). Kapilara s TMS-om zatvorena na oba kraja se onda stavlja u plastičnu tubicu te je spremna za snimanje (F).

4.6.2. Kreiranje referentnog seta spektara metabolita

Budući da visina pojedinih vrhova u spektru reflektira broj određenih molekula vodika u tkivu, kako bi se mogao odrediti koncentracije metabolita bilo je potrebno snimiti spektre metabolita u poznatim koncentracijama. Iz tih koncentracija izračunata je količina molekula u vokselu. Snimljen je spektar 10 glavnih metabolita koji se mogu detektirati u sjemeniku: kolin, kreatin, glutamat, glutamin, laktat, mioinozitol, fosfokreatin, fosfoetanolamin, fosfokolin i taurin. Određivanje koncentracije pojedinačnih metabolita u mješavini koja se sastojala od svih

10 metabolita u jednakoj koncentraciji napravljeno je kako bi se procijenila sposobnost odabrane tehnike snimanja da razluči metabolite, kao i sposobnost upotrebljenog programa za analizu spektara da ispravno odredi njihovu koncentraciju u smjesi. Ispostavilo se da primijenjena tehnika snimanja ne omogućuje razdvajanje signala kolina od fosfokolina, kreatina od fosfokreatina te glutamata od glutamina, budući da imaju vrlo slične spektre i bliske rezonantne frekvencije. Kolin, fosfoetanolamin i taurin imaju bliske vrhove spektara između 3,11 i 3,15 ppm, a mioinozitol i taurin imaju vrhove spektara između 3,32 i 3,4 ppm. Količina kolina i mioinozitola se može točno odrediti dok se određivanje količine fosfoetanolamina i taurina pokazalo nepouzdanim. Konačna lista metabolita čija količina je određivana u uzorcima sjemenika se sastojala od: kolina (vrhovi spektra na 3.11, 3.47 i 3.97 ppm), ukupnog kreatina (vrhovi spektra na 2.9 i 3.8 ppm), ukupnog glutamata i glutamina vrhovi spektra na 1.98, 2.42 i 3.68 ppm), laktata (vrhovi spektra na 1.28 i 4.27 ppm) i mioinozitola (vrhovi spektra na 3.0, 3.4 i 3.9 ppm) (Slika 9).



Slika 9. MRS spektri metabolita korišteni za relativnu kvantifikaciju koncentracije metabolita u sjemeniku. A. Kolin; B. Kreatin; C. Glutamat; D. Laktat; E. Mio-inozitol. Signal vode i TMS-a odstranjeni su iz spektra u programu jMRUI.

4.6.3. Procesiranje spektara u jMRUI programu

U program jMRUI 7.0 učitane su izvorne FID datoteke koje sadrže nativni odziv (relaksaciju) snimljenog tkiva nakon pobude RF signalom u MR uređaju, bez ikakvih obrada (FID = free induction decay). Matematičkim transformacijama iz slobodnog odziva (FID) može se izračunati spektar snimljenog tkiva. Spektri su analizirani postupkom opisanim u nastavku.

Prvo je lociran lokalni maksimum TMS-a u spektru te je postavljen kao referentna točka, odnosno 0 ppm. Nakon toga su uklonjeni vrhovi vode i TMS-a koristeći SVD filter kako ne bi ometali kvantifikaciju metabolita. Spektar uzorka sjemenika je nakon toga obrađen QUEST algoritmom za kvantifikaciju metabolita koji se temelji na težinskom uklapanju prethodno izmjerenih signala metabolita u spektar koji se analizira (121). Spektri referentnog seta metabolita učitani su jedan po jedan te je podešeno rukovanje pozadinskim signalom koji potječe od makromolekula i lipida u uzorku. Naredbom 'truncate' uklonjene su prve dvije točke signala, čime je izoliran spektar metabolita iz ukupnog signala, a naredbom 'sub' je preostali pozadinski signal oduzet od ukupnog signala metabolita. Rezultat je relativna amplituda signala svakog metabolita u odnosu na signal istog metabolita iz referentnog seta iz čega se može izračunati količina određenog metabolita u uzorku.

4.6.4. Uklanjanje signala glicerola iz krioprezerviranih uzoraka

Budući da se medij za zamrzavanje koji je korišten bazira na glicerolu, signal glicerola je bio izražen u krioprezerviranim uzorcima te su se vrhovi njegovog spektra preklapali s vrhovima spektara metabolita od interesa. Kako bi se mogle točno odrediti njihove koncentracije, u postupak analize ubačen je dodatni korak. Prvo je od spektra krioprezerviranih uzoraka oduzet spektar glicerola, a potom su koncentracije metabolita određene iz rezidualnog spektra prethodno opisanim postupkom.

4.6.5. Određivanje volumena uzorka sjemenika

Kako bi se odredila koncentracija metabolita u uzorku sjemenika bilo je potrebno odrediti njegov volumen. Volumen je određen množenjem površina ROI-eva s razmakom između rezova. Površina ROI-eva je dobivena na dva načina, postavljanjem praga intenziteta

signala na slikama dobivenim direktno iz programa Paravision te određivanjem udjela tkiva u vokselu preko bieksponecijalne funkcije. Nekoliko uzoraka je također izvagano kako bi se preko mase i poznate gustoće tkiva sjemenika mogao odrediti volumen te tako provjeriti točnost ove metode.

4.7. Histološko procesiranje tkiva

Nakon snimanja magnetskom rezonancijom uzorci sjemenika su histološki obrađeni kako bi se mogla odrediti prisutnost spermija. Uzorci su fiksirani u 10 %-tnom formalinu (Formalin FC10, BioGnost, Hrvatska) tijekom 24 sata. Uzorci su potom ispirani od formalina vodovodnom vodom tijekom 24 sata te dehidrirani u etanolu rastućih koncentracija (50 %, 70 %, 96 % i 100 %, svaka koncentracija dva puta po 30 minuta). Bioptički komadići sjemenika su zatim prebačeni u mješavinu ksilola i etanola u omjeru 50:50 te zatim u ksilol (Bioclear BC, BioGnost, Hrvatska) dva puta po 30 minuta. Nakon toga su uzorci prožeti tekućim parafinom (8002-74-2, Kemika, Zagreb, Hrvatska) zagrijanim na 60 °C, svaki četiri puta po 1 sat. Slijedilo je hlađenje na sobnoj temperaturi u kalupima iz kojih su potom izvađeni parafinski blokovi.

Blokovi su ohlađeni na 4 °C te rezani na ručnom rotacijskom mikrotomu (Leica Biosystems, RM2235, Švicarska) koji koristi niskoprofilne jednokratne britvice (Leica Biosystems 819,, Švicarska). Blokovi su rezani na rezove debljine 4 µm te stavljeni na pozitivno nabijena, silanizirana stakla (VitroGnost Plus Ultra adhesive slide, 103001A72, BioGnost, Hrvatska). Stakla su sušena 24 sata na ploči zagrijanoj na 37 °C.

4.8. Klasično histološko bojenje hemalaun-eozinom

Tkivo sjemenika je potom bojano klasičnim histološkim bojenjem hemalaun-eozinom. Hemalaun je bazična boja koja daje plavoljubičasto obojenje kiselim dijelovima stanice kao što su jezgre, dok je eozin kisela boja koja daje ružičasto obojenje bazičnim dijelovima stanice kao što su izvanstanični matriks i citoplazma (122). Stakla s rezovima tkiva sjemenika debljine 4 µm stavljena su jedan sat na 56 °C u termostat kako bi tkivo bolje prionulo uz staklo. Nakon 10 minuta hlađenja stakla su deparafinizirana u ksilolu dva puta po 15 minuta, nakon čega su rehidrirana u padajućem nizu koncentracije etanola (100 %, 96 %, 80 % i 70 %, svaki po pet

minuta) te potom prebačena u destiliranu vodu (dH₂O). Nakon toga su stakla stavljena u otopinu hemalauna (HEMM-OT, BioGnost, Hrvatska) na 3 minute, isprana s dH₂O te pod mlazom vodovodne vode kroz 7 minuta. Vodovodna voda je alkalna te se koristi kako bi se dobilo plavo obojenje. Stakla su potom uronjena u dH₂O te inkubirana u otopini eozina (EOYK-OT, BioGnost, Hrvatska) 2 minute. Uzorci su potom dehidrirani u otopinama rastuće koncentracije alkohola (96 % i 100 %, 2 puta po 5 minuta) te je slijedilo bistrenje tkiva u ksilolu, dva puta po 10 minuta. Uzorci su potom pokriveni sintetičkim medijem za uklapanje (Biomount DPX low, BML, BioGnost, Hrvatska) i pokrovnim stakalcem (VitroGnost cover glass, 10212450C, BioGnost, Hrvatska).

4.9. Analiza obojenih stakala i bodovanje po Johnsenu

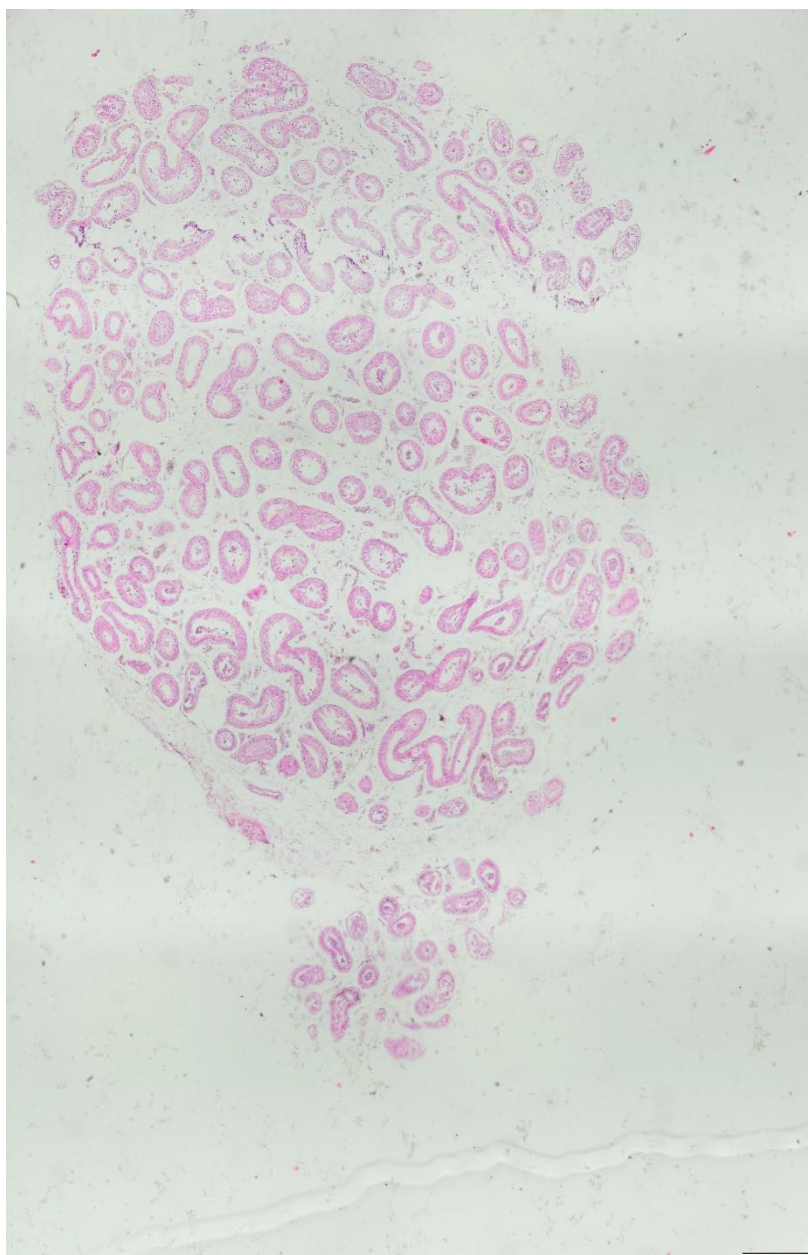
Za svaki uzorak odabrano je jedno staklo iz sredine uzorka te obojeno hemalaun-eozinom. Od svakog uzorka uključenog u istraživanje napravljena je mapa čitavog reza 4x objektivom na Olympus IX3-ZDC2 fluorescentnom mikroskopu (Slika 10). Svaki sjemenski kanalić na preparatu je analiziran i ocijenjen prema Johnsenovoj skali (Tablica 5). Za svaki uzorak je izračunata srednja vrijednost Johnsenove ocjene (JS, engl. Johnsen score). Uzorci su također grupirani u skupine prema dijagnozi. (Tablica 6).

Tablica 5. Histološki kriteriji za ocjenjivanje prema Johnsenovoj skali

JS	HISTOLOŠKI KRITERIJ
10	Puna spermatogeneza
9	Hipospermatogeneza, mnogo zrelih spermatida
8	Manje od 5 spermija po tubulu, malo zrelih spermatida
7	Nema spermija, nema zrelih spermatida, mnogo nezrelih spermatida
6	Nema spermija, nema zrelih spermatida, malo nezrelih spermatida
5	Nema spermija ni spermatida, mnogo spermatocita
4	Nema spermija ni spermatida, malo spermatocita
3	Samo spermatogonije
2	Nema spolnih stanica, samo Sertolijeve stanice
1	Nema sjemenskog epitela

Tablica 6. Histološke dijagnoze uzoraka

Dijagnoza	Johnsen score tubula u uzorku
SCOS	1,2
MA	3,4,5,6,7,8
HYPO	9,10
MIXA-8	1,2,3,4,5,6,7,8
MIXA-10	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10



Slika 10. Uzorak sjemenika obojen hemalaun-eozinom skeniran pri povećanju 4x.

4.10. Imunofluorescentno bojenje

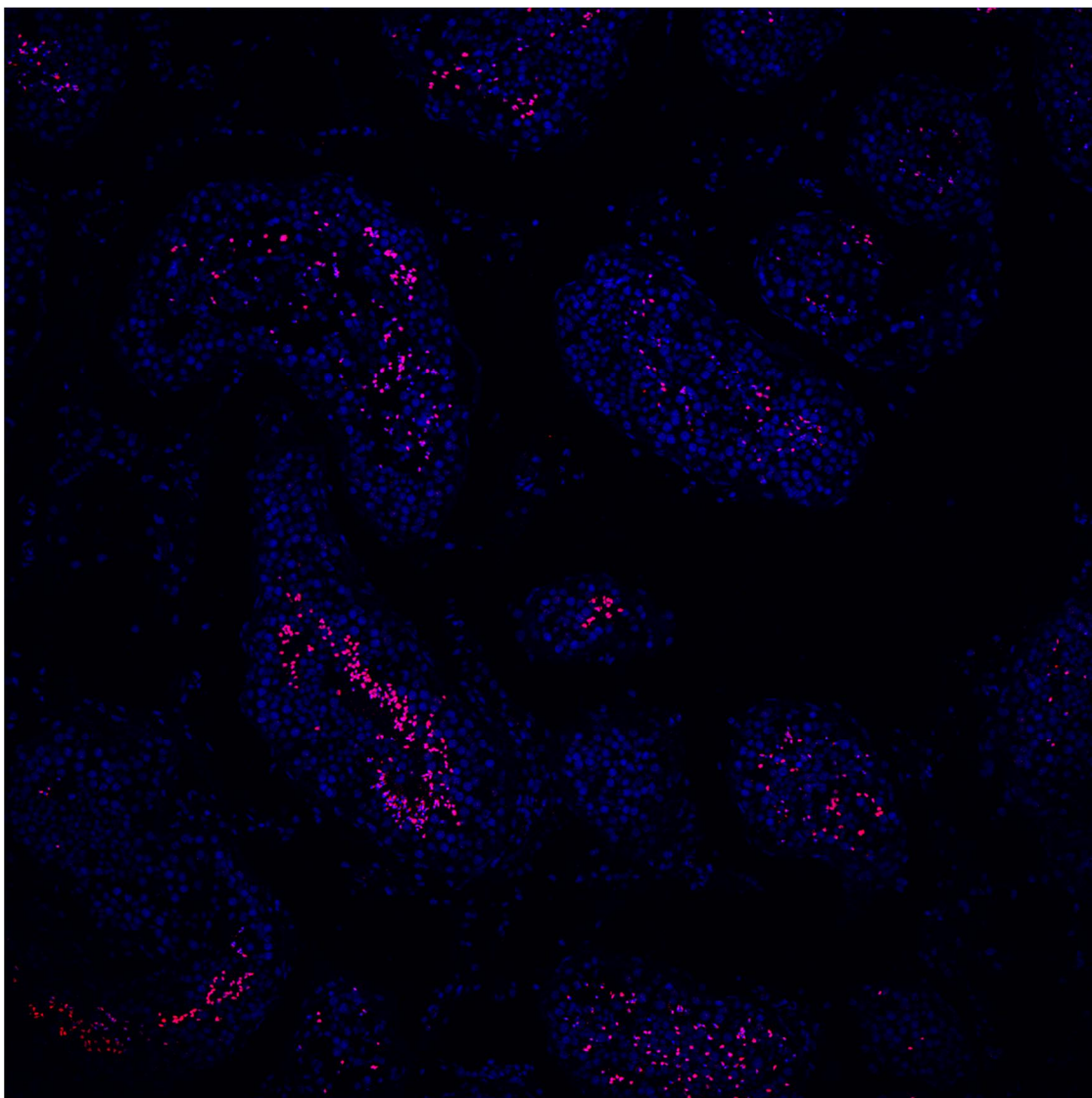
Imunofluorescentno bojenje na protamin 1 (PRM1) u tkivu napravljeno je kako bi se kvantificirala količina spermija i zrelih spermatida u tkivu (točnije nego preko udjela tubula koji sadrže zrele spermatide i spermije). Protamini su proteini koji se sintetiziraju u zrelim spermatidama i kondenziraju DNK kako bi zaštitili genetski materijal od genotoksične aktivnosti te kako bi se taj neoštećeni genetski materijal mogao dostaviti embriju (123,124). Jedno staklo od svakog uzorka odvojeno je za imunofluorescentno bojenje (n=58). Na svakom staklu su bila dva reza, na jedan je nanoseno primarno protutijelo dok je drugi korišten kao negativna kontrola. Stakla su prvo stavljena u termostatski sud na 56 °C u trajanju od sat vremena kako bi tkivo bolje prionulo uz staklo. Stakla su potom deparafinizirana u otopini ksilola te nakon toga rehidrirana u silaznom nizu alkohola (100 %, 96 % i 70 % etanol). Nakon ispiranja u dH₂O stakla su prebačena u hidroksimetil aminometan-etilendiamintetraoctenu kiselinu (pH 9, Tris-EDTA pufer) te kuhana u parnoj kupelji (VS400136, Tefal Vitacuisine, Écully, Francuska) sat vremena kako bi se demaskirali antigenski epitopi. Nakon kuhanja uzorci su se hladili 30 minuta na sobnoj temperaturi te isprali u fosfatno-puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) (engl. Phosphate-buffered saline) 5 minuta. Potom su se rezovi okružili hidrofobnim markerom kako bi se tekućina zadržala na uzorku (PAP pen, ab2601, Abcam, Velika Britanija) te je na njih nanoseno 5 %-tni goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin, BSA, albumin fraction 8076.3, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka; razrijeđen u PBS-u) u kojem su uzorci inkubirani 20 minuta. BSA se veže na nespecifične epitope proteina te tako blokira nespecifično vezanje protutijela. Otopina BSA je uklonjena bez ispiranja te je nanoseno primarno protutijelo na protamin 1 (PRM1) (HPA055150, Atlas Antibodies, Sweden) razrijeđeno 1:500 u PBS-u s 0.1 % Triton X-100 i 1 % BSA. Stakla su ostavljena preko noći na 4 °C u vlažnoj komori za imunohistokemiju. Kao negativna kontrola korištena je otopina 0.1 % Triton X-100 i 1 % BSA bez primarnog protutijela koja je nanosena u isto vrijeme.

Idući dan uzorci su ispirani na treskalici (IKA KS 260 basic, Staufen, Njemačka) 2 puta po 10 minuta u PBS-u. Nakon toga je nanoseno sekundarno protutijelo proizvedeno u kozi specifično za zečji imunoglobulin, konjugirano s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647 (ab150083, Abcam, Velika Britanija). Sekundarno protutijelo je razrijeđeno 1:200 u PBS-u. Rezovi su ponovo isprani 3 puta po 10 minuta u PBS-u te tretirani s TrueBlack® otopinom za smanjivanje autofluorescencije (Biotium, Fremont, CA, USA), razrijeđenim 20× sa 70 % etanolom. Potom je nanosena Hoechst otopina (1ng/mL u PBS-u), fluorescentna boja koja se

veže na DNK i tako obilježava jezgre stanica. Nakon sušenja 3 minute, stakla su pokrivena pokrovnicom s pomoću medija za uklapanje (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) te se sušila 24 sata na 4 °C prije slikanja.

4.11. Analiza ekspresije PRM-1

Obilježeni rezovi tkiva sjemenika snimljeni su konfokalnim mikroskopom Olympus FLUOVIEW FV3000 uz pripadajući FV31-SW Fluoview softver (Olympus). Za svaki uzorak napravljena je virtualna mapa čitavog reza sjemenika označenog s protutijelom na PRM1 te pripadajuće negativne kontrole 10x objektivom (UplanSApo, NA 0.16, Olympus). Laserska zraka valne duljine 405 nm, snage lasera 0,15 %, koristila se za vizualizaciju Hoechst bojenja, dok se laserska zraka od 647 nm, snage lasera 1 %, upotrijebila za vizualizaciju bojenja s protutijelom na PRM1 (Slika 11). Slike su učitane u ImageJ (ImageJ1.53i software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Kensington, SAD) te je na svakoj izmjerena vrijednost raw integrated density (RawIntDen), odnosno zbroj vrijednosti svih piksela iznad praga intenziteta koji je postavljen na 400. Prag vrijednosti od 400 je odabran nakon što je preko Moments algoritma za određivanje praga intenziteta određen prag za 2 uzorka pozitivna na PRM1, ukupno 54 slika, te je izračunata srednja vrijednost. Vrijednost RawIntDen je onda podijeljena s površinom reza tkiva te je tako dobivena gustoća signala PRM1.



Slika 11. Prikaz tkiva sjemenika s pozitivnim signalom PRM1 označenim crvenom bojom dok su jezgre stanica obojene Hoechst bojenjem označene plavom bojom.

4.12. Statistička obrada podataka

4.12.1. Graphpad

Statistička analiza provedena je s pomoću Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, SAD) softvera. Za usporedbu dvije skupine korišten je t-test, a za usporedbu 3 i više skupina korišten je jednosmjerni ANOVA test. Za analizu odnosa između varijable PRM1LOG i srednjeg JS te udjela tubula s $JS \geq 8$ i $JS \geq 9$ korištena je analiza korelacije i jednostavna linearna regresija. Za usporedbu koeficijenata korelacije korištena je Fisherova transformacija. Za

usporedbu udjela pacijenata s povišenim FSH i LH te povijesti kriptorhizma korištena je Fisherova analiza kontingencijskih tablica. Za procjenu podudarnosti između različitih načina određivanja volumena uzoraka korištena je Bland Altmanova analiza. Prediktivnost nezavisnih varijabli za gustoću signala PRM1 u tkivu je ocijenjena multivarijatnom linearnom regresijom. Prediktivnost pojedinačnih parametara za zavisne varijable ocijenjena je jednostavnom logističkom regresijom, dok je prediktivnost više parametara ocjenjivana multivarijatnom logističkom regresijom. AUC vrijednosti različitih modela uspoređene su koristeći Wilcoxon test(125).

4.12.2. Umjetne neuronske mreže (ANN)

Originalni skup podataka sastojao se od podataka prikupljenih od 58 uzoraka. Nakon histološkog i IHC procesiranja dobivene su dvije skupine uzoraka kojima su dodijeljene oznake „histologija“ ili „PRM1“. Svakom uzorku pridruženo je 12 značajki (mjerjenja) od kojih se 9 mogu predstaviti realnom varijablom (T2, ADC, FA, MTR, kolin, kreatin, glutamat, laktat, mio-inozitol), a 3 binarnom (FSH, LH, kriptorhizam) i dvije različite oznake: „Histologija“ i „PRM1“. Svaki uzorak imao je 12 značajki i dvije različite oznake: „Histologija“ i „PRM1“. Za predviđanje svake od oznaka korišteni su samo uzorci za koje je vrijednost oznake poznata. Zbog toga je korišten skup podataka za oznaku „Histologija“ imao 57, a za oznaku „PRM1“ 56 uzoraka. Originalni skup podataka bio je podijeljen u skup za treniranje (60 %) i skup za testiranje (40 %). Pri podjeli održan je isti omjer broja primjeraka iz pozitivne i negativne klase kao u originalnom skupu podataka. 12 korištenih značajki može se podijeliti na 3 binarne i 9 realnih varijabli. Nepoznate vrijednosti za binarne značajke bile su upotunjene s najčešćom vrijednosti a za realne s prosječnom vrijednosti navedene značajke.

Korišten model bila je jednostavna umjetna neuronska mreža (engl. Artificial neural network, ANN) koja se sastojala od 4 sloja - ulazni sloj od 12 neurona (određen brojem ulaznih značajki), 2 skrivena sloja (7 i 3 neurona) i izlazni sloj od 1 neurona. Aktivacijska funkcija za neurone u skrivenom sloju bila je ReLu funkcija koja uvodi svojstvo nelinearnosti u model dubokog učenja i rješava problem nestajanja gradijenata. Početna vrijednost stope učenja (engl. learning rate) postavljena je na 0.00001. Kriterij zaustavljanja učenja bio je obavljenih 10⁶ iteracija.

5. REZULTATI

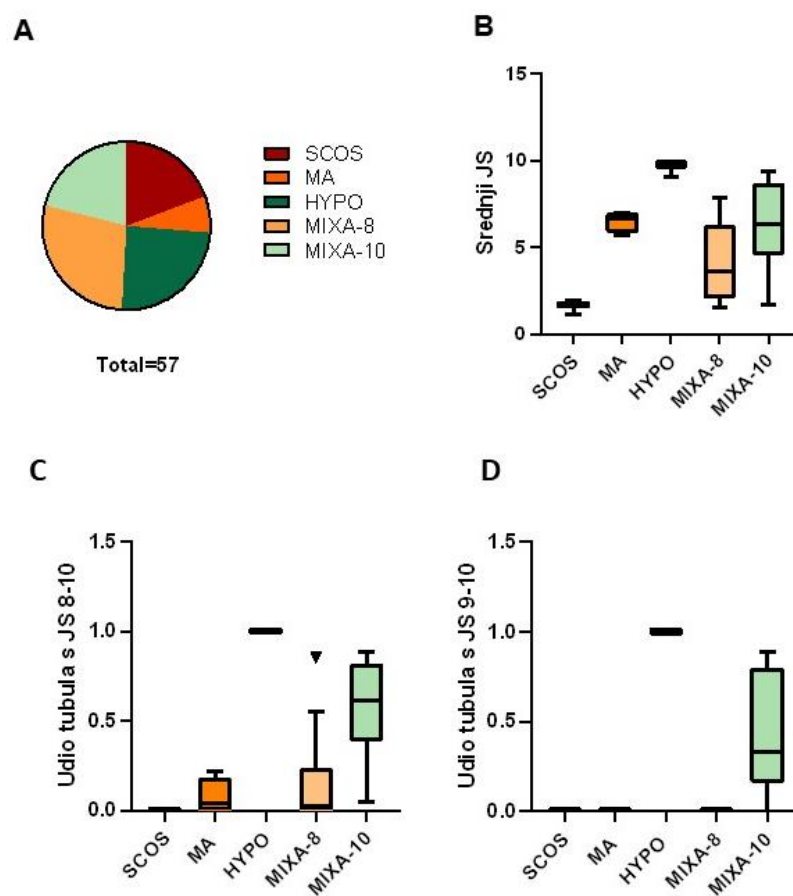
5.1. Histološka analiza uzoraka

Histološka analiza provedena na 57 uzoraka uključivala je određivanje histološke dijagnoze, srednjeg JS te udjela tubula s JS 9-10 koji sadržavaju spermije te JS 8-10 koji sadržavaju i zrele spermatide i spermije.

U 18.97 % (n=11) uzoraka dijagnosticiran je SCOS, u 6.9 % (n=4) MA, a u 25.86 % (n=15) HYPO. Ostalih 48.28 % uzoraka (n=28) je imalo mješovitu atrofiju sjemenskih kanalića s obilježjima više od jedne dijagnoze te su klasificirani u dvije skupine: MIXA-8 (27.59 %, n= 16) i MIXA-10 (20.69 %, n=12) ovisno o tome koji je bio najviši JS tubula u uzorku (Slika 12A).

Svim uzorcima određen je srednji JS te su vrijednosti uspoređene između dijagnostičkih skupina (Slika 12B). Primjećuje se širi raspon vrijednosti u skupinama mješovite atrofije što ukazuje na histološku varijabilnost uzoraka.

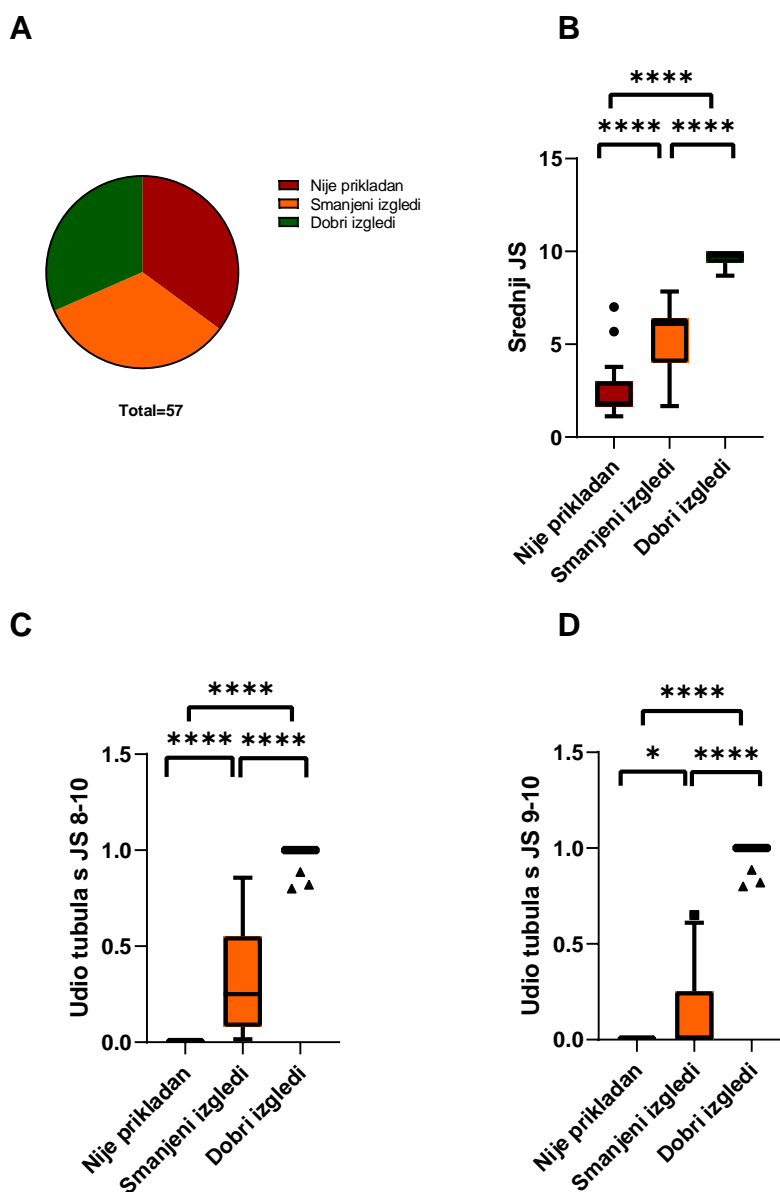
Izračunat je i udio tubula s JS 9-10 koji sadržavaju mnogo spermija te udio tubula s JS 8-10 u koji su uračunati i tubuli s JS 8 koji sadržavaju manje od 5 spermija te malo zrelih spermatida. Primijećena je velika varijacija u količini spermija u skupini MIXA-10 (Slika 12D), a u skupinama MA i MIXA-8 su identificirani uzorci koji sadržavaju tubule s manjom količinom spermija i kasnih spermatida (Slika 12C).



Slika 12. Udio (A) i karakterizacija dijagnostičkih skupina uzoraka (SCOS, MA, HYPO, MIXA-8, MIXA-10) prema srednjem JS (B) te udjelu tubula s JS 8-10 (C) i JS 9-10 (D). Udio dijagnostičkih skupina uzoraka je prikazan tortnim grafikonom dok su vrijednosti srednjeg JS te udjela tubula s JS 8-10 i JS 9-10 prikazane kao medijan i interkvartilni raspon.

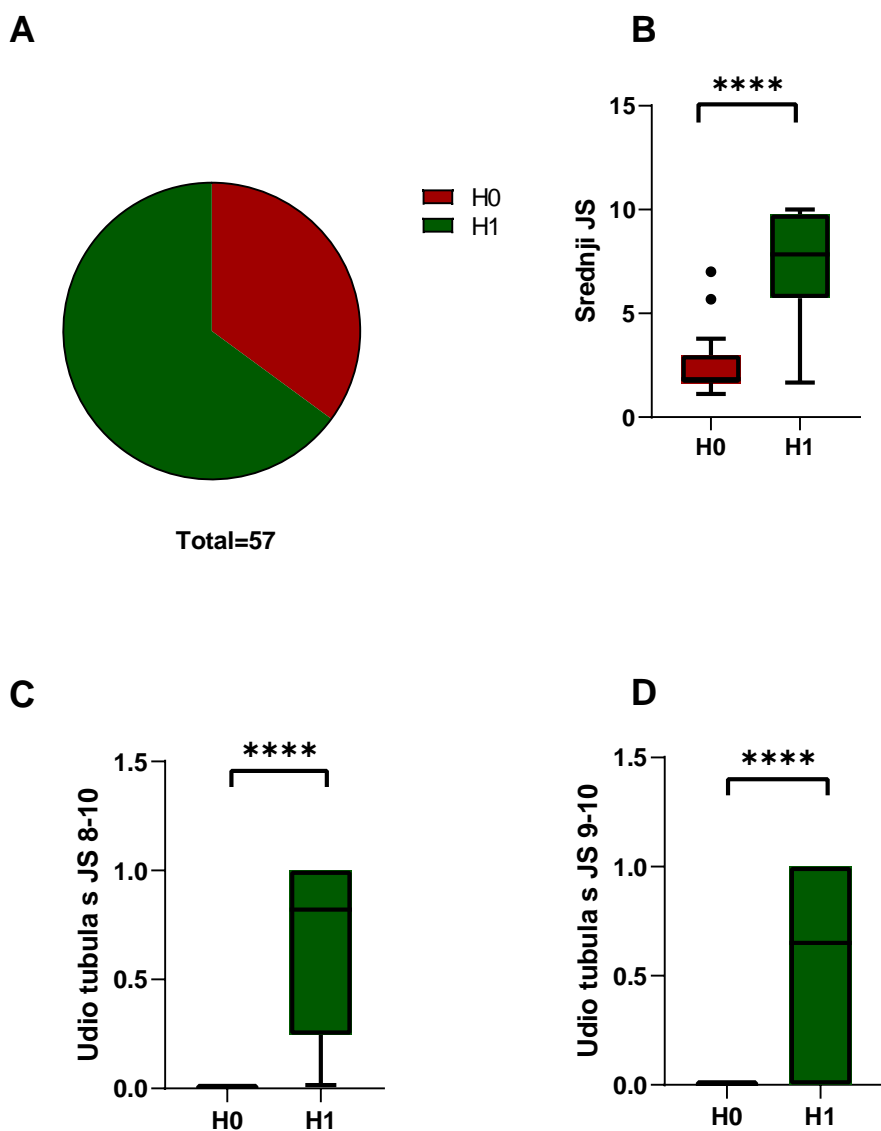
Preporuka za TESE se daje na temelju udjela tubula sa spermijima i zreлим spermatidama. U ovoj studiji primijenjeni su sljedeći kriteriji: ako je uzorak sadržavao više od 80 % tubula s JS 9-10 procijenjeno je da ima dobre izgledе za uspješnu izolaciju spermija, a ako je sadržavao tubule s ocjenom JS 8, a manje od 80 % tubula s JS 9-10 procijenjeno je da ima smanjene izgledе za uspješnu izolaciju spermija. Za uzorke koji nisu imali tubule s JS 8 procijenjeno je da nisu pogodni za TESE. Od 57 prikupljenih uzoraka za 35.09 % (n=20) uzoraka procijenjeno je da imaju dobre izgledе, za 33.33 % (n=19) uzoraka da imaju smanjene izgledе za uspješnu TESE, a za 31.58 % (n=18) uzoraka da nisu prikladni za TESE. Primijećene

su značajne razlike između srednjeg JS, udjela tubula s JS 8-10 i udjela tubula s JS 9-10 za sve tri skupine (Slika 13).



Slika 13. Udio (A) i karakterizacija skupina uzoraka određenih na temelju histološke analize i procjene prikladnosti za ekstrakciju spermija (nije prikladan, smanjeni izgledi i dobri izgledi) prema srednjem JS (B) te udjelu tubula s JS 8-10 (C) i JS 9-10 (D). Udio skupina uzoraka je prikazan tortnim grafikonom dok su vrijednosti srednjeg JS te udjela tubula s JS 8-10 i JS 9-10 prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći jednosmjerni ANOVA test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

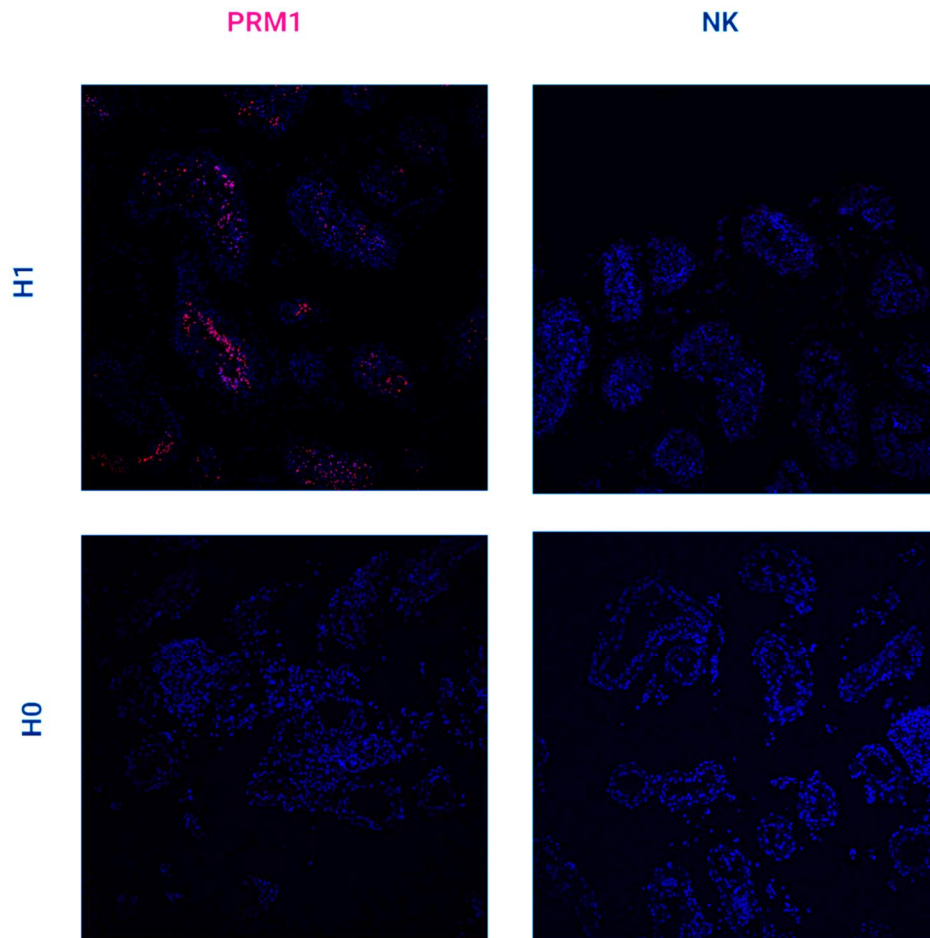
Budući da je klinički najkorisnije predvidjeti ima li smisla raditi TESE ili ne, spojene su skupine uzoraka za koje je procijenjeno da imaju dobre i one za koje je procijenjeno da imaju smanjene izgleda za uspješan TESE u varijablu H1 (64.91 %, n=37), dok su uzorci koji su procijenjeni neprikladnima za TESE opisani varijablom H0 (35.09 %, n=20). Primijećene su značaje razlike u srednjem JS, udjelu tubula s JS 8-10 i udjelu tubula s JS 9-10 (Slika 14).



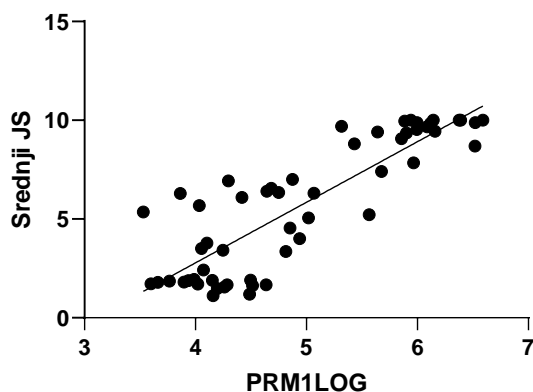
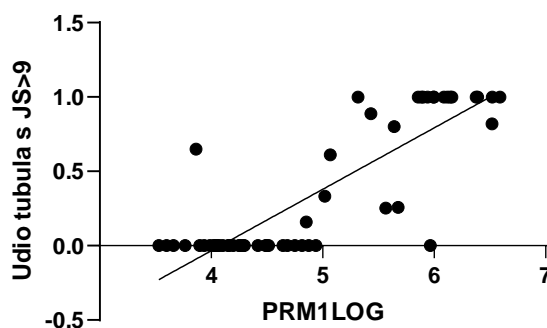
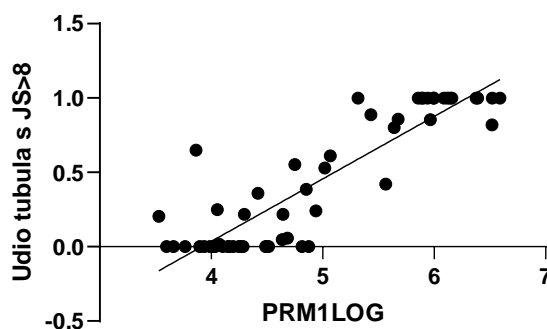
Slika 14. Udio (A) i karakterizacija skupina uzoraka određenih na temelju histološke analize i procjene prikladnosti za ekstrakciju spermija (H0, H1) prema srednjem JS (B) te udjelu tubula s JS 8-10 (C) i JS 9-10 (D). Udio skupina uzoraka je prikazan tortnim grafikonom dok su vrijednosti srednjeg JS te udjela tubula s JS 8-10 i JS 9-10 prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

5.2. Imunofluorescentna analiza uzoraka

Svaki uzorak je bojan s PRM1 protutijelom kako bi se mogla kvantificirati količina spermija i zrelih spermatida u uzorcima. Analiziran je intenzitet signala na cijelom uzorku (Slika 15) te je podijeljen s površinom uzorka kako bi se dobila gustoća signala u uzorku. Varijabla gustoće signala je logaritamski transformirana budući da ima veliki raspon vrijednosti te pokazuje nelinearnost eksponencijalnog tipa, a kako bi se mogao analizirati linearni odnos između nje i srednjeg JS, udjela tubula s $JS \geq 9$ i udjela tubula s $JS \geq 8$. Logaritamski transformirana PRM1 varijabla (PRM1LOG) je snažno pozitivno korelirana sa srednjim JS ($r=0.8562$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7331$, $F(1,53)=145.6$, $p<0.0001$). Varijabla PRM1LOG je također snažno pozitivno korelirana s udjelom tubula s $JS \geq 9$ ($r=0.8418$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7086$, $F(1,53)=128.9$, $p<0.0001$). Varijabla PRM1LOG je snažno pozitivno korelirana i s udjelom tubula s $JS \geq 8$ ($r=0.8906$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7932$, $F(1,53)=203.2$, $p<0.0001$). Fisherova transformacija Pearsonovih koeficijenata korelacije je pokazala da je korelacija PRM1LOG varijable s udjelom tubula s $JS \geq 8$ statistički značajno veća od korelacije PRM1LOG varijable s udjelom tubula s $JS \geq 9$ ($z=-1.986$, $p=0.024$) što potvrđuje činjenicu da gustoća PRM1 signala prikazuje i zrele spermatide i spermije. Nije uočena značajna razlika između nagiba krivulja linearne regresije (Slika 16).

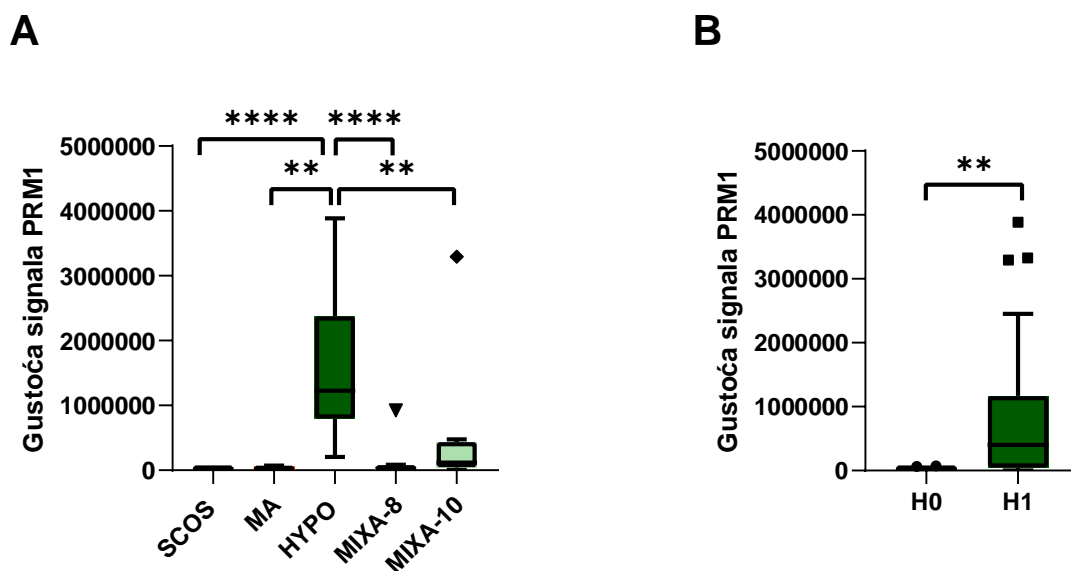


Slika 15. Prikaz imunofluorescentnog signala PRM1 te negativnih kontrola (NK) u uzorcima sjemenika iz skupina H0 i H1. Signal PRM1 prikazan je crvenom bojom te se može primijetiti u uzorku iz skupine H1 dok su plavom bojom označene jezgre stanica obojene Hoechst bojenjem.

A**B****C**

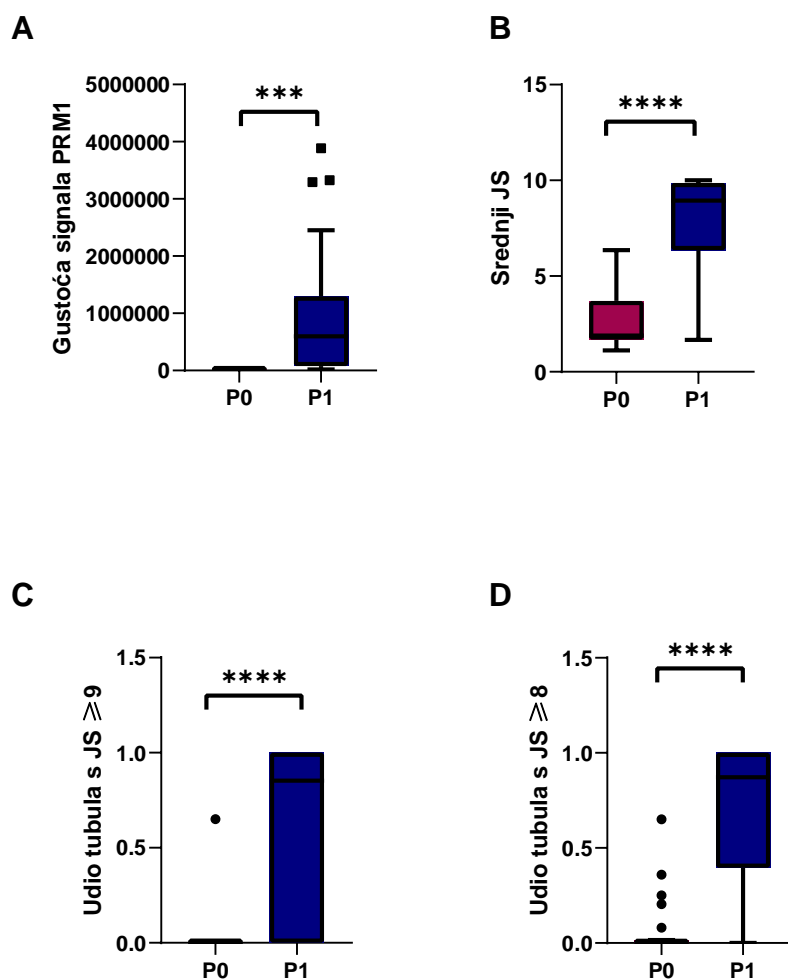
Slika 16. Prikaz odnosa varijable PRM1LOG i srednjeg JS (A), udjela tubula s $JS \geq 8$ (B) i $JS \geq 9$ (C). Varijabla PRM1LOG je snažno pozitivno korelirana sa srednjim JS ($r=0.8562$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7331$, $F(1,53)=145.6$, $p<0.0001$). (A) Varijabla PRM1LOG je snažno pozitivno korelirana s udjelom tubula s $JS \geq 9$ ($r=0.8418$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7086$, $F(1,53)=128.9$, $p<0.0001$). (B) Varijabla PRM1LOG je snažno pozitivno korelirana s udjelom tubula s $JS \geq 8$ ($r=0.8906$, $p<0.0001$). Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.7932$, $F(1,53)=203.2$, $p<0.0001$). (C)

Gustoća signala PRM1 uspoređena je između dijagnostičkih skupina (slika 17A) te je nađena statistički značajna razlika između skupine HYPO i svih ostalih skupina što ukazuje na očekivano visoku gustoću signala u toj skupini. Razlike između ostalih skupina nisu bile statistički značajne. Gustoća signala PRM1 uspoređena je i za varijable H0 i H1 te je utvrđena statistički značajna razlika (slika 17B).



Slika 17. Gustoća PRM1 signala u dijagnostičkim skupinama uzoraka i skupinama H0 i H1. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći jednosmjerni ANOVA test (A) i t-test (B): (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

Na temelju vizualne prisutnosti signala PRM1 u uzorcima određene su skupine uzoraka P0 (42.86 %, $n=24$) i P1 (57.14 %, $n=32$) (Slika 18). S pomoću PRM1 signala bilo je moguće kvantificirati količinu spermija i zrelih spermatida, a ne samo odrediti udio tubula koji ih sadržavaju. Također je bilo moguće točnije odrediti prisutnost spermija i zrelih spermatida. Gustoća signala PRM1 i srednji JS su očekivano značajno viši u skupini P1 nego u skupini P0 (Slika 18 A,B). Udio tubula s $JS \geq 8$ i $JS \geq 9$ su također značajno viši u skupini P1 nego u skupini P0 (Slika 18 C,D).

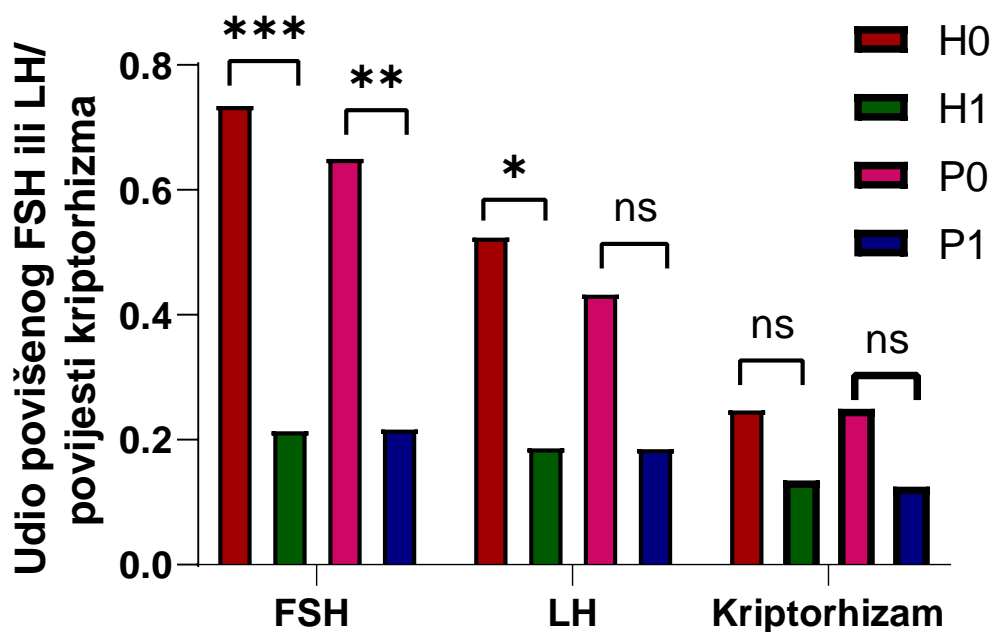


Slika 18. Udio i karakterizacija skupina uzoraka određenih na temelju prisutnosti signala PRM1 (P0, P1) prema gustoći signala PRM1 (A), srednjem JS (B) te udjelu tubula s JS 8-10 (C) i JS 9-10 (D). Udio skupina uzoraka je prikazan tortnim grafikonom dok su vrijednosti gustoće signala PRM1, srednjeg JS te udjela tubula s JS 8-10 i JS 9-10 prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

5.3. Dijagnostička obrada pacijenata (FSH, LH, kriptorhizam)

Od podataka iz dijagnostičke obrade pacijenata za izradu prediktivnog modela izabrani su FSH, LH i povijest kriptorhizma. FSH i LH su korišteni kao binarne varijable gdje je 0 bila razina hormona unutar normalnog raspona, a 1 je bila povišena razina hormona. Normalni raspon FSH je bio 1.5-12.4 U/L, a normalni raspon LH 1.4-8.6 U/L. Povijest kriptorhizma je također bila binarna varijabla gdje je 0 označavala da pacijent nema povijest kriptorhizma dok

je 1 označavao da ima. Fisherova analiza kontingencijskih tablica pokazala je da je udio pacijenata s povišenim FSH bio značajno veći u skupini H0 nego u skupini H1 te u skupini P0 nego u skupini P1. Razina LH je bila značajno viša u skupini H0 nego u skupini H1 dok razlika među skupinama P0 i P1 nije bila statistički značajna. Udio pacijenata s poviješću kriptorhizma nije bila statistički značajno različita ni među skupinama H0 i H1 ni među skupinama P0 i P1 (Slika 19).



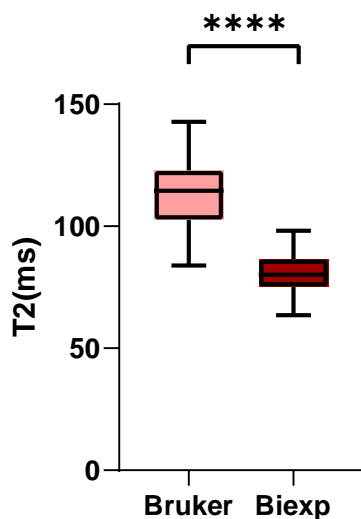
Slika 19. Razlike u udjelu povišenog FSH, i LH te povijesti kriptorhizma među pacijentima s uzorcima u skupini H0 i H1 te P0 i P1. Udio pacijenata s povišenim FSH i LH te povijesti kriptorhizma prikazan je stupčastim grafikonom. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći Fisherovu analizu kontingencijskih tablica: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

5.4. MRI parametri

5.4.1. Vrijeme relaksacije T2

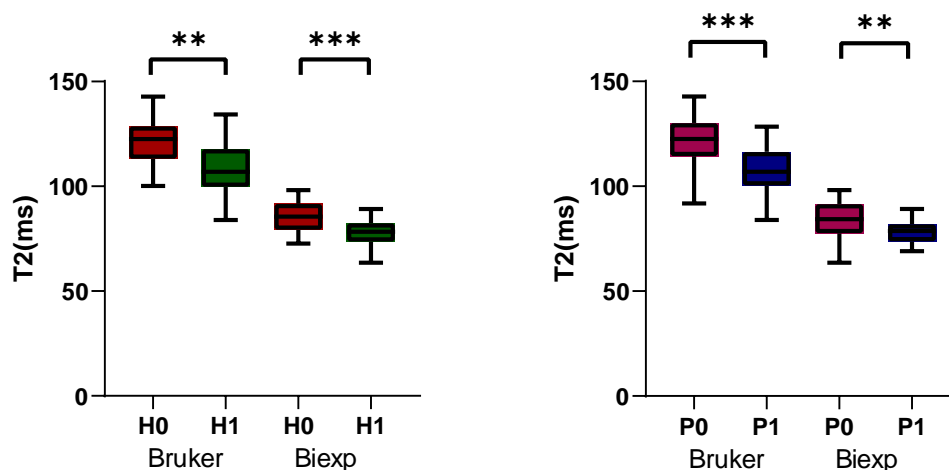
T2 relaksacijska krivulja je aproksimirana Brukerovim monoeksponecijalnim modelom, te bieksponencijalnim modelom razvijenim za potrebe ovog istraživanja, kako je opisano u poglavlju 4.5.1. Monoeksponecijalni model opisuje T2 relaksaciju jednom

eksponencijalnom funkcijom dok bieksponencijalni model pokušava odvojiti relaksacijsku krivulju vode od relaksacijske krivulje tkiva. Primijećena je značajna razlika između T2 uzoraka određenog na dva spomenuta načina (Slika 20).



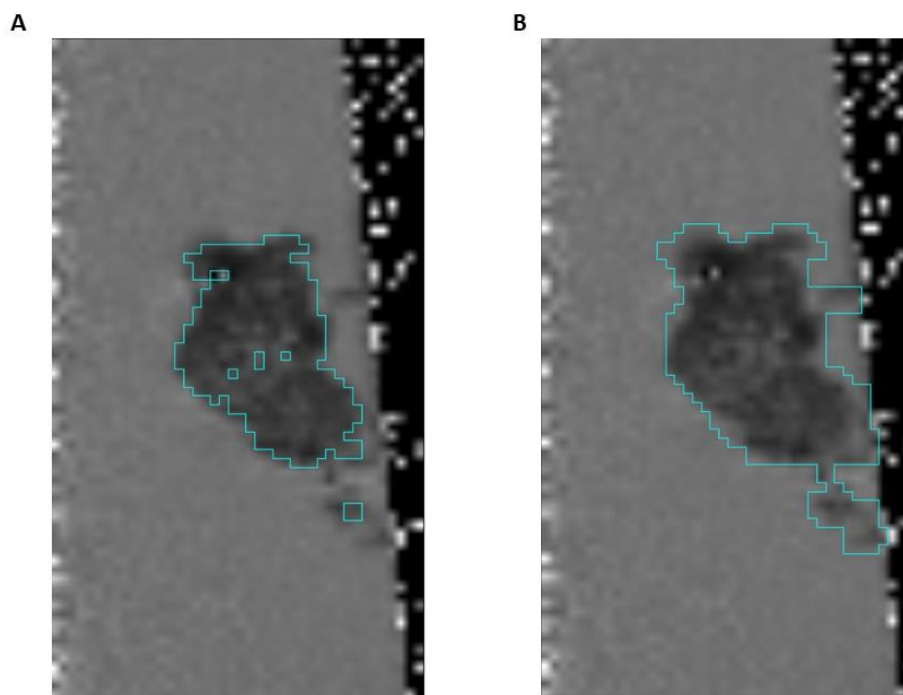
Slika 20. Usporedba T2 vrijednosti tkiva određene Brukerovim monoeksponencijalnim modelom te bieksponencijalnim modelom konstruiranim u Matlabu. Vrijednosti T2 prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$

T2 je uspoređen i između skupina H0 i H1 te P0 i P1 te je za obje verzije T2 utvrđena statistički značajna razlika (Slika 21). Za konstrukciju prediktivnog modela odabrana je T2 vrijednost tkiva dobivena vlastitim bieksponencijalnim modelom kako bi se smanjio utjecaj vode na T2. Budući da su za konstrukciju modela korišteni *ex vivo* uzorci sjemenika koji su rahliji nego tkivo unutar samog sjemenika te su snimani u fiziološkoj otopini, potreba za smanjenjem utjecaja vode na vrijednost T2 je bila još veća kako bi model mogao biti što bliže klinički primjenjivom.

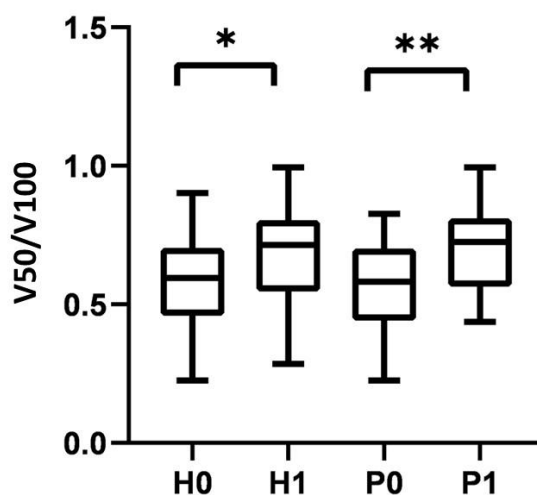


Slika 21. Razlike vrijednosti T2 tkiva između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti T2 prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Na monoeksponencijalnim T2 mapama uzoraka dobivenim u programu Paravision su određeni ROI-evi koji su sadržavali cijeli uzorak. S pomoću bieksponencijalnog modeliranja izračunat je i postotak tkiva u svakom vokselu te su određeni i ROI-evi koji su sadržavali samo voksele koji sadržavaju barem 50 % tkiva (Slika 22). Omjer volumena tkiva s udjelom slobodne tekućine ispod 50 % (V50) i ukupnog volumena tkivnog uzorka (V100) uspoređen je između skupina uzoraka. Uočeno je da statistički značajno veći udio uzorka sadržava više od 50 % tkiva po vokselu u skupinama H1 nego H0 te u skupinama P1 nego P0 (Slika 23). Drugim riječima, uzorci s lošijom histološkom slikom koji ne sadržavaju spermije su rahliji, te sadržavaju više vode što može utjecati na vrijednosti mjerenih parametara.



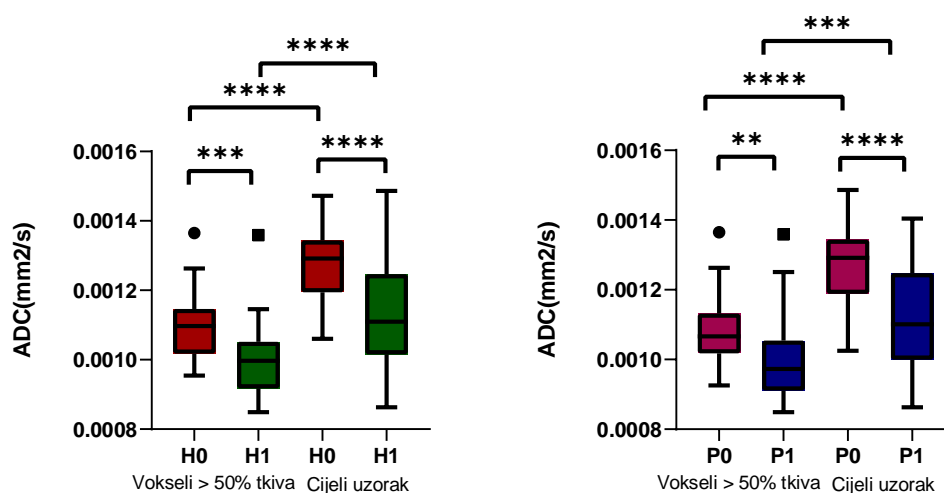
Slika 22. T2 mapa uzorka sjemenika s označenim ROI-em koji sadržava voksele s više od 50 % tkiva (A) te ROI-em koji sadržava sve voksele koji sadržavaju tkivo (B).



Slika 23. Udio volumena koji sadrži više of 50 % tkiva u ukupnom volumenu uzorka za skupine H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.4.2. Prividni koeficijent difuzije (ADC)

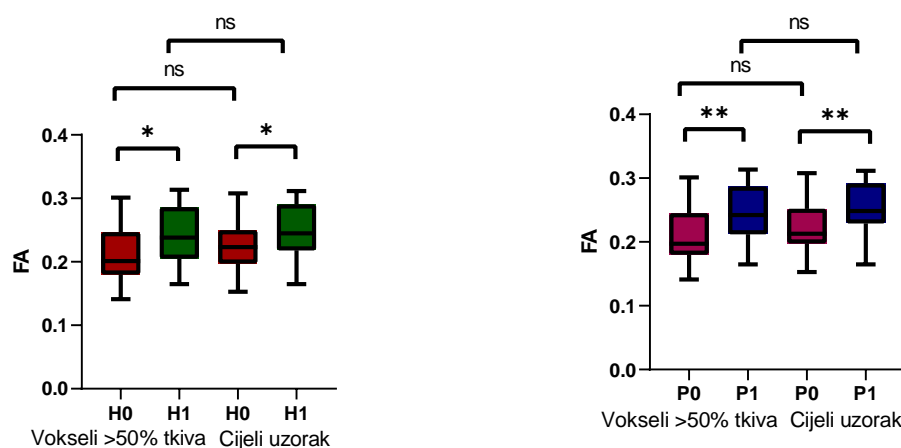
Difuzijsko snimanje (DWI) koristi difuziju molekula vode za generiranje kontrasta, budući da ista može biti smanjena u tkivima s većom gustoćom stanica. Taj efekt se kvantificira računanjem prividnog difuzijskog koeficijenta (ADC) koji je u takvim tkivima niži. ADC je određen i na ROI-evima koji obuhvaćaju cijeli uzorak i na ROI-evima koji sadržavaju samo voksele s više od 50 % tkiva (ADC50) te su te vrijednosti uspoređene kao i vrijednosti u skupinama H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednost ADC-a je bila značajno veća u skupini H0 nego u skupini H1 te u skupini P0 nego u skupini P1 što ukazuje na veću razinu difuzije u skupinama s lošijom histološkom slikom, odnosno nedostatkom spermija i zrelih spermataida. Vrijednosti ADC-a koje su određene na cijeloj površini tkiva (ADC100) su značajno veće nego vrijednosti ADC50. Razlika u vrijednosti ADC-a među skupinama H0 i H1 te P0 i P1 je manja za vrijednosti ADC100 nego za vrijednosti ADC50 (Slika 24). To ukazuje na utjecaj vode u tkivu na vrijednost ADC-a te na neproporcionalno povećanje ADC-a između skupina uzoraka budući da su uzorci bez spermija rahliji i sadržavaju više vode. Iz tih razloga u konstrukciji prediktivnog modela korištene su vrijednosti ADC50.



Slika 24. Razlike vrijednosti ADC tkiva između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti ADC prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.4.3. Frakcionalna anizotropija (FA)

Snimanje difuzijskog tenzora (DTI) omogućuje izračun dodatnih parametara poput frakcionalne anizotropije (FA) koja opisuje usmjerenost difuzije. FA je određen i na ROI-evima koji obuhvaćaju cijeli uzorak (FA100) i na ROI-evima koji sadržavaju samo voksele s više od 50 % tkiva (FA50) te su te vrijednosti uspoređene kao i vrijednosti u skupinama H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednost FA je bila značajno veća u skupini H1 nego u skupini H0 te u skupini P1 nego u skupini P0 što ukazuje na veću usmjerenost difuzije u tkivu koje sadrži više stanica. Vrijednosti FA100 nisu bile značajno veće od vrijednosti FA50. Nije primijećeno povećanje razlike u vrijednosti FA između skupina H0 i H1 te između P0 i P1 kad se uspoređuju vrijednosti FA100 i FA50 (Slika 25). Za razliku od ADC-a, rahlost tkiva i količina vode u tkivu nemaju značajan utjecaj na izmjerene vrijednosti FA u tkivu. U konstrukciji prediktivnog modela svejedno je korištena vrijednost FA50 radi ujednačenosti ulaznih podataka.

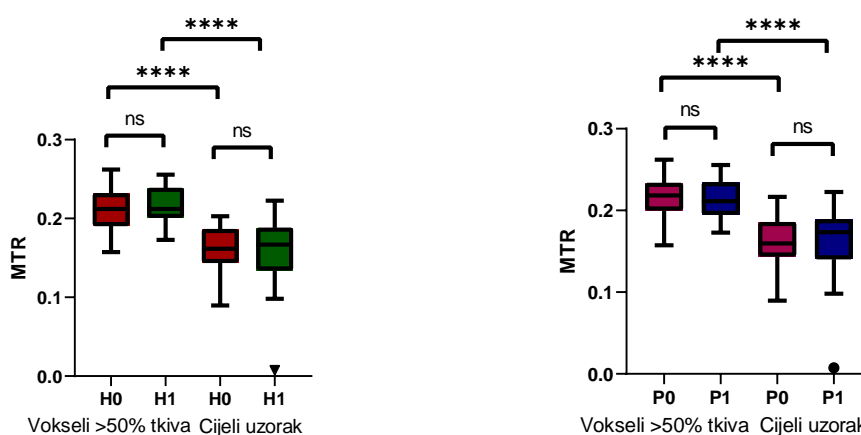


Slika 25. Razlike vrijednosti FA tkiva između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti FA prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.4.4. Omjer prijenosa magnetizacije (MTR)

Omjer prijenosa magnetizacije (MTR) odražava gustoću makromolekula u tkivu, a određen je na ROI-evima koji obuhvaćaju cijeli uzorak (MTR100) i na ROI-evima koji sadržavaju samo voksele s više od 50 % tkiva (MTR50) te su te vrijednosti uspoređene kao i vrijednosti u skupinama H0 i H1 te P0 i P1. Nije primijećena razlika u vrijednosti MTR između skupina H0 i H1 te skupina P0 i P1. Vrijednosti MTR100 su bile značajno manje od vrijednosti

MTR50 zbog većeg udjela vode, odnosno manjeg udjela tkiva koje sadrži makromolekule u uzorku. Nije primijećeno povećanje razlike u vrijednosti MTR između skupina H0 i H1 te P0 i P1 kad se vrijednosti MTR100 i MTR50 (Slika 26). Rahlost tkiva i količina vode u tkivu imaju značajan utjecaj na izmjerene vrijednosti MTR u tkivu, no nije primijećeno povećanje razlike u vrijednosti MTR među skupinama H0 i H1 te P0 i P1 kad se usporede vrijednosti MTR100 i MTR50. U konstrukciji prediktivnog modela je korištena vrijednost MTR50 radi usklađenosti s drugim varijablama koje su pokazale izraženije promjene u mjerenim rezultatima pri ograničavanju ROI-a.



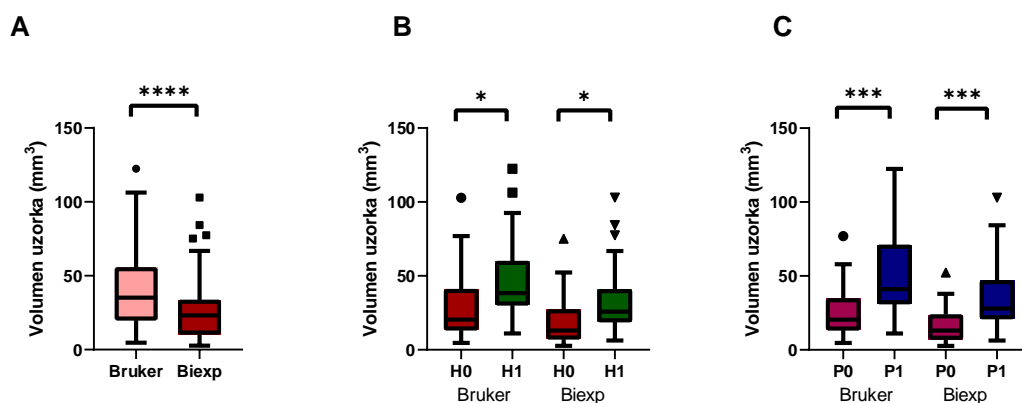
Slika 26. Razlike vrijednosti MTR tkiva između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti MTR prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.5. Parametri spektra MRS signala

Dva osnovna problema kvantifikacije spektara i numeričke usporedbe rezultata su infiltracija vode u snimani uzorak, što utječe na točnost izmjerenog volumena, te nejednako potiskivanje dominantnog signala vode, što utječe na prividno pomicanje čitavog mjenog spektra duž frekvencijske osi. Problemu infiltracije vode u uzorak pristupljeno je biekspencijalnom rekonstrukcijom T2 mape i točnijim određivanjem volumena uzoraka, a problemu nejednagog potiskivanja signala vode izradom kapilare s kalibriranim teretom TMS-a. Za optimalnu separaciju komponenata u izmjerenim MR spektrima snimljeni su spektri metabolita od interesa uz TMS kao referencu.

5.5.1. Volumen uzoraka

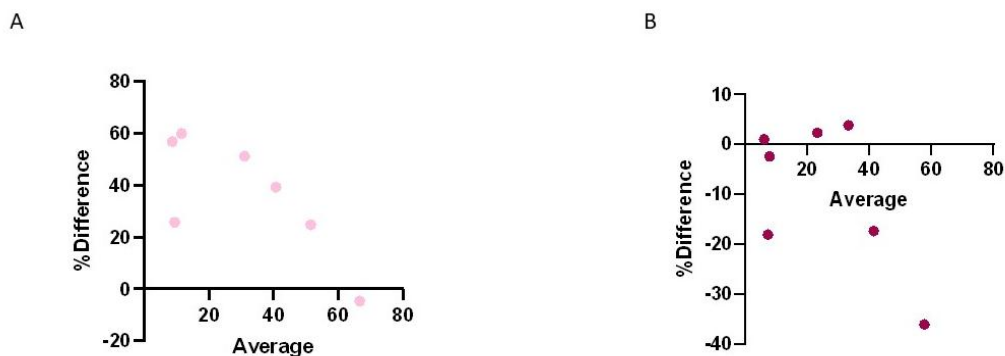
Kako bi se mogla izračunati koncentracija metabolita u uzorcima bilo je potrebno odrediti volumen uzoraka. Volumen je određen na T2 mapama uzoraka preko skripte u Matlabu na dva načina, analogno određivanju T2, zbrajanjem volumena svih presjeka. Površina ROI-eva je dobivena na dva načina, postavljanjem praga intenziteta signala na slikama dobivenim direktno iz programa Paravision te određivanjem udjela tkiva u vokselu preko bieksponecijalne funkcije. Uočeno je da su volumeni uzoraka određena na dva spomenuta načina značajno različiti (Slika 27 A). Uočena je i značajna razlika između volumena uzoraka u skupinama H0 i H1 te P0 i P1 za obje metode određivanja volumena (Slika 27 B,C). Volumeni uzoraka s boljom histološkom slikom i koji sadržavaju spermije su značajno veći od onih s lošijom histološkom slikom koji ne sadržavaju spermije što je u skladu s podatkom da je veći volumen sjemenika povezan s uspješnom ekstrakcijom spermija, a veći volumen sjemenika ujedno omogućava kirurgu da uzme veći uzorak tkiva.



Slika 27. Usporedba volumena uzoraka određenih Brukerovim monoeksponencijalnim modelom i bieksponecijalnim modelom konstruiranim u Matlabu (A) te usporedba između skupina H0 i H1 (B) te P0 i P1 (C). Vrijednosti volumena prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Za nekoliko uzoraka je određena masa vaganjem te je određen volumen preko poznate gustoće tkiva sjemenika koja iznosi 1.082 g/cm^3 (126). Uspoređujući tako dobiven volumen uzorka s volumenom dobivenim ovim dvjema metodama ocijenjena je točnost svake metode Bland-Altmanovim testom. Srednja razlika za volumen određen direktno iz slike Brukerovog programa Paravision je bila $36.17 \% \pm 22.86 \%$, a za volumen određen bieksponecijalnim

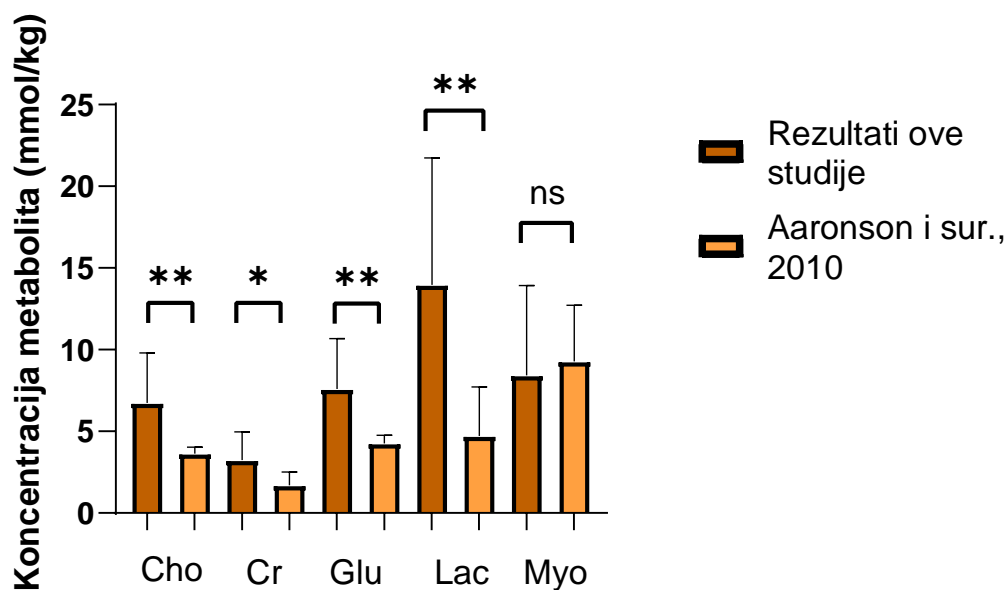
modelom $-9.549 \% \pm 14.83 \%$ (Slika 28). Volumen dobiven bieksponencijalnim modelom je bio najtočniji u određivanju volumena te je korišten u određivanju koncentracije metabolita u tkivu. Određivanje referentnog volumena tkiva je limitirano preciznošću vaganja te činjenicom da bi količina spermija i zrelih spermatida u tkivu mogla utjecati na gustoću tkiva.



Slika 28. Ocjena točnosti određivanja volumena Brukerovim monoeksponencijalnim modelom (A) te bieksponencijalnim modelom konstruiranim u Matlabu (B). Vrijednosti su prikazane Bland-Altmanovim dijagramom. Srednje odstupanje za volumen određen direktno iz slike Brukerovog programa Paravision je bila $36.17 \% \pm 22.86 \%$, a za volumen određen bieksponencijalnim modelom $-9.549 \% \pm 14.83 \%$

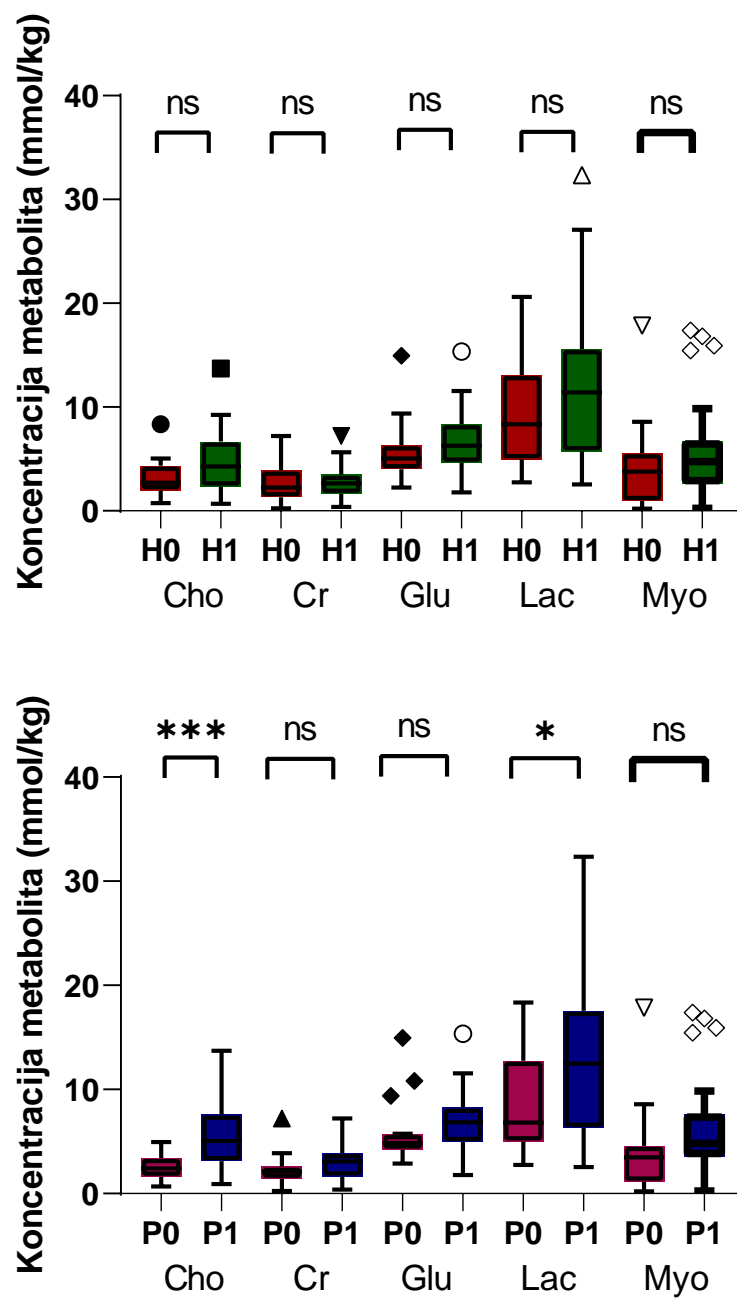
5.5.2. Koncentracije metabolita

Koncentracije metabolita određene na uzorcima s dijagnozom hipospermatogeneze uspoređene su koncentracijama metabolita određenim na ekvivalentnim uzorcima u studiji Aaronson i sur., 2010 (114) kako bi se procijenilo koliko su usklađeni. Koncentracije kolina, kreatina, glutamata i laktata su bile značajno više u ovoj studiji u usporedbi sa studijom Aaronsona i suradnika, dok koncentracija mio-inozitola nije bila značajno različita. Koncentracije metabolita između studija su usporedive, a razlike bi mogle biti uzrokovane različitom metodologijom studija (Slika 29).



Slika 29. Usporedba koncentracija metabolita određenih na uzorcima s dijagnozom hipospermatogeneze u ovoj studiji s koncentracijama određenim u studiji Aaronson i sur., 2010. Prosječne koncentracije kolina (Cho), kreatina (Cr), glutamata (Glu), laktata (Lac) te mio-inozitola (Myo) te pripadajuće standardne devijacije su prikazane stupčastim grafikonom. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

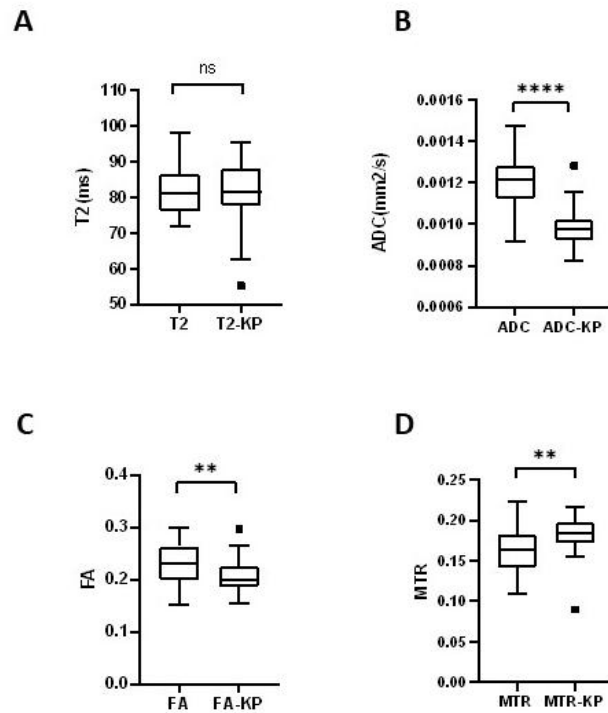
Koncentracije kolina (Cho), kreatina (Cr), glutamata (Glu), laktata (Lac) te mio-inozitola (Myo) su određene te uspoređene između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Nije uočena značajna razlika u koncentraciji niti jednog metabolita između skupina H0 i H1. Koncentracija kolina i laktata su bile značajno veće u skupini P1 nego P0 dok za koncentracije ostalih metabolita nije primijećena značajna razlika (Slika 30).



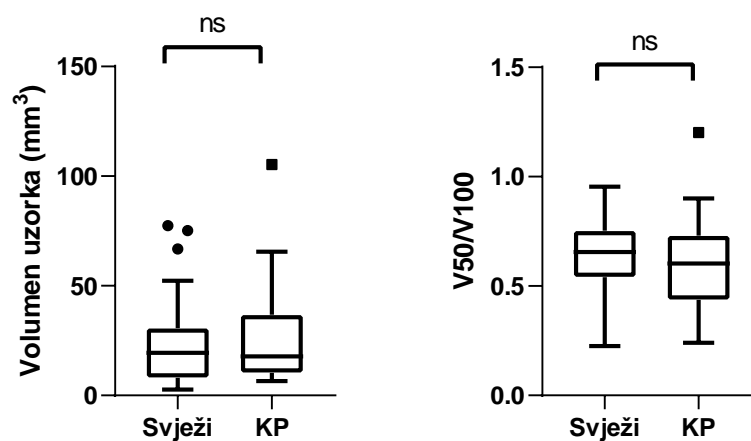
Slika 30. Razlike u koncentracijama metabolita između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Vrijednosti koncentracija kolina (Cho), kreatina (Cr), glutamata (Glu), laktata (Lac) i mioinozitola (Myo) prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.6. Utjecaj krioprezervacije na MRI i MRS parametre

Dio uzoraka ($n=30$) je podijeljen popola te je jedna polovica snimana svježa dok je druga polovica podvrgnuta programiranom zamrzavanju te snimana nakon odmrzavanja tkiva. Parametri dobiveni snimanjem magnetskom rezonancijom, uključujući i koncentracije metabolita uspoređene su između svježih i krioprezerviranih uzoraka te unutar krioprezerviranih uzoraka između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Uspoređeno je srednje vrijeme relaksacije T2 određeno bieksponencijalnim modelom te parametri ADC, FA i MTR određeni na ROI-evima koji sadržavaju samo voksele s više od 50 % tkiva. Nije primijećena značajna razlika između T2 svježih i T2 krioprezerviranih uzoraka, dok je ADC bio značajno viši kod svježih nego kod krioprezerviranih uzoraka što ukazuje na nižu razinu difuzije u krioprezerviranim uzorcima. FA je bio značajno viši u svježim uzorcima nego u krioprezerviranim što ukazuje na veću usmjerenost u svježim uzorcima i potencijalno manju očuvanost građe tkiva u krioprezerviranim uzorcima. MTR je bio značajno viši u krioprezerviranim uzorcima (Slika 31). Nije primijećena značajna razlika u volumenu niti rahlosti između polovice uzorka koja je snimana svježa i polovice koja je krioprezervirana (Slika 32).

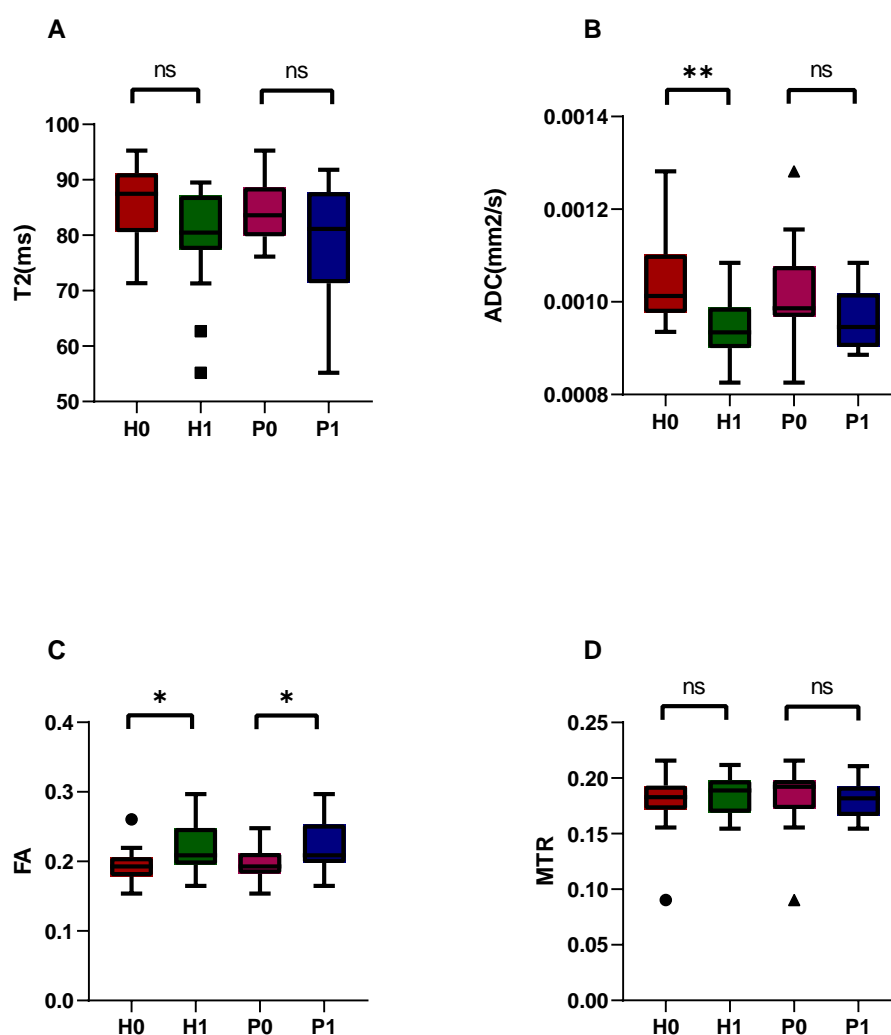


Slika 31. Utjecaj krioprezervacije na vrijednosti T2, ADC, FA i MTR. Vrijednosti T2(A), ADC (B), FA (C) i MTR (D) su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (****) p<0,0001.



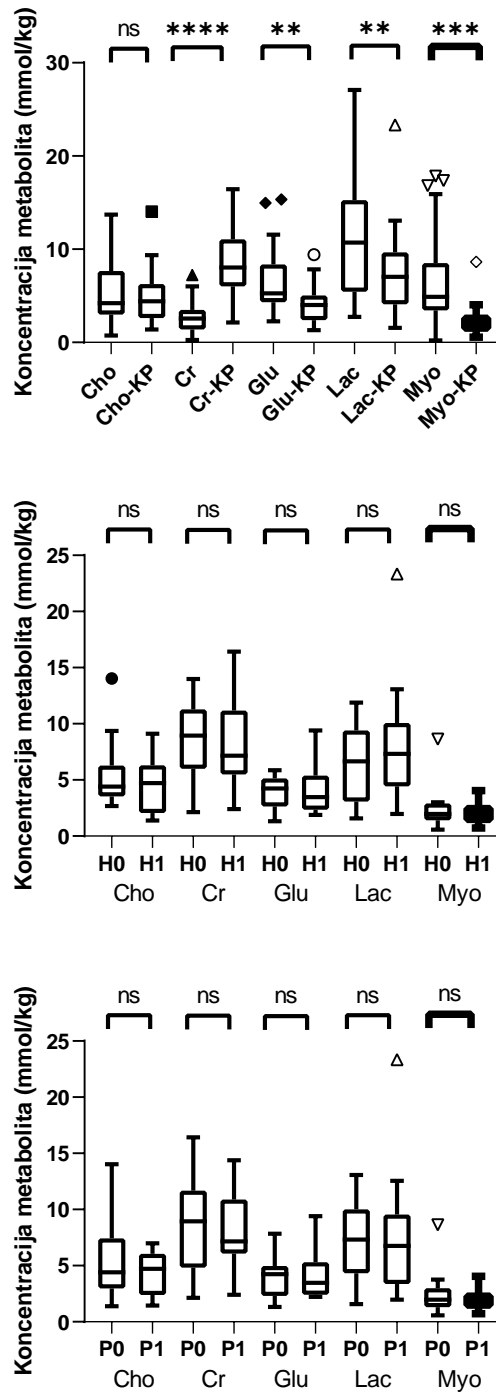
Slika 32. Razlika u volumenu i udjelu uzorka koji sadrži više of 50 % tkiva u ukupnom volumenu uzorka između svježih i krioprezerviranih (KP) uzoraka. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (****) p<0,0001.

Za razliku od svježih uzoraka, kod krioprezerviranih nije primijećena statistički značajna razlika u iznosu T2 između H0 i H1 te P0 i P1. ADC je u krioprezerviranih uzoraka bio značajno viši u skupini H0 nego H1 se podudara s mjerenjima izvedenima na svježim uzorcima. Nije primijećena razlika između P0 i P1 skupine krioprezerviranih uzoraka dok je u svježim uzorcima ADC bio značajno viši u skupini P0. FA je bio značajno viši u skupini H1 nego H0 i skupini P1 nego P0 što je u skladu s rezultatima na svježim uzorcima. Nije primijećena razlika u vrijednosti MTR-a krioprezerviranih uzoraka između skupina H0 i H1 te P0 i P1 što je također u skladu s rezultatima kod svježih uzoraka (Slika 33).



Slika 33. Usporedba T2, ADC, FA i MTR krioprezerviranih uzoraka između H0 i H1 te P0 i P1 skupina. Vrijednosti T2 (A), ADC (B), FA (C) te MTR (D) su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

Pri usporedbi koncentracije metabolita između krioprezerviranih i svježih uzoraka nije uočena razlika u koncentraciji kolina. Koncentracija kreatina bila je značajno viša u krioprezerviranim uzorcima, dok su koncentracije glutamata, laktata i mio-inozitola bile značajno niže kod krioprezerviranih nego kod svježih uzoraka. Nije uočena značajna razlika u koncentraciji niti jednog metabolita između skupina H0 i H1 te P0 i P1 (Slika 34). Za usporedbu, kod svježih uzoraka uočena je viša koncentracija kolina i laktata u skupini P1 nego P0, kako je izloženo u poglavlju 5.5.2.



Slika 34. Utjecaj krioprezervacije na koncentracije metabolita te razlika u koncentracijama metabolita između H0 i H1 te P0 i P1 skupina. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

5.7. Prediktivni modeli

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj prediktivnog modela za prisutnost spermija u tkivu sjemenika na temelju prikupljenih parametara te ocjena njegove prediktivnosti. Prediktivnost se ocjenjivala usporedbom vrijednosti AUC te pozitivnih (PPV) i negativnih prediktivnih vrijednosti (NPV). $AUC \geq 0.7$ se smatra prihvatljivim (127). Budući da je potencijalna klinička primjena ovog prediktivnog modela u identifikaciji vjerojatno negativnih ishoda biopsije sjemenika, NPV modela je prioritet.

Ispitana je prediktivnost mjerenih parametara za varijablu H (kategorizacija po histološkoj prisutnosti spermija i zrelih spermatida u uzorcima) i varijablu P (kategorizacija po prisutnosti signala PRM1 u uzorcima). Prvo je ispitana korisnost pojedinačnih nezavisnih varijabli za gore navedene zavisne varijable, a potom su konstruirani prediktivni modeli koristeći multivarijatnu regresiju, a osim klasičnih prediktivnih modela, ispitana je i primjenjivost prediktivnog modela zasnovanog na strojnom učenju. Specifičnost ovog istraživanja je primjena ex vivo snimanja na pretkličkom MRI sustavu jakosti polja 7T. No, u redovnoj kliničkoj primjeni susreću se uređaji do 2T, rjeđe 3T. Zbog toga, kao i zbog vremenskih ograničenja, neke varijable nije moguće prikupiti ili nisu dovoljno pouzdane. U tu svrhu ispitana je primjenjivost prediktivnih modela koji koriste reducirani skup ulaznih podataka. Tri reducirana modela su konstruirana i uspoređena:

5.7.1. Procjena korisnosti nezavisnih varijabli u prediktivnom modelu

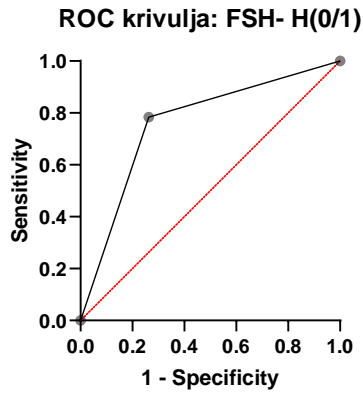
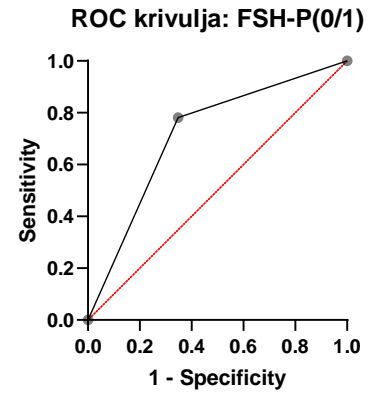
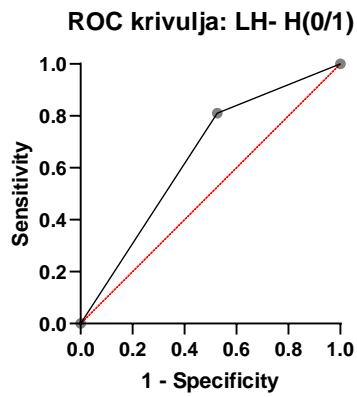
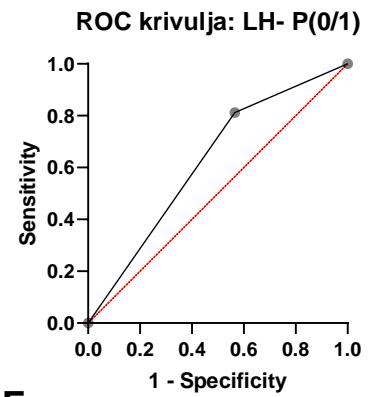
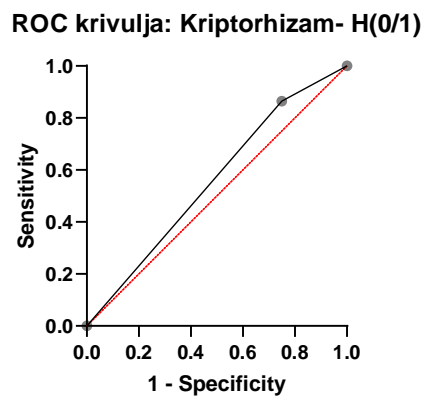
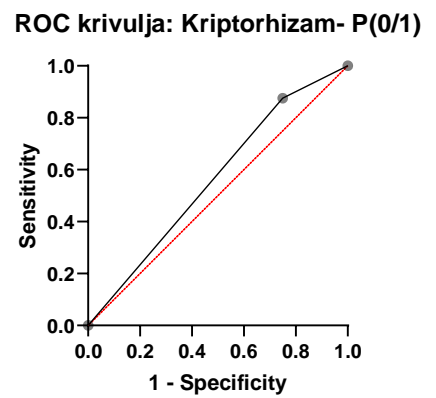
Prediktivnost svakog parametra analizirana je jednostavnom logističkom regresijom. Za svaku varijablu određeni su površina ispod ROC krivulje (AUC) te pozitivna i negativna prediktivna vrijednost. Vrijednosti AUC, PPV i NPV nezavisnih varijabli navedene su u Tablici 7 i Tablici 8. ROC krivulje i dijagrami predviđenih i opserviranih vrijednosti prikazani su u slikama 35-44.

Tablica 7. Vrijednosti AUC s pridruženim 95 % intervalom pouzdanosti (95 % CI) i p vrijednosti te PPV i NPV za nezavisne varijable u predikciji varijable H

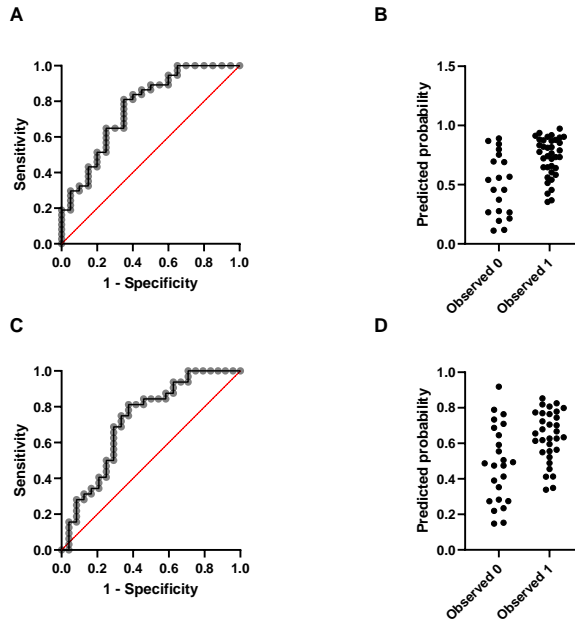
Nezavisna varijabla	AUC	95 % CI	p	PPV	NPV
FSH	0.7167	[0.5745, 0.8589]	0.0065	75.76 %	68.18 %
LH	0.6422	[0.4828, 0.8017]	0.0835	75.00 %	56.25 %
Kriptorhizam	0.5574	[0.3968, 0.7181]	0.4773	64.91 %	-
T2	0.7649	[0.6311, 0.8987]	0.001	76.74 %	71.43 %
ADC	0.7662	[0.6429, 0.8896]	0.001	74.42 %	64.29 %
FA	0.6973	[0.5527, 0.8419]	0.0146	69.57 %	54.55 %
MTR	0.5176	[0.3565, 0.6786]	0.8279	64.91 %	-
Kolin	0.6513	[0.4892, 0.8134]	0.1024	0.6513 %	-
Kreatin	0.5546	[0.3617, 0.7476]	0.5554	70.83 %	-
Glutamat	0.6324	[0.4566, 0.8081]	0.153	70.83 %	-
Laktat	0.5987	[0.4251, 0.7724]	0.2864	70.83 %	-
Mio-inozitol	0.6008	[0.4194, 0.7823]	0.2763	70.83 %	-

Tablica 8. Vrijednosti AUC s pridruženim 95 % intervalom pouzdanosti (95 % CI) i p vrijednosti te PPV i NPV za nezavisne varijable u predikciji varijable P

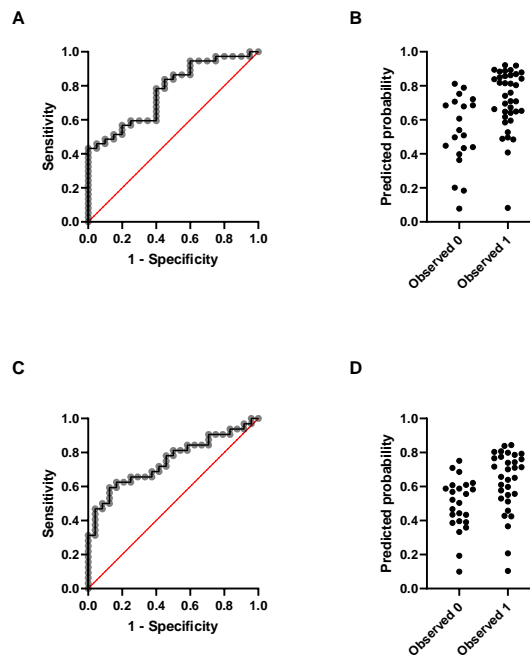
Nezavisna varijabla	AUC	95 % CI	p	PPV	NPV
FSH	0.7603	[0.6213, 0.8993]	0.0015	85.29 %	63.64 %
LH	0.6236	[0.47, 0.7773]	0.1205	66.67 %	62.5 %
Kriptorhizam	0.5625	[0.4079, 0.7171]	0.4268	60.87 %	60.00 %
T2	0.7227	[0.582, 0.8633]	0.0046	72.22 %	70.00 %
ADC	0.75	[0.6232, 0.8768]	0.0015	66.67 %	64.71 %
FA	0.7292	[0.5875, 0.8708]	0.0036	69.57 %	54.55 %
MTR	0.5443	[0.3891, 0.6994]	0.5735	57.14 %	-
Kolin	0.7932	[0.6675, 0.9188]	0.0009	75.00 %	56.25 %
Kreatin	0.6603	[0.5003, 0.8204]	0.0685	67.44 %	60.00 %
Glutamat	0.6546	[0.4863, 0.823]	0.0789	64.58 %	-
Laktat	0.6793	[0.5282, 0.8304]	0.0416	68.42 %	50.00 %
Mio-inozitol	0.6736	[0.5078, 0.8395]	0.0486	64.58 %	-

A**B****C****D****E****F**

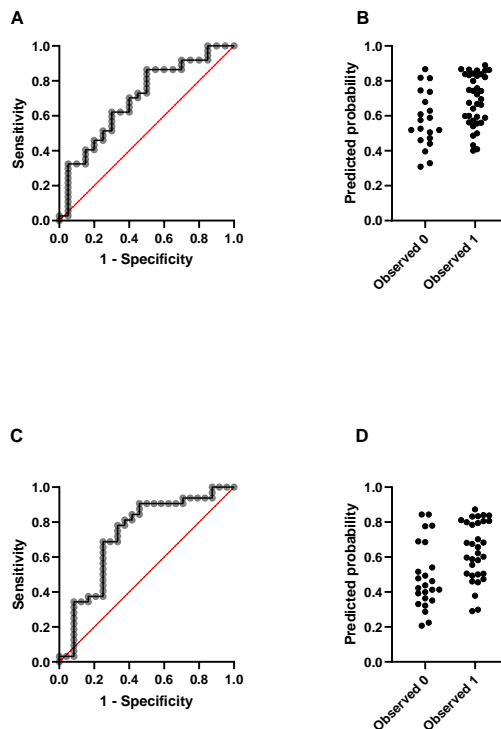
Slika 35. Prediktivnost podataka iz dijagnostičke obrade pacijenata ocijenjena je jednostavnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljama koje ilustriraju prediktivnost FSH (A,B), LH (C,D) i povijesti kriptorhizma (E,F) za varijable H i P.



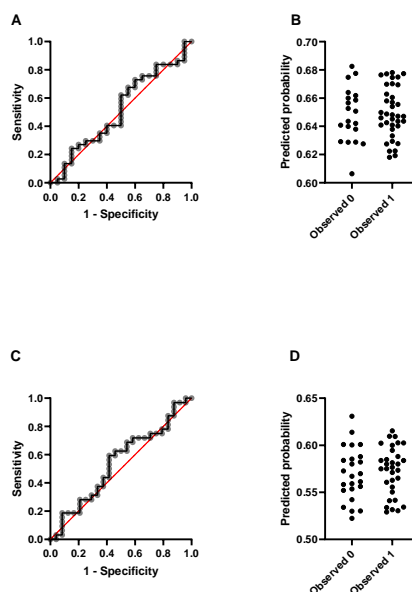
Slika 36. Ocjena prediktivnosti varijable T2 jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).



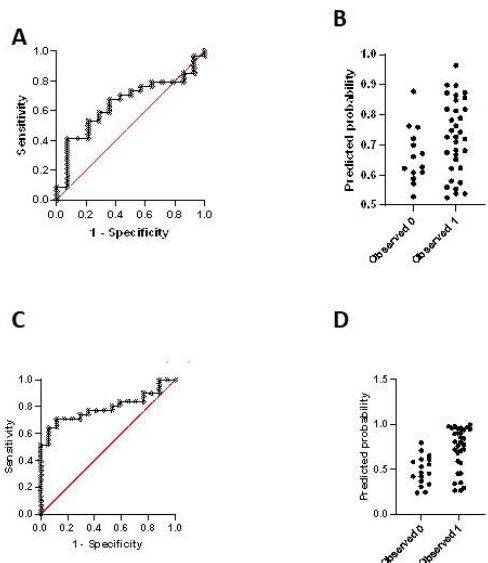
Slika 37. Ocjena prediktivnosti varijable ADC jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).



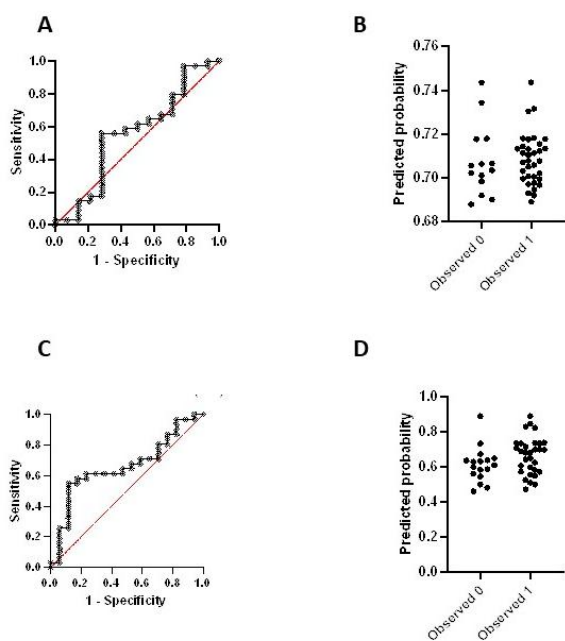
Slika 38. Ocjena prediktivnosti varijable FA jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).



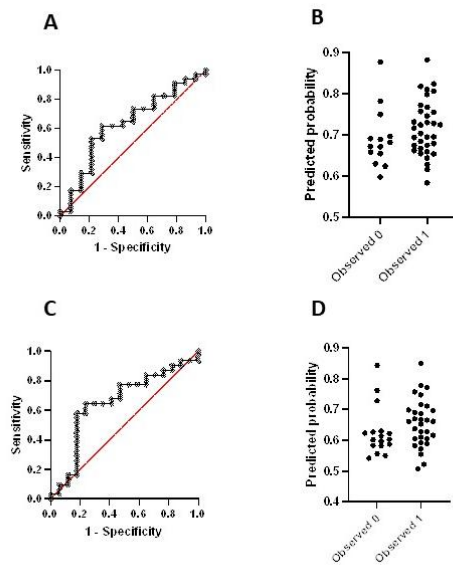
Slika 39. Ocjena prediktivnosti varijable MTR jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).



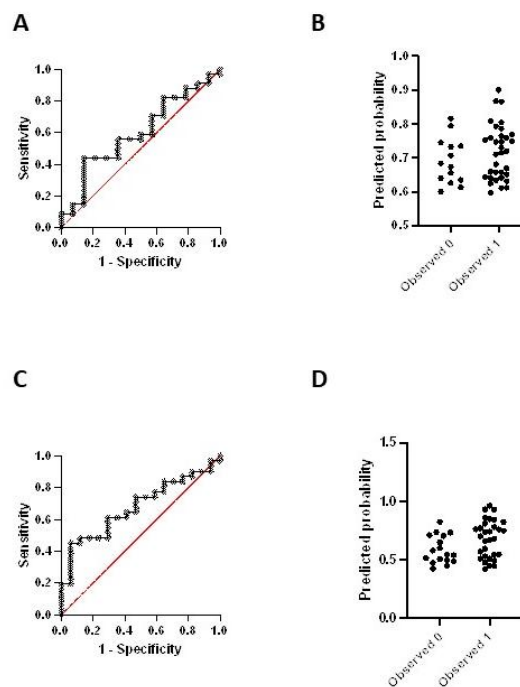
Slika 40. Ocjena prediktivnosti koncentracije kolina jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).



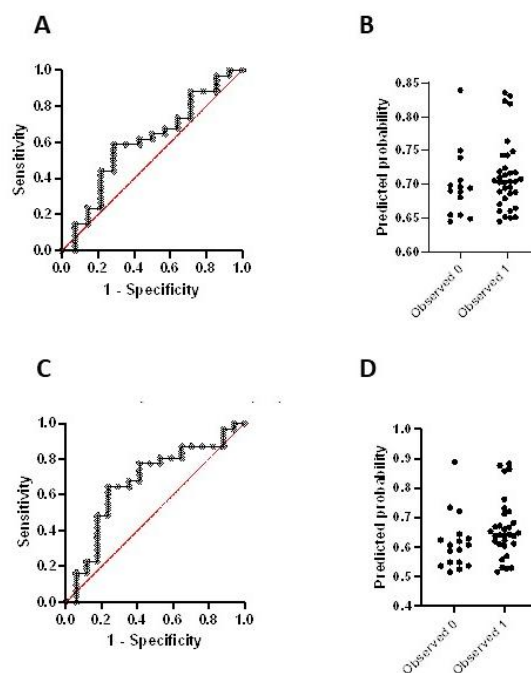
Slika 41. Ocjena prediktivnosti koncentracije kreatina jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D)



Slika 42. Ocjena prediktivnosti koncentracije glutamata jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).

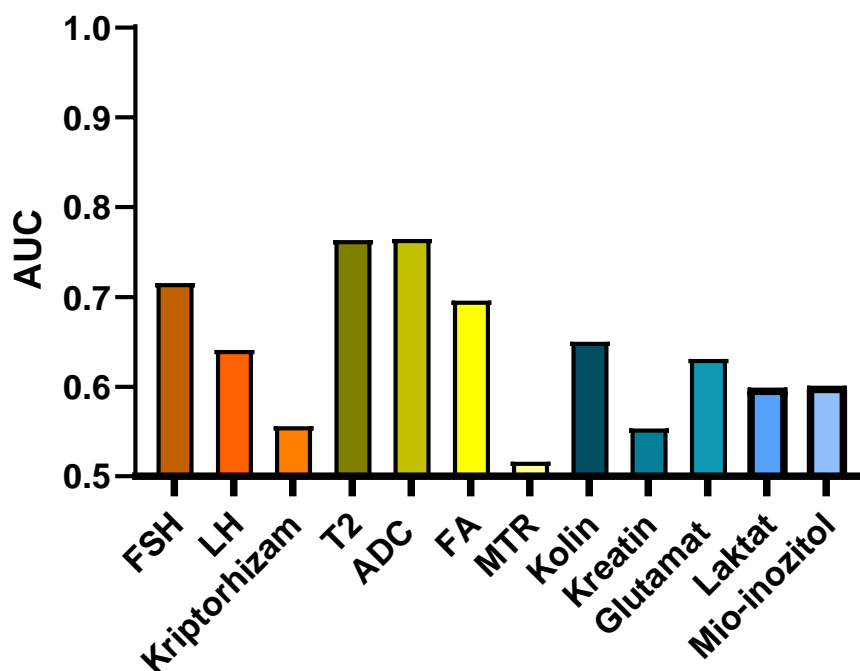


Slika 43. Ocjena prediktivnosti koncentracije laktata jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).

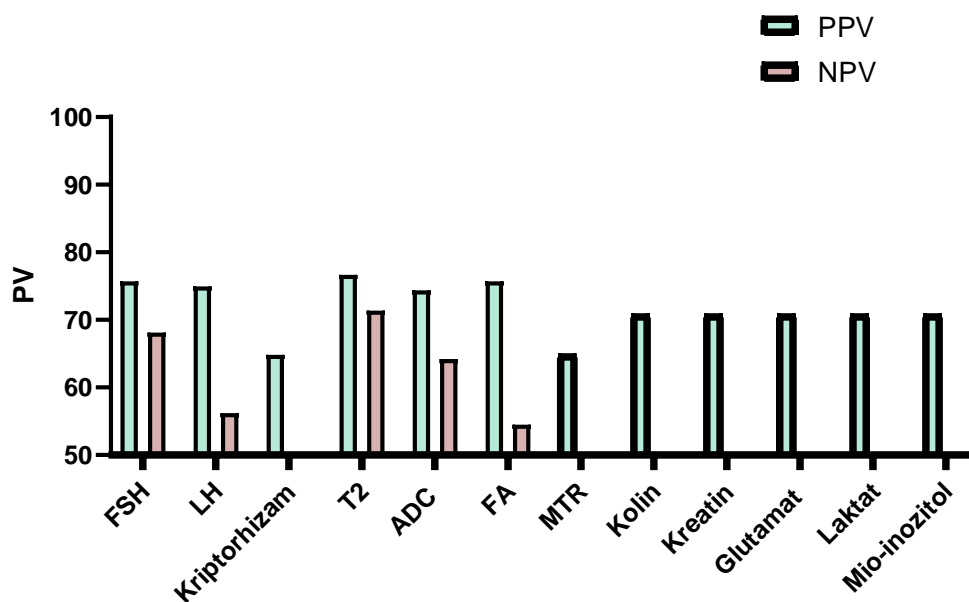


Slika 44. Ocjena prediktivnosti koncentracije mio-inozitola jednostavnom logističkom regresijom prikazana ROC krivuljama te dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti koje ilustriraju prediktivnost za varijable H (A,B) i P (C,D).

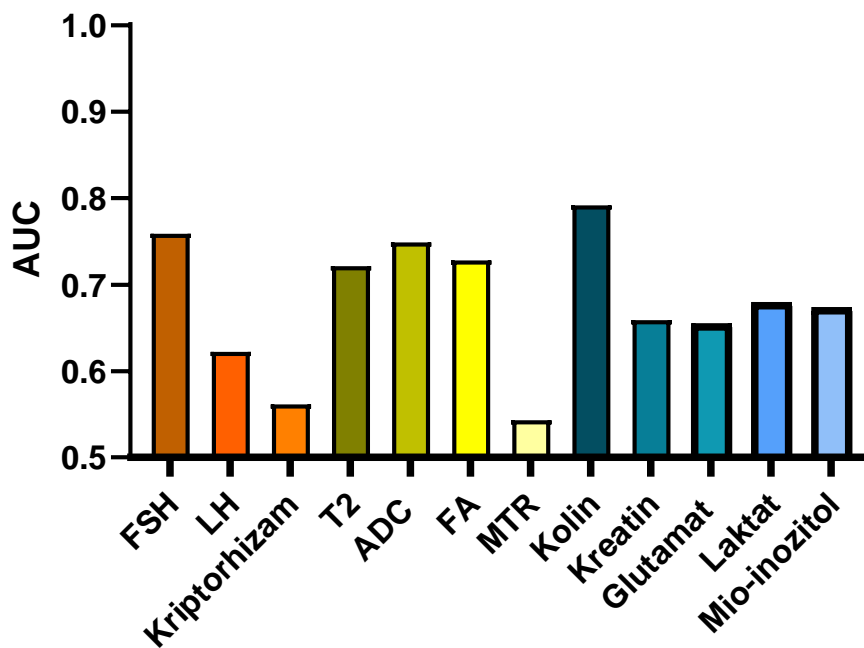
Kako bi se procijenila korisnost nezavisnih varijabli u prediktivnim modelima usporedila se vrijednost AUC te pozitivnih (PPV) i negativnih prediktivnih vrijednosti (NPV) modela konstruiranih jednostavnom logističkom regresijom. U predikciji varijable H vrijednost $AUC \geq 0.7$ imali su ADC, T2, FSH i FA (Slika 45). Od varijabli s $AUC < 0.7$ jedino LH je imao negativnu prediktivnu vrijednost (Slika 46). $AUC \geq 0.7$ u predikciji varijable P imali su kolin, FSH, ADC, FA i T2 (Slika 47). Od varijabli s $AUC < 0.7$ negativnu prediktivnu vrijednost imali su LH, kriptorhizam, kreatin i laktat (Slika 48).



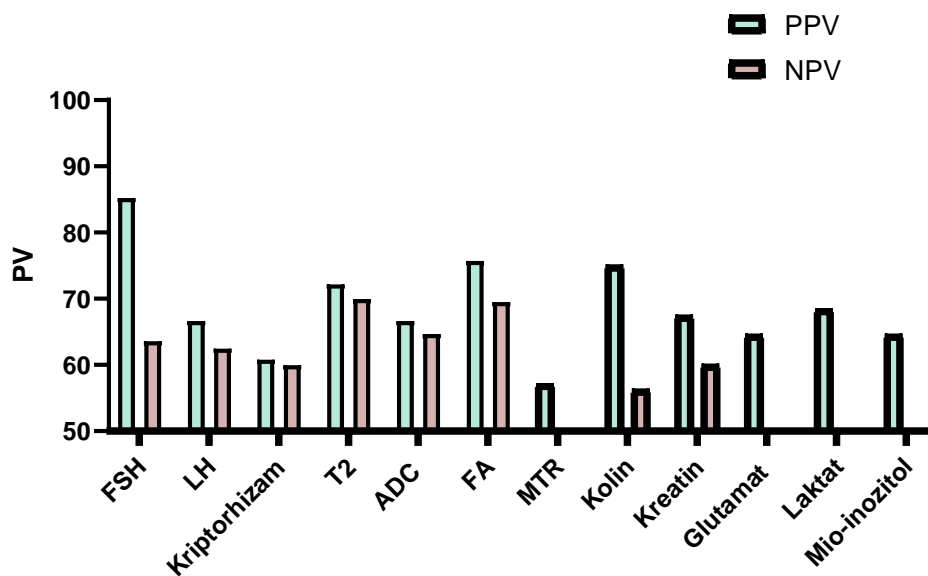
Slika 45. Vrijednosti AUC za predikciju varijable H dobivene jednostavnom logističkom regresijom pojedinačnih varijabli prikazane stupčastim grafikonom.



Slika 46. Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti pojedinačnih varijabli u predikciju varijable H dobivene jednostavnom logističkom regresijom prikazane stupčastim grafikonom.



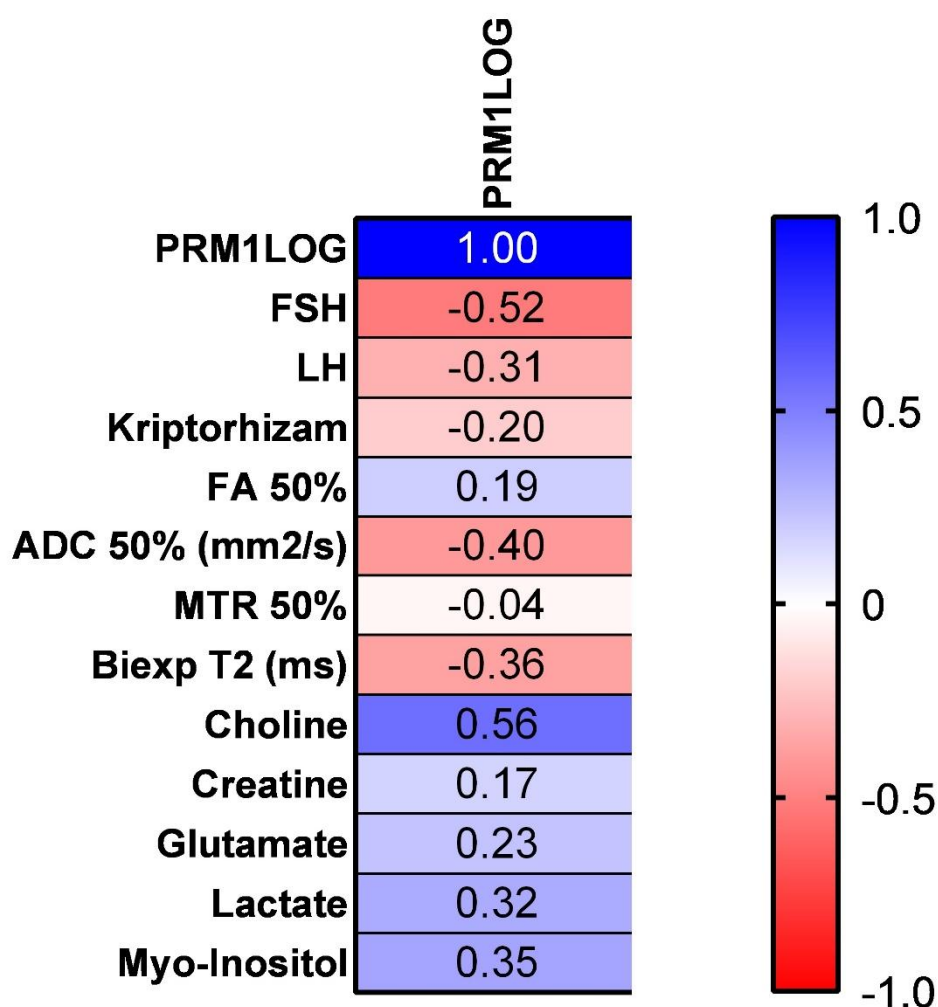
Slika 47. Vrijednosti AUC za predikciju varijable P dobivene jednostavnom logističkom regresijom pojedinačnih varijabli prikazane stupčastim grafikonom.



Slika 48. Vrijednosti pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti pojedinačnih varijabli u predikciju varijable H jednostavnom logističkom regresijom prikazane stupčastim grafikonom.

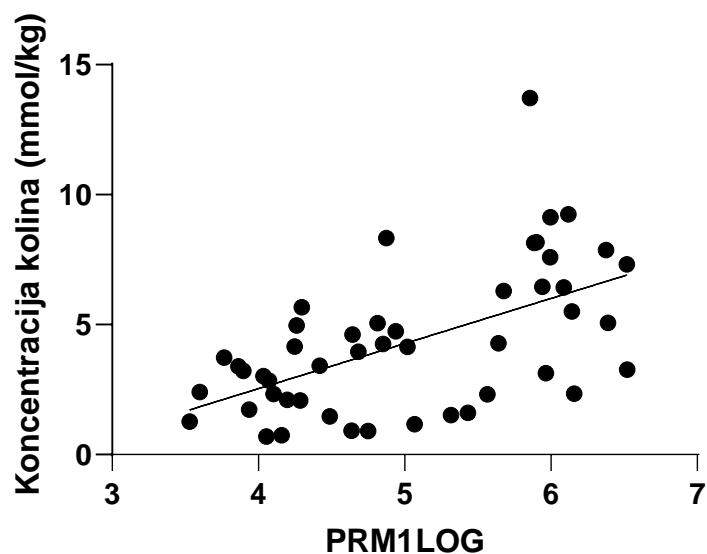
5.7.2. Analiza odnosa nezavisnih varijabli s količinom spermija i zrelih spermatida (PRM1LOG)

Kako bi se ispitaio odnos nezavisnih varijabli s količinom spermija i zrelih spermatida u uzorcima analizirana je njihova korelacija s varijablom PRM1LOG. Uočena je umjerena korelacija između varijable PRM1LOG i FSH ($r=-0.516$, $p<0.0001$) te koncentracije kolina u tkivu ($r=0.56$, $p<0.0001$). Uočena je i slaba korelacija varijable PRM1LOG s LH ($r=-0.31$, $p=0.023$), ADC ($r=-0.4$, $p=0.003$), T2 ($r=-0.36$, $p=0.006$) te koncentracijom laktata ($r=0.32$, $p=0.025$) i mio-inozitola u tkivu ($r=0.35$, $p=0.014$) (Slika 49).



Slika 49. Korelacija varijable PRM1LOG s nezavisnim varijablama prediktivnog modela (FSH, LH, Kriptorhizam, FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatina, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol). Vrijednosti Pearson r koeficijenta su prikazane u obliku toplinske karte.

Jednostavna linearna regresija s kolinom kao nezavisnom varijablom bila je statistički značajna ($R^2=0.3172$, $F(1,46)=21.37$, $p<0.0001$) što ukazuje na povezanost koncentracije kolina s količinom spermija i zrelih spermatida u tkivu (Slika 50).



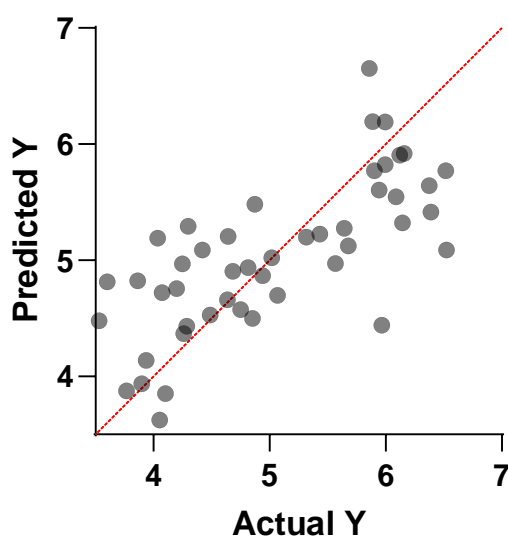
Slika 50. Prikaz odnosa varijable PRM1LOG s koncentracijom kolina u tkivu sjemenika. Jednostavna linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.3172$, $F(1,46)=21.37$, $p<0.0001$).

Multivarijatna linearna regresija koja je ispitala linearnu povezanost svih 12 nezavisnih varijabli s varijablom PRM1LOG bila je statistički značajna ($R^2=0.5230$, $F(12,34)=3.107$, $p=0.046$) što ukazuje na značajnu povezanost nezavisnih varijabli s količinom spermija u tkivu (Tablica 9, Slika 51).

Tablica 9. Prikaz rezultata multivarijatne linearne regresije u predviđanju varijable PRM1LOG

Varijable	Koeficijent (β)	SE	95 % CI	t	p
Odsječak	9.255	3.333	[2.481,16.03]	2.777	0.0089
FSH	-0.9587	0.4878	[-1.950, 0.03254]	1.966	0.0576
LH	0.6838	0.4963	[-0.3249, 1.692]	1.378	0.1773

Kriptorhizam	0.4885	0.3689	[-0.2613, 1.238]	1.324	0.1943
FA	-2.768	3.523	[-9.928, 4.391]	0.7858	0.4374
ADC	-2259	1846	[-6010, 1491]	1.224	0.2293
MTR	-10.42	6.023	[-22.66, 1.821]	1.73	0.0927
T2	0.01122	0.02978	[-0.04930, 0.07175]	0.3769	0.7086
Kolin	0.2632	0.07468	[0.1114, 0.4149]	3.524	0.0012
Kreatin	-0.1705	0.09241	[-0.3583, 0.01727]	1.845	0.0737
Glutamat	-0.0676	0.05028	[-0.1698, 0.03457]	1.345	0.1876
Laktat	0.01677	0.02299	[-0.02995, 0.06350]	0.7295	0.4707
Mio-inozitol	-0.04094	0.04018	[-0.1226, 0.04072]	1.019	0.3155

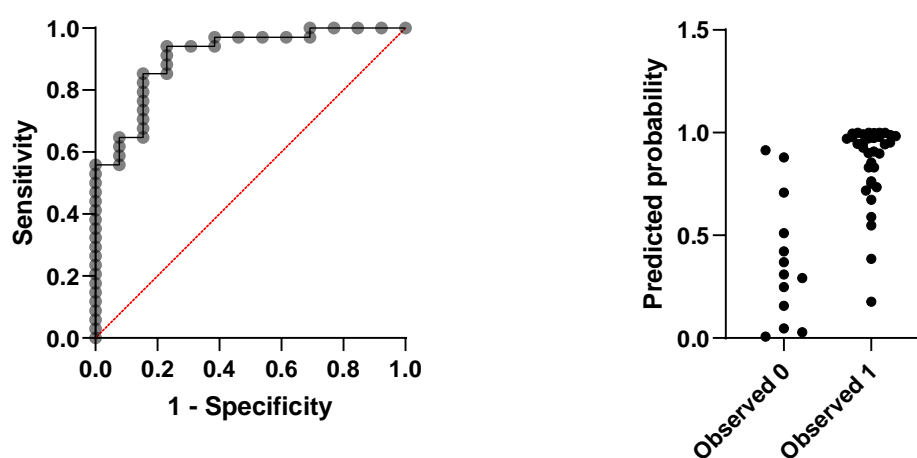


Slika 51. Prikaz stvarnih i predviđenih vrijednosti PRM1LOG dobivenih multivarijantnom linearnom regresijom. Linearna regresija bila je statistički značajna ($R^2=0.5230$, $F(12,34)=3.107$, $p=0.046$).

5.7.3. Prediktivni modeli za varijablu H

5.7.3.1. Potpuni prediktivni model

Koristeći spomenute neovisne varijable konstruirani su prediktivni modeli za varijablu H temeljenu na histološkoj procjeni udjela tubula sa spermijima i zrelim spermatidama. Kad je prediktivni model konstruiran koristeći sve nezavisne varijable vrijednost AUC u predikciji varijable H je bila 0.9095 (95 % CI: 0.8187-1.000; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 88.89 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 81.82 % (Slika 52, Tablica 10).



Slika 52. Prediktivnost potpunog prediktivnog modela koji koristi svih 12 nezavisnih varijabli (FSH, LH, Kriptorhizam, FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatina, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu H. Točnost predikcije varijable H ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 10. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije u predviđanju varijable H

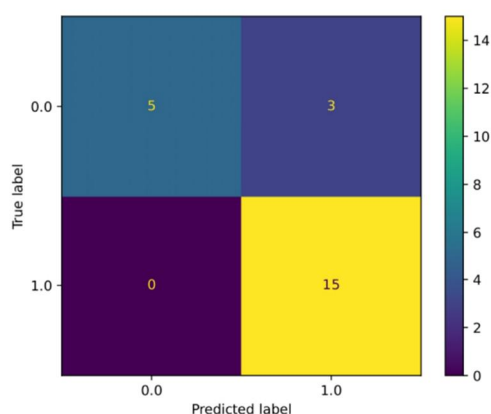
Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	38.68	18.48	2.094	0.0363	6.30E+16	[466.2, 2.117e+035]
FSH	-2.625	2.318	1.132	0.2576	0.07247	[0.0002512, 3.800]
LH	1.757	2.4	0.732	0.4642	5.795	[0.08586, 1680]

Kriptorhizam	5.11	2.391	2.137	0.0326	165.7	[3.013, 45409]
FA	9.501	17.46	0.5442	0.5863	13378	[1.443e-010, 6.421e+020]
ADC	-28819	12728	2.264	0.0236	0	[0.000, 0.000]
MTR	-80.73	36.93	2.186	0.0288	8.66E-36	[6.454e-073, 1.752e- 007]
T2	0.1096	0.1517	0.722	0.4703	1.116	[0.8379, 1.581]
Kolin	0.708	0.4371	1.62	0.1053	2.03	[0.9002, 5.387]
Kreatin	-1.121	0.4781	2.344	0.0191	0.3261	[0.101, 0.7304]
Glutamat	0.2245	0.2516	0.8923	0.3722	1.252	[0.7547, 2.138]
Laktat	-0.05227	0.1235	0.4231	0.6722	0.9491	[0.7343, 1.225]
Mio-inozitol	-0.3052	0.2364	1.291	0.1967	0.737	[0.440, 1.155]

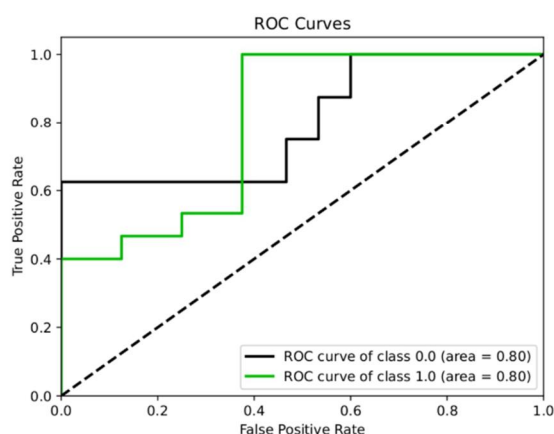
5.7.3.2. Prediktivni model strojnog učenja

Prediktivni model konstruiran je i koristeći strojno učenje, specifično umjetne neuronske mreže koje mogu modelirati nelinearne i složene odnose između varijabli. Od skupa podataka dio se koristi za učenje dok se manji dio koristi za ponovno predviđanje poznatih vrijednosti kako bi se testirala točnost modela. Vrijednost AUC u predikciji varijable H bila je 0.8125, dok je točnost predviđanja modela bila 0.8695 (Slika 53).

A



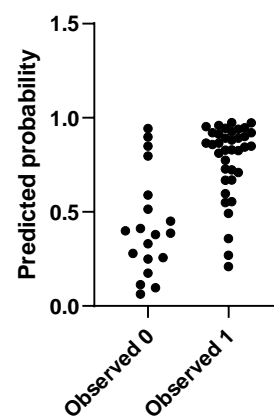
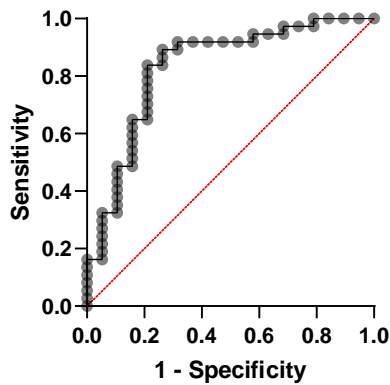
B



Slika 53. Prediktivnost modela za varijablu H konstruiranog koristeći umjetne neuronske mreže i svih 12 nezavisnih varijabli (FSH, LH, Kriptorhizam, FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatin, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) ocijenjena je i prikazana ROC krivuljom i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

5.7.3.3.Reducirani prediktivni modeli

Konstruiran je minimalni prediktivni model koji je sadržavao samo varijable s $AUC \geq 0.7$ (FSH, T2, ADC i FA) kako bi se ocijenila prediktivnost jednostavnije verzije modela. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable H je bila 0.8307 (95 % CI: 0.7083-0.9532; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 80.95 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 78.57 % (slika 54, Tablica 11).



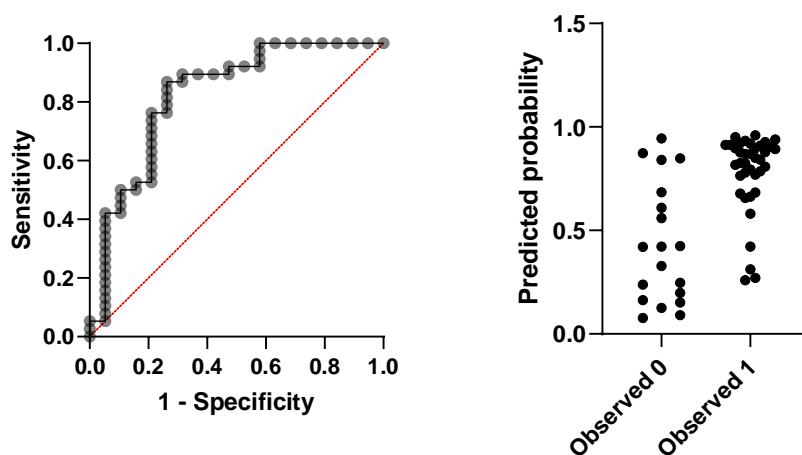
Slika 54. Prediktivnost minimalnog prediktivnog modela koji koristi samo nezavisne varijable s najvišom prediktivnom vrijednosti (FSH, FA, ADC, T2) ocijenjena je multivarijatom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu H. Točnost predikcije varijable H ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 11. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli s najvišom prediktivnom vrijednosti u predviđanju varijable H

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	9.237	6.451	1.432	0.1522	10266	[0.05978, 10748638116]
FSH	-1.575	0.7558	2.084	0.0371	0.2069	[0.04374, 0.8847]
FA	7.189	9.746	0.7376	0.4607	1325	[5.753e-006, 617119622551]
ADC	-3417	4200	0.8137	0.4158	0.000	[0.000, ∞]
T2	-0.07216	0.06761	1.067	0.2859	0.9304	[0.8077, 1.059]

Određivanje koncentracije metabolita u tkivu nije bilo moguće za određene uzorke (n=9) te bi moglo biti problematično i u kliničkoj primjeni. Snimanje MTI sekvenci također nije rutinski u kliničkom okruženju, kao ni određivanje FA. Stoga je konstruiran klinički

prediktivni model koji nije koristio koncentracije metabolita, MTR i FA kako bi se procijenila prediktivnost modela koji bi mogao biti najlakše uveden u kliničku primjenu. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable H je bila 0.8241 (95 % CI: 0.6979-0.9503; P<0.0001). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 82.93 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 75.00 % (Slika 55, Tablica 12).



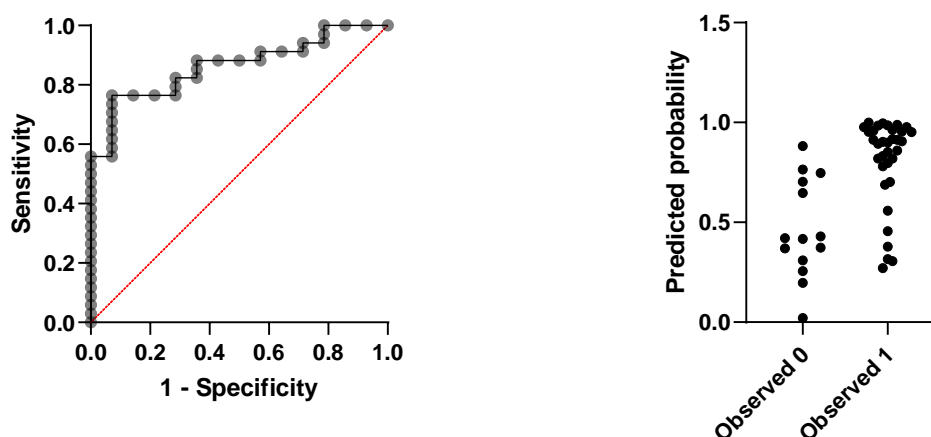
Slika 55. Prediktivnost kliničkog prediktivnog modela koji koristi rutinski dostupne nezavisne varijable (FSH, LH, kriptorhizam, ADC, T2) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu H. Točnost predikcije varijable H ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 12. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli (FSH, LH, kriptorhizam, ADC, T2) u predviđanju varijable H

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	10.47	4.715	2.221	0.0264	35279	[5.788, 868800220]
FSH	-2.747	1.273	2.157	0.0310	0.06415	[0.002713, 0.6079]
LH	1.072	1.271	0.8434	0.3990	2.922	[0.2973, 67.92]
Kriptorhizam	0.5269	0.9467	0.5565	0.5779	1.694	[0.2758, 12.09]

ADC	-2690	4213	0.6385	0.5231	0.000	[0.000, ∞]
T2	-0.07562	0.06512	1.161	0.2456	0.9272	[0.8090, 1.050]

Konstruiran je i tkivni prediktivni model koji je sadržavao samo varijable karakteristične za tkivo, bez podataka iz dijagnostičke obrade pacijenata. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable H je bila 0.8634 (95 % CI: 0.7613-0.9656; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 85.29 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 64.29 % (Slika 56, Tablica 13).



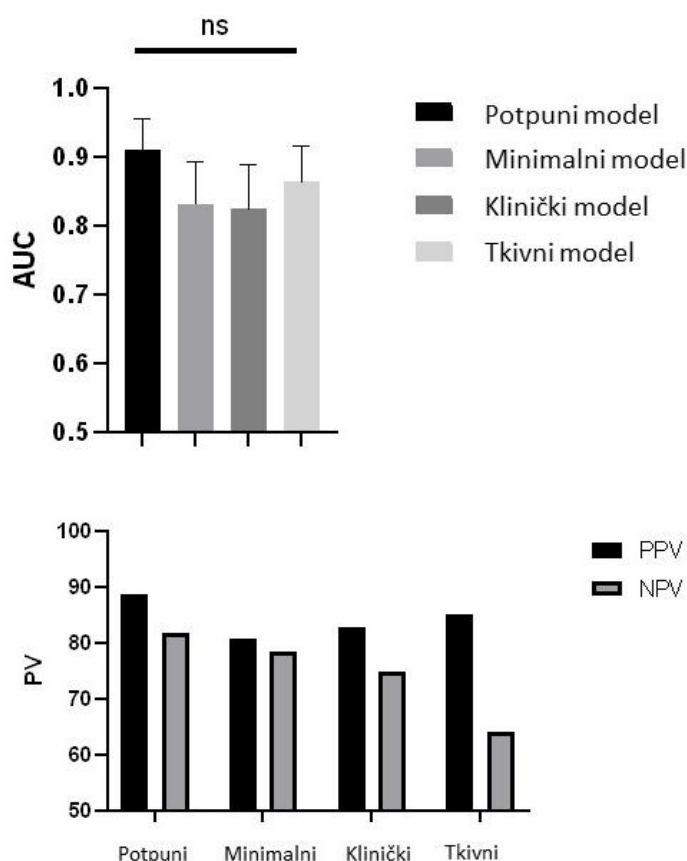
Slika 56. Prediktivnost tkivnog prediktivnog modela koji koristi samo nezavisne varijable karakteristične za tkivo (FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatin, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu H. Točnost predikcije varijable H ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 13. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli (FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatina, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) u predviđanju varijable H

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	24.42	13.15	1.856	0.0634	40174204651	[1.985, 1.937e+023]
FA	9.48	14.75	0.6426	0.5205	13090	[1.149e-008, 9.780e+017]
ADC	-9862	6071	1.624	0.1043	0	[0.000, ∞]
MTR	-33	21.46	1.537	0.1242	4.67E-15	[1.505e-035, 743.2]
T2	-0.09478	0.1042	0.9092	0.3632	0.9096	[0.7299, 1.110]
Kolin	0.3479	0.336	1.035	0.3005	1.416	[0.7497, 2.953]
Kreatin	-0.5492	0.3499	1.57	0.1165	0.5774	[0.2525, 1.075]
Glutamat	0.0737	0.1998	0.3688	0.7123	1.076	[0.7062, 1.601]
Laktat	-0.01429	0.09103	0.157	0.8753	0.9858	[0.8198, 1.186]
Mio-inozitol	-0.09791	0.1744	0.5615	0.5744	0.9067	[0.6345, 1.287]

5.7.3.4.Usporedba prediktivnih modela

Pri usporedbi AUC sva četiri prediktivna modela (128) nije uočena značajna razlika (Slika 57, Tablica 14).



Slika 57. Vrijednosti AUC sa standardnom pogreškom i prediktivne vrijednosti za predikciju varijable H dobivene multivarijatnom logističkom regresijom. Vrijednosti su prikazane stupčastim grafikonom. Statistički značajne razlike među skupinama, koristeći t-test: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

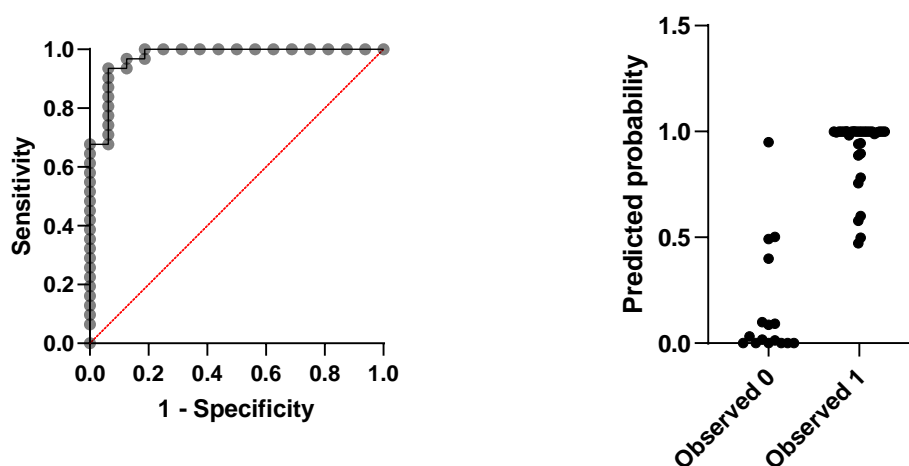
Tablica 14. Vrijednosti AUC, PPV i NPV konstruiranih prediktivnih modela

Modeli	AUC	PPV	NPV
Potpuni	0.9095	88.89 %	81.82 %
Minimalni	0.8307	80.95 %	78.57 %
Klinički	0.8241	82.93 %	75.00 %
Tkivni	0.8634	85.29 %	64.29 %

5.7.4. Prediktivni modeli za varijablu P

5.7.4.1. Potpuni prediktivni model

Koristeći spomenute neovisne varijable konstruirani su prediktivni modeli za varijablu P temeljenu na gustoći signala PRM1 u tkivu sjemenika. Prediktivni model je konstruiran i za varijablu P, no nije bilo moguće prilagoditi logističku krivulju koristeći sve nezavisne varijable. Model je bilo moguće konstruirati kad su se izostavile koncentracije glutamata i mio-inozitola. Vrijednost AUC u predikciji varijable P bila 0.9738 (95 % CI: 0.9308-1.000; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 91.18 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 100.00 % (Slika 58, Tablica 15).



Slika 58. Prediktivnost potpunog prediktivnog modela koji koristi maksimalan broj nezavisnih varijabli (FSH, LH, Kriptorhizam, FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatin i Laktat) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu P. Točnost predikcije varijable P ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

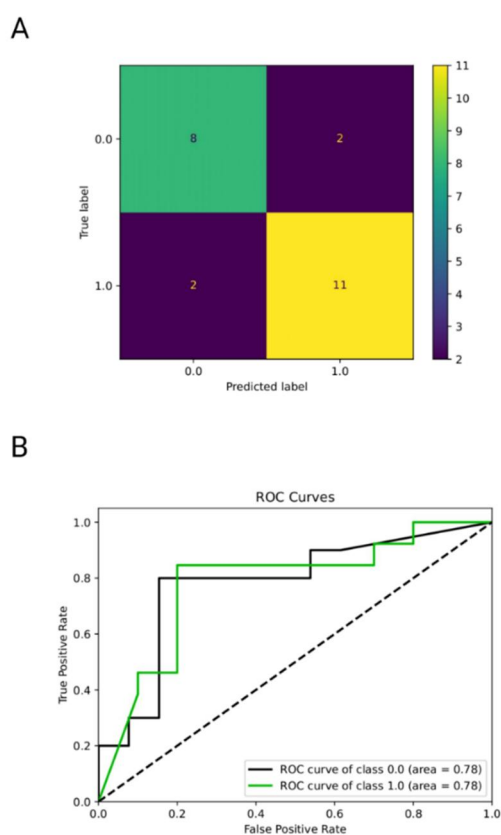
Tablica 15. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije u predviđanju varijable P

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	117.8	58.28	2.022	0.0432	1.52E+51	[1.291e+017, 3.477e+135]

FSH	-3.229	3.541	0.9119	0.3618	0.03962	[8.298e-006, 27.60]
LH	3.482	3.502	0.9943	0.3201	32.54	[0.07188, 495640]
Kriptorhizam	15.04	6.707	2.242	0.025	3392596	[180.9, 8.026e+014]
FA	57.43	35.96	1.597	0.1103	8.72E+24	[0.5347, 5.065e+069]
ADC	-71552	33456	2.139	0.0325	0	[0.000, 0.000]
MTR	-334.2	150.3	2.223	0.0262	6.90E-146	[0.000, 1.401e-057]
T2	0.1039	0.2308	0.4502	0.6526	1.109	[0.6880, 1.883]
Kolin	4.056	1.863	2.178	0.0294	57.76	[4.767, 22482]
Kreatin	-2.586	1.543	1.676	0.0938	0.07533	[0.0004358, 0.5085]
Laktat	-0.009578	0.1872	0.05117	0.9592	0.9905	[0.6268, 1.583]

5.7.4.2. Prediktivni model strojnog učenja

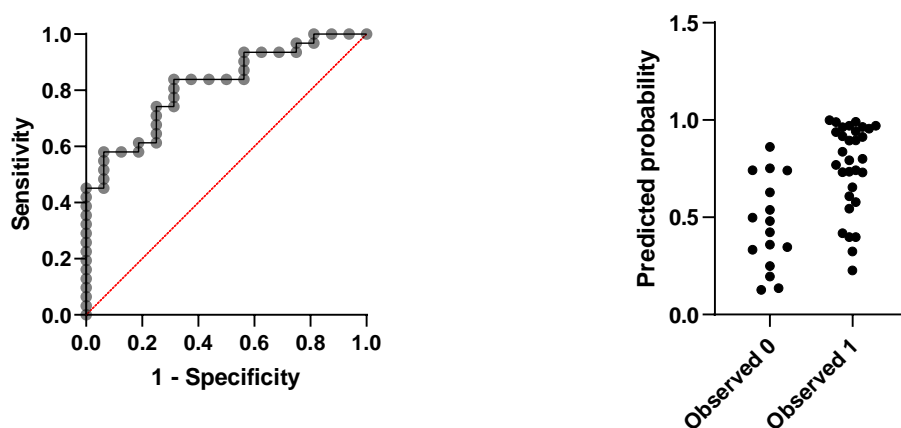
Prediktivni model konstruiran je i koristeći strojno učenje, specifično umjetne neuronske mreže koje mogu modelirati nelinearne i složene odnose između varijabli. Od skupa podataka dio se koristi za učenje dok se manji dio koristi za ponovno predviđanje poznatih vrijednosti kako bi se testirala točnost modela. Vrijednost AUC u predikciji varijable P bila je 0.82307, dok je točnost predviđanja modela bila 0.8261 (Slika 59).



Slika 59. Prediktivnost modela za varijablu P konstruiranog koristeći umjetne neuronske mreže i svih 12 nezavisnih varijabli (FSH, LH, Kriptorhizam, FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatin, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) ocijenjena je i prikazana ROC krivuljom i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

5.7.4.3.Reducirani prediktivni modeli

Konstruiran je i minimalni prediktivni model koji je sadržavao samo varijable s $AUC \geq 0.7$ (FSH, T2, ADC, FA, Cho) kako bi se ocijenila prediktivnost najjednostavnije verzije modela. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable H je bila 0.8185 (95 % CI: 0.6987-0.9384; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 81.25 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 66.67 % (Slika 60, Tablica 16).



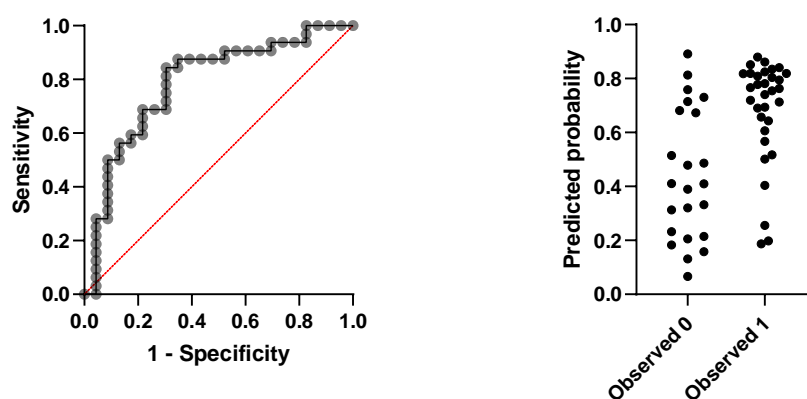
Slika 60. Prediktivnost minimalnog prediktivnog modela koji koristi samo nezavisne varijable s najvišom prediktivnom vrijednosti (FSH, FA, ADC, T2, kolin) ocijenjena je multivarijatom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu P. Točnost predikcije varijable P ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 16. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli s najvišom prediktivnom vrijednosti u predviđanju varijable P

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	-4.586	7.183	0.6384	0.5232	0.01020	[4.135e-009, 13615]
FSH	-0.6494	0.8324	0.7801	0.4353	0.5224	[0.09919, 2.731]
FA	14.01	11.22	1.249	0.2117	1213938	[0.0006419, 2.575e+016]

ADC	320.2	5122	0.06251	0.9502	1.118e+139	[0.000, ∞]
T2	-0.001632	0.08688	0.01878	0.9850	0.9984	[0.8389, 1.191]
Kolin	0.5555	0.2366	2.347	0.0189	1.743	[1.152, 2.971]

Konstruiran je i klinički prediktivni model koji nije sadržavao koncentracije metabolita, FA i MTR kako bi se ocijenila prediktivnost modela koji koristi parametre koji su u redovnoj kliničkoj upotrebi. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable P je bila 0.7867 (95 % CI: 0.6593-0.9141; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 77.78 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 78.95 % (Slika 61, Tablica 17).

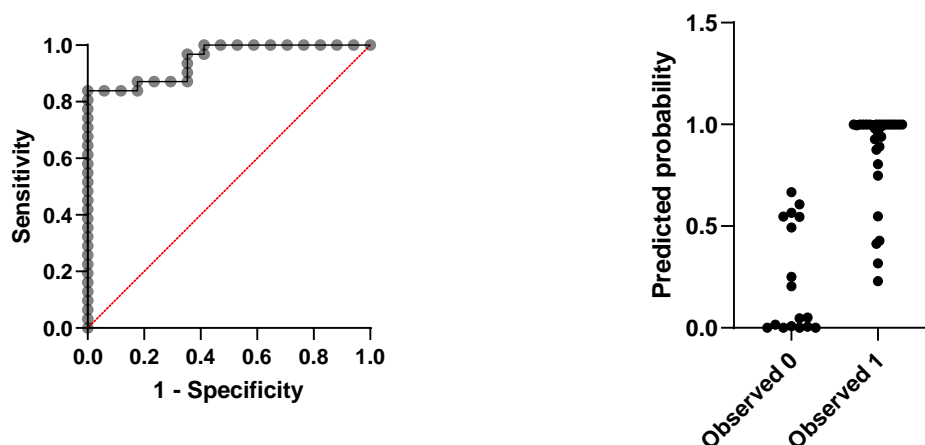


Slika 61. Prediktivnost kliničkog prediktivnog modela koji koristi rutinski dostupne nezavisne varijable (FSH, LH, kriptorhizam, ADC, T2) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu P. Točnost predikcije varijable P ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 17. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli (FSH, LH, kriptorhizam, ADC, T2) u predviđanju varijable P

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	7.771	4.421	1.758	0.0788	2371	[0.6164, 28348939]
FSH	-2.060	1.257	1.639	0.1013	0.1275	[0.005553, 1.188]
LH	0.9186	1.268	0.7244	0.4688	2.506	[0.2586, 58.08]
Kriptorhizam	-0.01225	0.9036	0.01355	0.9892	0.9878	[0.1647, 6.152]
ADC	-2508	4163	0.6026	0.5468	0.000	[0.000, ∞]
T2	-0.05267	0.05875	0.8965	0.3700	0.9487	[0.8403, 1.062]

Konstruiran je i tkivni prediktivni model koji je sadržavao samo varijable karakteristične za tkivo, bez podataka iz dijagnostičke obrade pacijenata. Vrijednost AUC tog modela u predikciji varijable P je bila 0.9469 (95 % CI: 0.8899-1.000; $P < 0.0001$). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 82.86 %, dok je negativna prediktivna vrijednost 84.62 % (Slika 62, Tablica 18).



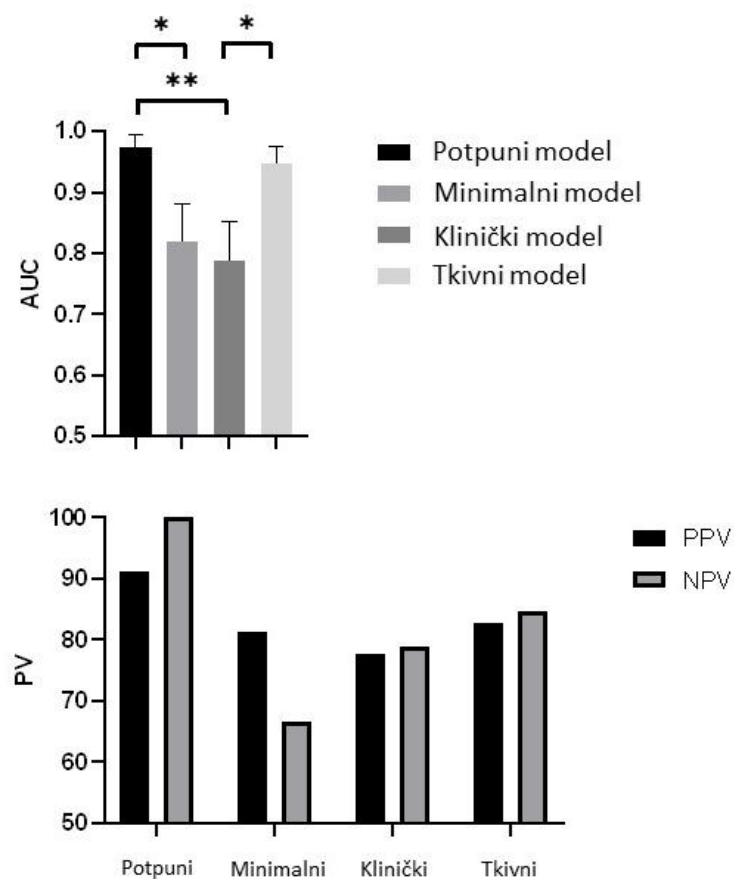
Slika 62. Prediktivnost tkivnog prediktivnog modela koji koristi samo nezavisne varijable karakteristične za tkivo (FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatin, Glutamat, Laktat i Mioinozitol) ocijenjena je multivarijatnom logističkom regresijom i prikazana ROC krivuljom koja ilustrira prediktivnost za varijablu P. Točnost predikcije varijable P ilustrirana je i dijagramom predviđenih i opserviranih vrijednosti.

Tablica 18. Prikaz rezultata multivarijatne logističke regresije nezavisnih varijabli (FA, ADC, MTR, T2, Kolin, Kreatina, Glutamat, Laktat i Mio-inozitol) u predviđanju varijable P

Varijable	Koeficijent (β)	SE	Z	p	Omjer izgleda	95 % CI
Odsječak	46.04	23.09	1.994	0.0461	9.91E+19	[5866, 1.807e+046]
FA	15.55	18.97	0.82	0.4122	5691398	[1.002e-009, 5.232e+025]
ADC	-12066	11106	1.086	0.2773	0	[0.000, ∞]
MTR	-150.6	67.32	2.236	0.0253	4.10E-66	[1.361e-149, 1.496e-024]
T2	-0.1034	0.1408	0.7343	0.4628	0.9017	[0.6690, 1.192]
Kolin	3.063	1.322	2.316	0.0206	21.39	[3.395, 905.8]
Kreatin	-0.2497	0.5752	0.4342	0.6642	0.779	[0.2318, 2.412]
Glutamat	-0.3935	0.596	0.6603	0.5091	0.6747	[0.1645, 2.004]
Laktat	0.1079	0.1395	0.7735	0.4393	1.114	[0.8596, 1.533]
Mio-inozitol	-0.7476	0.432	1.731	0.0835	0.4735	[0.1558, 0.9478]

5.7.4.4. Usporedba prediktivnih modela

Usporedbom AUC ova četiri prediktivna modela (128) pokazalo se da je model koji je koristio svih 12 nezavisnih varijabli bio značajno viši od AUC modela koji su koristili samo 5 najkorisnijih varijabli ($p=0.0168$) i od kliničkog modela ($p=0.0064$). AUC modela koji je koristio samo parametre karakteristične za tkivo bio je značajno viši od AUC kliničkog modela ($p=0.0245$). Pri usporedbi AUC ostalih modela nije uočena značajna razlika (Slika 63, Tablica 19).



Slika 63. Vrijednosti AUC sa standardnom pogreškom i prediktivne vrijednosti za predikciju varijable P dobivene multivarijatnom logističkom regresijom. Vrijednosti su prikazane stupčastim grafikonom.

Tablica 19. Vrijednosti AUC, PPV i NPV konstruiranih prediktivnih modela

Modeli	AUC	PPV	NPV
Potpuni	0.9738	91.18 %	100.00 %
Minimalni	0.8185	81.25 %	66.67 %
Klinički	0.7867	77.78 %	78.95 %
Tkivni	0.9469	82.86 %	84.62 %

6. RASPRAVA

6.1. Karakterizacija uzoraka histološkom i imunohistokemijskom analizom

Histološkom analizom uzorcima sjemenika se dodjeljuje jedna od 4 dijagnoze (SCOS, MA, HYPO, MIXA). Najveći udio uzoraka (48.28 %) ima dijagnozu mješovite atrofije sjemenskih kanalića što znači da imaju obilježja više dijagnoza unutar uzorka. Radi boljeg razlikovanja uzoraka ta je skupina podijeljena u dvije podskupine ovisno o najvišem JS u uzorku kako bi se razlikovali uzorci koji sadržavaju tubule sa zrelim spermatidama (MIXA-8) od onih koji sadržavaju tubule sa spermijima (MIXA-10). Spermiji su bili prisutni u skupini HYPO i MIXA-10 dok su zrele spermatide, uz te skupine, bile prisutne i u skupinama MA i MIXA-8. Određivanje srednjeg JS uzoraka kao i udjela tubula sa spermijima i zrelim spermatidama pokazalo je da unutar uzoraka s dijagnozom mješovite atrofije ima dosta varijabilnosti.

Na temelju udjela tubula sa spermijima i zrelim spermatidama uzorci su podijeljeni u one s dobrim i smanjenim izgledima za uspješnu ekstrakciju spermija te one koji su neprikladni za ekstrakciju spermija. Približno trećina pacijenata se nakon histološke analize isključuje iz daljnjeg postupanja zbog nepovoljne histološke dijagnoze. Skupina uzoraka za koje je procijenjeno da imaju smanjene izgleda za uspješnu ekstrakciju spermija sastojala se od uzoraka koji imaju manje od 80 % tubula sa spermijima, a sadrže zrele spermatide. U ovoj skupini završi trećina uzoraka i ta skupina je dosta heterogena po udjelu tubula sa spermijima i zrelim spermatidama i zapravo ukazuje na razlog zašto je predikcija uspješne ekstrakcije spermija kompleksna. Potrebno je razdvojiti tu skupinu od skupine koja je neprikladna za TESE iako može postojati samo nekoliko tubula sa zrelim spermatidama. Takve suptilne razlike je teško uočiti na parametrima kao što su koncentracije raznih molekula u ejakulatu ili krvi te na temelju podataka dobivenih iz anamneze ili statusa pacijenata.

Histološkom analizom se nedvojbeno najtočnije može ocijeniti prisutnost spermija i zrelih spermatida i prediktivna je za uspješnost ekstrakcije spermija, no ona se ne može raditi na cijelom tkivu već se radi na uzorcima koji ne moraju predstavljati histološku sliku cijelog tkiva (71). Snimanje magnetskom rezonancijom bi moglo omogućiti neinvazivni prikaz cijelog tkiva sjemenika te bi se potencijalno mogli i razlučiti dijelovi sjemenika s različitim

histološkim slikama te tako uputiti kirurga na lokuse spermatogeneze. Nakon histološke analize tkivo trećine pacijenata se procjenjuje neprikladnim za ekstrakciju spermija te bi prediktivni model koji s dovoljnom točnošću predviđa histološku prikladnost tkiva za ekstrakciju spermija (varijabla H) poštedito te pacijente procesa biopsije sjemenika.

Imunohistokemijska analiza intenziteta signala PRM1 u tkivu napravljena je kako bi se kvantificirala količina spermija i zrelih spermatida u tkivu točnije nego preko udjela tubula koji sadrže zrele spermatide i spermije. Protamini su proteini koji se sintetiziraju u zrelim spermatidama i kondenziraju DNK kako bi zaštitili genetski materijal od genotoksične aktivnosti te kako bi se taj neoštećeni genetski materijal mogao dostaviti embriju (123,124). Kod sisavaca se nalaze dvije vrste protamina (PRM1 i PRM2). Dok je PRM1 dovoljan za potpunu kondenzaciju kromatina sperme u većine vrsta, čini se da je PRM2 ključan u pojačavanju kondenzacije PRM1 u nekih vrsta uključujući ljude (124). Gustoća PRM1 signala izmjerena u ovoj studiji snažno je korelirana sa srednjim JS i udjelom tubula sa spermijima i zrelim spermatidama (Slika 15) što je u skladu sa očekivanjima, a ukazuje i na relativnu pouzdanost određivanja gustoće PRM1 signala u kvantifikaciji količine spermija i zrelih spermatida u tkivu. Više varijabilnosti je primijećeno unutar skupine HYPO u vrijednosti gustoće signala PRM1 nego u udjelu tubula sa spermijima i zrelim spermatidama što ukazuje na važnost dodatnih informacija koje se dobivaju kvantifikacijom signala PRM1. Na temelju prisutnosti PRM1 signala u tkivu određene su skupine P0 i P1. Skupina P0 sadržavala je 43 % uzoraka što je više nego skupina H0, gdje je prisutnost spermija određivana samo histološkom analizom. Kod dijela uzoraka (n=2) je PRM1 signal otkrio zrele spermatide koje nisu uočene histološki, a kod dijela uzoraka (n=6), kod kojih je histološkom analizom uočen niski postotak tubula s većinom zrelih spermatidama, nije primijećen signal PRM1. PRM1 bi, dakle, kao marker zrelosti spermatida i spermija mogao biti koristan dodatak histološkoj procjeni prikladnosti tkiva sjemenika za ekstrakciju spermija. Mogući razlozi za primijećene razlike su i nedostaci histološke procjene, ali također, i varijabilna kvaliteta uzoraka i limitacije same metode imunofluorescencije. Ekspresija PRM1 je već povezana s prisutnošću spermija u tkivu, no potrebno je u daljnjim studijama istražiti povezanost prisutnosti PRM1 signala u tkivu s uspješnom ekstrakcijom spermija iz tkiva sjemenika (129). Prediktivni model koji s dovoljnom točnošću predviđa prisutnost PRM1 signala, odnosno spermija i zrelih spermatida u tkivu (varijabla P) poštedito bi više od 40 % pacijenata invazivnog postupka biopsije sjemenika, a potencijalno i otkrio pacijente kod kojih bi ekstrakcija spermija mogla biti uspješna, a koji ne bi bili prepoznati klasičnom histološkom analizom.

Za razliku od prethodnih studija gdje je rađena predikcija ekstrakcije spermija iz tkiva u ovoj studiji su konstruirani prediktivni modeli za histološku sliku odnosno prisutnost spermija u tkivu. Dakle, ne predviđa se konačni klinički ishod, već rezultat trenutno najbolje metode predikcije. Klinički ishod nije bilo moguće uključiti kao zavisnu varijablu budući da iz uzoraka koji su snimani magnetskom rezonancijom nije pokušana ekstrakcija spermija, a od ostalih uzoraka iz istog sjemenika ekstrakcija spermija nije pokušana kod svih već samo kod dijela uzoraka za koje je procijenjeno da imaju izgleda za uspješnu ekstrakciju. Bilo bi korisno proširiti istraživanje i pokušati ekstrakciju spermija na uzorcima koji su snimljeni magnetskom rezonancijom, no budući da snimanje traje nekoliko sati pri čemu je uzorak u fiziološkoj otopini, uvjeti ne bi bili isti kao pri regularnoj ekstrakciji spermija. Također, istraživanje je rađeno na *ex vivo* uzorcima gdje se cijeli uzorak mogao detaljno histološki analizirati. Tako je bilo moguće istražiti mogu li se otkriti suptilne promjene u tkivu, no model je potrebno validirati na *in vivo* snimkama sjemenika za kliničku primjenu.

6.2. Nezavisne varijable

6.2.1. Parametri dobiveni dijagnostičkom obradom pacijenata

Od podataka iz regularne dijagnostičke obrade neplodnog pacijenta određen je udio uzoraka od pacijenata s povišenim FSH i LH te povijesti kriptorhizma te je uspoređen između pacijenata s uzorcima u skupinama H0 i H1 te P0 i P1. 74 % uzoraka u grupi H0 te 65 % uzoraka u grupi P0 potjecalo je od pacijenata s povišenim FSH što je 3.4 puta više nego u uzoraka iz grupe H1 te 3 puta više nego u uzoraka iz skupine P1. 53 % uzoraka u skupini H0 te 43 % uzoraka u skupini P0 potjecalo je od pacijenata s povišenim LH što je 2.8 puta više nego u uzoraka iz skupine H1 te 1.9 puta više nego u uzoraka iz skupine P1. Proizvodnja spermija ovisna je o djelovanju FSH i LH u sjemeniku. Djelovanje LH odvija se preko stimulacije Leydigovih stanica na proizvodnju testosterona, a budući da spolne stanice nemaju receptore za FSH i androgene, oni svoj utjecaj na spermatogenezu ostvaruju preko Sertolijevih stanica (34,35). Sertolijeve stanice potaknute kompleksnom interakcijom spolnih stanica i FSH izlučuju inhibin B koji negativnom povratnom spregom inhibira lučenje FSH što objašnjava značajno veći udio pacijenata s povišenim FSH u skupini uzoraka bez spermija (36,37). Negativna povratna sprega preko testosterona zaslužna je i za regulaciju razine LH te objašnjava značajno veći udio pacijenata s povišenim LH u skupini uzoraka s lošijom

histološkom slikom (38). Budući da je utjecaj LH na spermatogenezu, za razliku od FSH, indirektan, nije iznenađujuće da je njegova razina manje indikativna za status spermatogeneze u sjemeniku. Također je potrebno napomenuti da koncentracije FSH i LH izmjerene u krvi odražavaju spermatogenezu i proizvodnju testosterona u cijelom sjemeniku, a ne samo u uzorku koji je sniman magnetskom rezonancijom što isto može utjecati na dobivene rezultate.

Nije uočena razlika u udjelu pacijenata s anamnezom pozitivnom na kriptorhizam među skupinama uzoraka H0 i H1 te P0 i P1. Povijest kriptorhizma se također odnosi na cijeli sjemenik, a ne samo na uzorak koji je sniman magnetskom rezonancijom što može utjecati na opservirani odnos između tih varijabli. Od 10 uzoraka iz sjemenika koji su bili retinirani, 7 ih je kirurški spuštено u djetinjstvu dok su 3 od pacijenata koji su dijagnosticirani u odrasloj dobi. Niti u jednom uzorku sjemenika pacijenata koji su dijagnosticirani u odrasloj dobi nisu nađeni spermiji i zrele spermatide što je u skladu s progresivnom degeneracijom spolnih stanica opisanoj u literaturi (15). Od uzoraka pacijenata koji su operirani u djetinjstvu u 57 % uzoraka (n=4) nađeni su spermiji i zrele spermatide, a 71 % uzorka je histološkom analizom ocijenjeno prikladnim za ekstrakciju spermija. To je u skladu s rezultatima primijećenim na ukupnim pacijentima u ovoj studiji i u skladu je s uvriježenim mišljenjem da je rana operacija važna za očuvanje plodnosti pacijenata s kriptorhizmom.

6.2.2. Parametri dobiveni MRI snimanjem

T2 relaksacijska krivulja je aproksimirana standardnim monoeksponencijalnim modelom, te vlastitim prilagođenim bieksponecijalnim modelom. T2 vrijednost tkiva određena bieksponecijalnim modelom je bila značajno niža od vrijednosti određenih monoeksponencijalnim modelom što je očekivano, budući da bieksponecijalni model razdvaja T2 vrijednost tkiva (oko 60 ms) od T2 vrijednosti vode (oko 200 ms) kako količina vode u tkivu ne bi maskirala razlike uzrokovane različitom količinom spermija i zrelih spermatida. Primijećena je viša vrijednost T2 u uzorcima iz skupina H0 i P0 u usporedbi s skupinama H1 i P1, što ukazuje na i dalje višu količinu vode u tkivu. Ovo opažanje je u skladu s činjenicom da se u takvom tkivu nalazi manje stanica (Slika 21).

Bieksponecijalnim modelom određen je i udio tkiva u svakom vokselu te udio ukupne površine presjeka tkiva koji sadržava voksele s barem 50 % tkiva. Taj udio je bio značajno veći kod uzoraka iz skupina H1 i P1 u usporedbi s uzorcima iz skupina H0 i P0 što ukazuje na veću rahlost tkiva bez histološki opserviranih spermija. Analogno određivanju T2, uzorcima je

određen i volumen, a određivanje volumena bieksponencijalnim modelom je bilo točnije nego monoeksponencijalnim modelom. Uzorci lošije histološke slike te uzorci bez spermija i zrelih spermatida imali su značajno manji volumen. Ovo je u skladu s podacima o manjem volumenu sjemenika muškaraca s dijagnozom NOA (u usporedbi s kontrolama) što ograničava veličinu uzoraka koji se mogu uzeti iz sjemenika kako bi se rizik od posljedičnog hipogonadizma sveo na minimum (75). Manji volumen uzoraka (a samim time i stanica i izvanstaničnog matriksa) utječe na smanjenje kompaktnosti, a kako bi se umanjio utjecaj tog efekta na konačni prediktivni model koji bi u konačnosti trebao biti primjenjiv i na *in vivo* snimljene sjemenike korištene su vrijednosti T2 i volumena dobivene bieksponencijalnim modelom.

Vrijednost prividnog koeficijenta difuzije (ADC) koja odražava razinu difuzije u tkivu pokazala se većom u uzorcima s lošijom histološkom slikom i uzrocima bez spermija što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (75,101–103). Frakcionalna anizotropija (FA) koja mjeri usmjerenost difuzije slobodnih molekula vode u tkivu pokazala se značajno višom u uzorcima u skupinama H1 i P1 (Slika 25), što je pak u suprotnosti s rezultatom jedine studije koja je to pitanje do sad istražila (102). U toj studiji je nađen povišen FA u pacijenata s NOA u usporedbi s kontrolama te se to objasnilo prirodom histoloških promjena koje povećavaju usmjerenost difuzije u takvom tkivu kao što je sužavanje tubula (102). Moguće objašnjenje uočene razlike u rezultatima je da su kod uzoraka u skupinama H0 i P0 u ovoj studiji prevladale histološke promjene koje dovode do smanjenja usmjerenosti difuzije kao što je smanjenje broja stanica u uzorcima. Druga mogućnost je da je razlika posljedica snimanja uzoraka *ex vivo* za razliku od *in vivo* kao u spomenutoj studiji. Prethodno opisana razlika u rahlosti *ex vivo* uzoraka između grupa H0 i H1 te P0 i P1, osim što značajno povećava difuznost u tkivu (povećani ADC), istovremeno i smanjuje frakcijsku anizotropiju difuzije budući da slobodne molekule vode teoretski imaju $FA = 0$. Ovaj učinak je izraženiji u skupinama H0 i P0 u odnosu na H1 i P1 zbog veće rahlosti uzorka, odnosno višeg udjela vode u snimljenim vokselima.

Kako bi se ispitaio utjecaj razlike u rahlosti uzoraka određeni su ROI-evi koji sadržavaju samo voksele s više od 50 % tkiva te su određeni ADC i FA. Primijećeno je da je razlika između skupina H0 i H1 te P0 i P1 veća kad se ADC određuje na cijelom uzorku, dok za vrijednost FA nije primijećena razlika. Nameće se zaključak kako umjetno povećanje ukupne razine difuznosti mjerene parametrom ADC zbog veće rahlosti *ex vivo* uzoraka dodatno naglašava razliku između skupina s i bez spermija zbog veće rahlosti uzoraka bez spermija. Iz tog su razloga u izloženim analizama mjerenja korištene vrijednosti ADC i FA očitane na vokselima koji sadrže više od 50 % tkiva prema bieksponencijalnom modelu rekonstrukcije T2 krivulje.

Također se može zapaziti da rahlost uzoraka nema značajan utjecaj na usmjerenost difuzije jer su izmjerene vrijednosti za sve uzorke niske, blizu granice pouzdanosti mjerenja.

Omjer prijenosa magnetizacije (MTR) nije bio značajno različit među skupinama H0 i H1 te P0 i P1 i to se nije promijenilo ni kad je određen samo na vokselima koji sadržavaju više od 50 % tkiva (Slika 26). No, primijećeno je da je vrijednost MTR značajno viša kad se određuje samo na vokselima s više od 50 % tkiva. Taj rezultat je u skladu s činjenicom da vrijednost MTR odražava koncentraciju makromolekula u vokselu koja opada proporcionalno rastu relativnog udjela tekućine u istom. Izostanak značajnosti u izmjerenim rezultatima nadovezuje se na prijašnje studije, koje su pokazale oprečne rezultate u pogledu parametra MTR: izmjerena vrijednost MTR bila je, ovisno o studiji, i viša i niža u tkivu s manje spermija (75,101). Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se ispitala veza i odnos MTR s količinom spermija u tkivu.

6.2.3. Parametri dobiveni MR spektroskopijom

Kako bi se procijenila usklađenost koncentracija metabolita određenih u ovoj studiji one su uspoređene s koncentracijama određenim u jedinoj studiji koja je također koristila *ex vivo* uzorke sjemenika (114). Budući da su u toj studiji uspoređivane koncentracije metabolita između histoloških dijagnostičkih skupina korišteni su rezultati za uzorke s dijagnozom hipospermatogeneze. Koncentracije kolina, kreatina, glutamata i laktata određene na uzorcima s dijagnozom hipospermatogeneze u ovoj studiji su bile usporedive, no značajno više od koncentracija određenih u studiji Aaronsona i sur. (114), dok za koncentraciju mio-inozitola nije uočena značajna razlika. Razlike u određenim koncentracijama metabolita za kolin, kreatin, glutamat i lakat mogu biti uzrokovane razlikama u metodologiji studije. Naime, u studiji Aaronsona i sur. korištena je spektroskopija vrtnje po magičnom kutu (MAS) visoke rezolucije te uređaj magnetskog polja jakosti 11.7 T što može poboljšati razdvajanje spektara pojedinih metabolita. Studija je također rađena na manjem broju uzoraka te bi za određivanje referentne koncentracije metabolita u uzorcima tkiva sjemenika bilo potrebno proširiti istraživanje.

Koncentracije kolina, kreatina, glutamata, mio-inozitola i laktata u tkivu nisu bile značajno različite između skupina H0 i H1, a između skupina P0 i P1 uočena je razlika samo u koncentraciji kolina i laktata koje su bile više u skupini s detektiranim spermijima (Slika 30). U prethodnim studijama uočene su više koncentracije kolina, kreatina i mio-inozitola u tkivu

muškaraca s više spermija, dok je viša razina glutamata bila povezana s neuspješnom ekstrakcijom spermija iz sjemenika (112–119)

Budući da su kolin i fosfokolin prekursori fosfolipida, specifično fosfatidilkolina i sfingomijelina, koji su dijelovi stanične membrane i membrane organela (107), viša koncentracija kolina bi se, dakle, očekivala u uzorcima u kojima ima više stanica, odnosno spermija te je viša koncentracija kolina u uzorcima iz skupine P1 u skladu s tim. Nije primijećena viša koncentracija kolina u skupini H1, što zajedno s rezultatom statistički značajne umjerene korelacije koncentracije kolina s gustoćom signala PRM1 u tkivu, govori u prilog indikativnosti koncentracije kolina za količinu spermija u tkivu.

Kreatin i fosfokreatin su prekursori u sintezi ATP-a (108) te bi se viša koncentracija kreatina očekivala u tkivu s aktivnijom spermatogenezom, no ta razlika nije bila značajna u ovoj studiji.

Laktat je glavni izvor energije za spolne stanice, koje ga dobivaju od Sertolijevih stanica gdje se proizvodi primarno iz glukoze (130,131). Veća koncentracija laktata koja je primijećena u ovoj studiji kod uzoraka iz skupine P1 u usporedbi s P0 ukazuje na to da Sertolijeve stanice održavaju veću koncentraciju laktata u izvanstaničnoj tekućini kad je u tubulima prisutno više spolnih stanica. U prethodnim studijama pokazano je da laktat inhibira apoptozu spolnih stanica što bi moglo ukazivati i na to da je viša koncentracija laktata zapravo uzrok veće količine spermija u tkivu, a ne samo posljedica (132).

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmitor (110), a njegov utjecaj na funkciju sjemenika je i dalje nejasan. U prethodnim studijama nađena je poveznica između više koncentracije glutamata i neuspješne ekstrakcije spermija što je povezano s mogućnošću da Sertolijeve stanice za proizvodnju laktata koriste glutamat te se tako smanjuje njegova koncentracija u tkivu (112). U ovoj studiji nije primijećena viša koncentracija glutamata u uzorcima bez spermija. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se rasvijetlila funkcija glutamata u sjemeniku.

Mio-inozitol služi kao drugi glasnik više receptora, kao što su receptori za FSH i inzulin, a u visokoj koncentraciji nalazi se u tubulima u sjemeniku. Važan je osmoregulator u sjemenskim kanalčićima, dio je fosfolipidne membrane i djeluje kao antioksidans (109). Prethodno opservirana niža koncentracija mio-inozitola u sjemenicima muškaraca s dijagnozom NOA povezana je s manjom količinom spolnih stanica.

Moguće obrazloženje nedostatka razlike u koncentracijama kreatina, glutamata i mio-inozitola među uzorcima s i bez spermija u ovoj studiji je i limitacija same metode određivanja

koncentracije metabolita iz spektara. Naime, radi se o manjim, *ex vivo* uzorcima sa značajnim postotkom vode u mjerenom volumenu, što smanjuje apsolutnu količinu svih metabolita, odnosno dostupni signal za MR spektroskopiju.

6.3. Utjecaj krioprezervacije na parametre

Utjecaj krioprezervacije na parametre i koncentracije metabolita dobivene snimanjem magnetskom rezonancijom prvi put je istražen u ovoj studiji. Uočeno je da nema razlike u T2 između krioprezerviranih i svježih uzoraka, ali i da su ADC i FA niži u krioprezerviranih uzoraka, dok je MTR viši (Slika 31). Krioprezervacija nije utjecala na razlike među skupinama u vrijednostima FA i MTR, dok je među vrijednostima ADC primijećena razlika između skupina H0 i H1, ali ne i između skupina P0 i P1. Kad se usporedila vrijednost navedenih parametara između skupina H0 i H1 te P0 i P1 primijećeno je da nije bilo značajne razlike u vrijednosti T2, dok je ta razlika postojala kod svježih uzoraka.

Ti rezultati upućuju na to da su razina i usmjerenost difuzije niži u krioprezerviranim uzorcima, a da je koncentracija makromolekula viša te da se izgubila razlika u količini vode među skupinama s i bez spermija i zrelih spermatida reflektirana u vrijednosti T2. Budući da nije primijećena razlika u volumenu i rahlosti polovice uzoraka koja je snimana svježja i polovice koja je krioprezervirana, veća kompaktnost i smanjeni volumen uzoraka nakon krioprezervacije nisu faktori koji utječu na primijećene razlike. Krioprezervacijom dolazi do oštećivanja tkiva zbog stvaranja ledenih kristala i dehidracije stanica (61). Promjene u morfologiji tkiva do kojih dolazi mogu biti faktor koji utječe na uočene razlike, ali daljnja istraživanja su potrebna kako bi se odredila etiologija uočenih promjena (64).

Koncentracija svih mjerenih metabolita, osim kolina, bila je značajno manja u KP u usporedbi sa svježim uzorcima. Nije primijećena razlika u koncentraciji metabolita između skupina H0 i H1 te P0 i P1. Razlika između H0 i H1 nije primijećena ni kod svježih uzoraka, ali koncentracije kolina i laktata koje su bile značajno više u skupini P1 nisu bile značajno različite u krioprezerviranim uzorcima. Budući da je iz spektra prije određivanja koncentracija morao biti uklonjen spektar glicerola na kojem je baziran medij za krioprezervaciju, moguće je da je to utjecalo na točnost određivanja koncentracija metabolita. No, primijećena niža koncentracija metabolita i gubitak značajne razlike koja je zamijećena u svježem tkivu može biti i posljedica promjene u sastavu tkiva uzrokovane krioprezervacijom. Primijećene su razlike u proteomu i sastavu ejakulata te u razini oksidativnog stresa u tkivu sjemenika uzrokovane

krioprezervacijom. To ukazuje na mogući utjecaj krioprezervacije na metabolički sastav tkiva (66,67)(69), no daljnja istraživanja su potrebna kako bi se dodatno rasvijetlio utjecaj krioprezervacije na tkivo i njegov značaj za klinički ishod.

6.4. Prediktivnost nezavisnih varijabli

Ocijenjena je samostalna prediktivnost 12 nezavisnih varijabli za varijable H i P. Prediktivnost se opisuje parametrom AUC koja označava površinu ispod ROC krivulje. Uobičajeno se vrijednosti AUC veće od 0.7 smatraju prihvatljivima (127). Osim AUC, promatraju se negativne i pozitivne prediktivne vrijednosti koje opisuju točnost modela u predviđanju definiranog negativnog i pozitivnog ishoda. U kontekstu provedenog istraživanja, NPV je značajniji od PPV budući da se predviđa negativni ishod biopsije i želi biti što sigurniji da pacijenti koji se ne upućuju na biopsiju uistinu nemaju spermije i zrele spermatide u tkivu.

Navedenu vrijednost AUC u predikciji varijable H i P imali su T2, ADC, FA i FSH (Tablica 7,8). U predikciji varijable P vrijednost AUC veću od 0.7 dodatno je imao i kolin (Tablica 8). Vrijednosti AUC za prediktivnost povijesti kriptorhizma i MTR bile su manje od 0.6 što ukazuje na njihov slabi utjecaj na prediktivnost modela. Najnižu NPV u predikciji varijable H imao je FA (54,55 %) dok je najvišu vrijednost imao T2 (71.43 %). Najnižu NPV u predikciji varijable P imao je kolin (56.25 %) dok je najvišu vrijednost imao T2 (70 %).

Ocijenila se i korelacija nezavisnih varijabli s gustoćom signala PRM1, odnosno količinom spermija i zrelih spermatida u tkivu te se pokazalo da najveću korelaciju s količinom spermija imaju FSH i koncentracija kolina (Slika 49). Budući da razina FSH raste kao reakcija na slabiju spermatogenezu, a da je koncentracija kolina indikativna za količinu stanica u tkivu, rezultati su u skladu s literaturom te ukazuju na mogući razlog manje prediktivne vrijednosti kolina u predikciji varijable H. Multivarijatna linearna regresija pokazala je da je model koji koristi svih 12 nezavisnih varijabli prediktivan za gustoću signala PRM1 što znači da ima potencijala i za preciznije određivanje količine spermija i zrelih spermatida u tkivu.

6.5. Usporedba prediktivnih modela

Za obje zavisne varijable konstruirana su 4 prediktivna modela, jedan gdje je korišteno svih 12 nezavisnih varijabli, jedan gdje su korištene samo varijable koje su samostalno imale $AUC \geq 0.7$, jedan u kojem su korišteni samo parametri u redovitoj kliničkoj upotrebi te jedan

u kojem su korišteni samo parametri karakteristični za tkivo, odnosno nisu korišteni podaci iz redovite dijagnostičke obrade (FSH, LH, povijest kriptorhizma).

U predviđanju varijable H nije bilo značajne razlike između AUC prediktivnih modela temeljenih na logističkoj regresiji, no NPV je bio najniži u modelu koji nije uključivao podatke iz dijagnostičke obrade pacijenata. U predikciji histološke prisutnosti spermija i zrelih spermatida bi se mogao koristiti najjednostavniji oblik modela koji sadrži samo FSH, T2, ADC i FA. U kliničkoj primjeni upotreba modela koji koristi maksimalna broj varijabli poštjednija bi 23.4 % pacijenata rizika biopsije sjemenika, a od njih bi 18.18 % histološkom analizom dobilo procjenu da imaju smanjene izgleda za uspješnu ekstrakciju spermija, dok bi ostali bili procijenjeni neprikladnima za ekstrakciju spermija. Kad bi se upotrijebio model koji koristi minimalan broj varijabli, 25 % pacijenata bi se poštjednulo rizika biopsije sjemenika, a od njih bi 21.43 % histološkom analizom dobilo procjenu da imaju smanjene izgleda za uspješnu ekstrakciju spermija, dok bi ostali bili procijenjeni neprikladnima za ekstrakciju spermija. Budući da nema značajne razlike u prediktivnosti modela opravdano je koristiti jednostavniju verziju modela koja uključuje samo FSH, koji se redovito određuje svim pacijentima, te parametre koji se mogu dobiti snimanjem T2 i DTI sekvenci.

U predviđanju varijable P nije bilo značajne razlike između AUC prediktivnog modela koji je koristio maksimalan broj nezavisnih varijabli i onog koji je koristio samo parametre karakteristične za tkivo. AUC prediktivnog modela koji je koristio maksimalan broj nezavisnih varijabli bio je značajno viši od modela koji je koristio samo varijable sa samostalnim AUC ≥ 0.7 te od kliničkog modela. U kliničkoj primjeni upotreba modela koji koristi maksimalan broj varijabli poštjednija bi 27.67 % pacijenata rizika biopsije sjemenika te bi svi bili negativni na signal PRM1, odnosno ne bi imali spermija i zrelih spermatida u sjemeniku. Primjena modela koji je koristio samo parametre karakteristične za tkivo poštjednija bi također 27.67 % pacijenata rizika biopsije sjemenika, no 15.38 % njih bi bilo pozitivno na signal PRM1, odnosno imali bi spermije i zrele spermatide u sjemeniku. Budući da se FSH, LH i povijest kriptorhizma određuju svim pacijentima u dijagnostičkoj obradi, ako se utvrdi klinička primjenjivost modela bilo bi opravdano uvrstiti ih u model kako bi se povećala NPV.

Modeli koji su konstruirani koristeći umjetne neuronske mreže (ANN) imali su AUC > 0.8 i točnost predviđanja > 80 %. Rezultat je na prvi pogled slabiji od onoga dobivenog multivarijatnom logističkom regresijom, no treba naglasiti da je ANN model koristio samo 60 % prikupljenih podataka za treniranje modela, budući da je ostatak bio potreban za testiranje. Daljnjim istraživanjima na većem broju uzoraka mogla bi se i poboljšati predikcija modela.

Korištenje ANN ima nekoliko prednosti pred logističkom regresijom. Jedna od prednosti je što ANN-ovi mogu modelirati složene, nelinearne odnose između ulaznih i izlaznih varijabli što ih čini svestranijima u otkrivanju kompliciranih obrazaca u podacima. Također mogu automatski naučiti koje značajke u podacima su relevantne dok se to regresijskim modelima mora unaprijed zadati. ANN-ovi mogu biti i robusniji prema nepotpunim podacima i podacima s visokom razinom šuma. Negativni aspekt ANN-a je to što su esencijalno crna kutija pa ih to čini manje interpretabilnim od regresijskih modela te što zahtijevaju veću količinu podataka za treniranje. Potrebno je proširiti ovo istraživanje na veći broj uzoraka kako bi se mogla procijeniti korisnost ANN-a za predikciju prisutnosti spermija u tkivu sjemenika.

Histološkom analizom, koja je trenutna metoda predikcije ekstrakcije spermija, se 35.09 % uzoraka ocijenilo neprikladnim, dok kod 42.86 % nije registriran signal PRM1. Kod 10 % uzoraka iz skupine H0 uočene su zrele spermatide pozitivne na PRM1, a kod 16.22 % uzoraka iz skupine H1 nije primijećen signal PRM1 što bi moglo ukazivati na nezrelost spermatida koje su primijećene histološkom analizom. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražila povezanost gustoće signala PRM1 i uspješnosti ekstrakcije spermija iz uzoraka. Reduciranom verzijom modela za predikciju rezultata histološke analize neprikladnim bi se ocijenilo 25 % uzoraka, dakle 71.25 % neprikladnih uzoraka bi se moglo točno identificirati. Modelom za predikciju signala PRM1 neprikladnim za ekstrakciju spermija bi se ocijenilo 27.67 % uzoraka, odnosno 64.56 % neprikladnih uzoraka bi se moglo točno identificirati, te ne bi bilo lažno negativnih uzoraka. Primjenom tog modela mogli bi se i otkriti uzorci koji sadrže zrele spermatide koje se možda ne bi moglo identificirati histološkom analizom.

6.6. Translacijski potencijal istraživanja i budući razvoj

Prediktivni modeli koji su do sada rađeni nisu predviđali prisutnost spermija u tkivu već uspješnost ekstrakcije spermija iz tkiva sjemenika te to treba uzeti u obzir pri uspoređivanju AUC modela. Kao najuspješnije metode predikcije do sad su se pokazale koncentracija AMH, omjer koncentracije AMH i testosterona u krvi te prediktivni modeli koji su koristili podatke iz redovite dijagnostičke obrade pacijenata (83,98,99). AUC te NPV i PPV tih modela su usporedivi s vrijednostima modela konstruiranog u ovoj studiji. Prednost ovog modela je primarno potencijal za neinvazivno mapiranje sjemenika i neinvazivno određivanje lokusa spermatogeneze iz kojih bi se onda uzimali uzorci tkiva za ekstrakciju spermija.

Klinička primjena modela, osim dokazane kvalitete same mjerne metode, pretpostavlja i ekonomsku opravdanost iste. Postupak predložen u ovom istraživanju zahtjeva uključivanje snimanja sjemenika magnetskom rezonancijom u dijagnostičku obradu neplodnog muškarca. Prema važećem cjeniku usluga HZZO-a (27.10.2023.) cijena snimanja MR jedne anatomske regije je 121.04 Eura, dok je ukupna cijena kirurške biopsije sjemenika i patohistološke obrade i analize tkiva 487.01 Eura (133). Svi pacijenti bi morali ići na MR snimanje, no onda bi se ovisno o korištenom modelu, 25 % -27.6 % pacijenata poštedjelo kirurške biopsije sjemenika te bi ukupna cijena dijagnostičke obrade muškaraca s azoospermijom iznosila 96 %-99 % trenutne cijene. Dakle, i bez dodatnog troška za zdravstveni sustav oko četvrtinu pacijenata bi mogli poštedjeti rizika operacije.

Iz ovog istraživanja proizlazi da je prediktivnim modelom temeljenom na *ex vivo* snimanju tkiva sjemenika magnetskom rezonancijom moguće dovoljno točno predvidjeti prisutnost spermija u tkivu sjemenika te da je opravdana klinička validacija prediktivnog modela na *in vivo* snimkama sjemenika magnetskom rezonancijom. U budućim istraživanjima potrebno je i odrediti odnos histološke i imunohistokemijske prisutnosti spermija s uspješnošću ekstrakcije spermija kako bi model mogao biti klinički primjenjiv. Daljnja istraživanja su također potrebna kako bi se omogućilo mapiranje sjemenika prediktivnim modelom te određivanje zona koje sadrže spermije i u koje bi se mogla usmjeriti biopsija sjemenika.

7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem povezanosti parametara određenih snimanjem magnetskom rezonancijom i spektroskopijom magnetskom rezonancijom te redovitom dijagnostičkom obradom s prisutnošću spermija u sjemenicima muškaraca s azoospermijom te konstrukcijom prediktivnog modela zaključeno je:

1. Uzorci sjemenika su histološki analizirani te je određen udio tubula s $JS \geq 8$, odnosno udio tubula koji sadrže zrele spermatide i spermije. Kvantifikacija signala PRM1 proteina u tkivu sjemenika kao dodatak histološkoj analizi može pomoći u klasifikaciji tkiva u skupine prema prisutnosti zrelih spermatida i spermija te točnijoj kvantifikaciji količine spermija i zrelih spermatida.
2. Podaci iz redovite dijagnostičke obrade uspoređeni su među skupinama te su povišeni FSH i LH povezani su s nedostatkom spermija i zrelih spermatida u tkivu dok nije uočena poveznica za anamnezu pozitivnu na kriptorhizam.
3. Rahlost uzoraka sjemenika mjerena udjelom vokseli koji sadrže više od 50 % tkiva te vrijednost T2 su značajno povećani u skupini uzoraka koji ne sadrže spermije i zrele spermatide, uslijed čega voda više prodire u te uzorke prilikom ex vivo MRI snimanja i pojačano maskira intrinzične signale iz samog tkiva. Određivanje volumena i T2 uzoraka biekspencijalnim modelom se pokazalo korisnim u ograničavanju utjecaja vode na mjerene parametre.
4. Parametri dobiveni MRI snimanjem uspoređeni su među skupinama te je pokazano da su razina i usmjerenost difuzije koje su iskazane vrijednostima ADC i FA povećane u uzorcima bez spermija i zrelih spermatida, dok količina makromolekula koja se odražava u vrijednosti MTR nije bila značajno različita između različitih ispitnih skupina.
5. Koncentracije metabolita dobivene MR spektroskopijom uspoređene su među skupinama te je pokazano da su koncentracije kolina i laktata u tkivu sjemenika

značajno više u uzorcima u kojima je nađen signal proteina PRM1, dok za kreatin, glutamat i mio-inozitol nije uočena razlika. Koncentracija niti jednog metabolita nije bila značajno povećana u skupini uzoraka s histološki prisutnim spermijima i zrelim spermatidama.

6. Parametri dobiveni MRI snimanjem te MR spektroskopijom uspoređeni su za svježe i krioprezervirane uzorke te je pokazano da krioprezervacija, odnosno promjena morfologije i sastava tkiva, nema utjecaj na vrijednost T2 tkiva sjemenika, odnosno količinu vode u uzorku. Razina i usmjerenost difuzije mjerene vrijednostima ADC i FA su značajno snižene u krioprezerviranim uzorcima, dok je količina makromolekula mjerena vrijednosti MTR značajno povišena. Koncentracije kreatina, glutamata, laktata i mio-inozitola su značajno snižene u krioprezerviranim uzorcima dok je koncentracija kolina nepromijenjena.
7. Varijable koje su samostalno imale AUC iznad 0.7 u predikciji prisutnosti spermija i zrelih spermatida u tkivu su bile T2, ADC, FA, FSH i koncentracija kolina, dok su anamneza pozitivna na kriptorhizam i MTR imali AUC ispod 0.6. Količina spermija i zrelih spermatida u tkivu umjereno negativno korelira s FSH dok umjereno pozitivno korelira s koncentracijom kolina. Model koji sadržava svih 12 varijabli je prediktivan za količinu spermija i zrelih spermatida u tkivu.
8. Reducirani prediktivni model za histološku prisutnost spermija i zrelih spermatida u uzorcima sjemenika temeljen na parametrima tkiva dobivenim snimanjima magnetskom rezonancijom te podacima iz anamneze pacijenta (FSH, T2, ADC, FA) pokazuje dobru prediktivnost (AUC=0.8307), može razlučiti uzorke koji ne sadrže spermije i zrele spermatide s negativnom prediktivnom vrijednosti od 78.57 % te bi u kliničkoj primjeni mogao poštedjeti 25 % pacijenata s azoospermijom biopsije sjemenika.
9. Prediktivni model za prisutnost signala protamina 1 (PRM1) koji označava prisutnost spermija i zrelih spermatida u uzorcima sjemenika temeljen na parametrima tkiva dobivenim snimanjima magnetskom rezonancijom te

podacima iz anamneze pacijenta pokazuje odličnu prediktivnost ($AUC=0.9738$) te može otkriti uzorke koji ne sadrže spermije i zrele spermatide s negativnom prediktivnom vrijednosti od 100 % te bi u kliničkoj primjeni mogao poštediti 27.67 % pacijenata s azospermijom biopsije sjemenika.

8. SAŽETAK

U populaciji neplodnih muškaraca, 15 % ih ima azoospermiju i ti se muškarci upućuju na biopsiju sjemenika koja je uspješna u oko 50 % pacijenata. Cilj ove studije bio je izraditi prediktivni model za prisutnost spermija u tkivu sjemenika temeljen na *ex-vivo* podacima dobivenim snimanjem magnetskom rezonancijom (MRI) i spektroskopijom, kao i podacima dobivenim standardnom dijagnostičkom obradom. Uzorci humanog tkiva sjemenika dobiveni biopsijom podvrgnuti su 7T MRI koje je uključivalo T2 mapiranje, snimanje difuzijskog tenzora (DTI), snimanje prijenosa magnetizacije (MTI) i spektroskopiju magnetske rezonancije (MRS). Uzorci su zatim histološki obrađeni i analizirani. Provedena je multivarijatna logistička regresija kako bi se procijenio odnos između 12 nezavisnih varijabli i prisutnosti spermija. Nezavisne varijable korištene za konstrukciju prediktivnog modela bile su T2, ADC, FA, MTR, koncentracije kolina, kreatina, laktata, glutamata i mioinozitola, razine FSH i LH i povijest kriptorhizma kod pacijenta. Površina ispod ROC krivulje za najuspješniji model bila je 0,9738 s negativnom prediktivnom vrijednosti od 100 %. Prisutnosti spermija u tkivu sjemenika moguće je predvidjeti korištenjem prediktivnog modela temeljenog na magnetskoj rezonanciji, a model je potrebno validirati na *in vivo* podacima za kliničku upotrebu.

9. SUMMARY

Predictive Model for Sperm Presence in Testes of Azoospermic Men Based on Magnetic Resonance Imaging

Ana Planinić

2024.

15 % of infertile men have azoospermia, and those men are referred for a testicular biopsy, which is successful in around 50 % of patients. The objective of this study was to construct a predictive model for sperm presence based on *ex-vivo* magnetic resonance imaging (MRI) and spectroscopy data, as well as data obtained through the standard diagnostic evaluation of azoospermia. Samples of human testicular tissue were obtained via testicular biopsy and underwent 7T MRI, specifically T2 mapping, diffusion tensor imaging (DTI), magnetization transfer imaging (MTI), and magnetic resonance spectroscopy (MRS). Samples were then histologically processed and analyzed. Multivariate logistic regression was performed to evaluate the relationship between 12 independent variables and sperm presence. The independent variables used for the construction of the predictive model were T2, ADC, FA, MTR, concentrations of choline, creatine, lactate, glutamate, and myo-inositol, FSH and LH levels and patient history of cryptorchidism. The predicted area under the ROC curve for the most successful model was 0.9738, with a negative predictive power of 100 %. Sperm presence in testicular tissue can be predicted by using a predictive model based on magnetic resonance imaging, and the model should be validated with *in-vivo* data for clinical use.

10. LITERATURA

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, i sur. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1520–4.
2. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *Int J Gen Med.* 2020 Feb;Volume 13:29–41.
3. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2015 Dec 26;13(1):37.
4. Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jul;5(7):544–53.
5. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol.* 2018 Jun 5;15(6):369–84.
6. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction.* 1998 Apr 1;13(suppl 1):33–44.
7. Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, i sur. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development1. *Biol Reprod.* 2013 Sep 1;89(3).
8. De Braekeleer M, Nguyen MH, Morel F, Perrin A. Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Apr 25;32(4):615–23.
9. Candela L, Boeri L, Capogrosso P, Cazzaniga W, Pozzi E, Belladelli F, i sur. Correlation among isolated teratozoospermia, sperm DNA fragmentation and markers of systemic inflammation in primary infertile men. *PLoS One.* 2021 Jun 7;16(6):e0251608.
10. Shahrokhi SZ, Salehi P, Alyasin A, Taghiyar S, Deemeh MR. Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. *Andrologia.* 2020 Mar 3;52(2).
11. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, i sur. Asthenozoospermia: Analysis Of A Large Population. *Arch Androl.* 2003 Jan 9;49(5):343–9.
12. Anawalt BD, Page ST. Approach to the male with infertility. In: *UpToDate.* Waltham, MA; 2023.

13. Berkowitz GS, Lapinski RH, Gazella JG, Dolgin SE, Bodian CA, Holzman IR. Prevalence and Natural History of Cryptorchidism. *Pediatrics*. 1993 Jul 1;92(1):44–9.
14. Park KH, Lee JH, Han JJ, Lee SD, Song SY. Histological evidences suggest recommending orchiopexy within the first year of life for children with unilateral inguinal cryptorchid testis. *International Journal of Urology*. 2007 Jul;14(7):616–21.
15. Hadziselimovic F, Höcht B, Herzog B, Buser MW. Infertility in Cryptorchidism Is Linked to the Stage of Germ Cell Development at Orchidopexy. *Horm Res Paediatr*. 2007;68(1):46–52.
16. Richie JP. Urological Oncology: Testis Cancer and Advances in Oncological Therapy. *Journal of Urology*. 2008 Feb;179(2):547–8.
17. Bu Q, Pan Z, Jiang S, Wang A, Cheng H. The Effectiveness of hCG and LHRH in Boys with Cryptorchidism: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Hormone and Metabolic Research*. 2016 Apr 6;48(05):318–24.
18. Lee PA. Paternity After Bilateral Cryptorchidism. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997 Mar 1;151(3):260.
19. Rohayem J, Luberto A, Nieschlag E, Zitzmann M, Kliesch S. Delayed treatment of undescended testes may promote hypogonadism and infertility. *Endocrine*. 2017 Mar 9;55(3):914–24.
20. Loebenstein M, Thorup J, Cortes D, Clasen-Linde E, Hutson JM, Li R. Cryptorchidism, gonocyte development, and the risks of germ cell malignancy and infertility: A systematic review. *J Pediatr Surg*. 2020 Jul;55(7):1201–10.
21. Koni A, Ozseker HS, Arpali E, Kilinc E, Dogan HS, Akyol A, i sur. Histopathological Evaluation of Orchiectomy Specimens in 51 Late Postpubertal Men with Unilateral Cryptorchidism. *Journal of Urology*. 2014 Oct;192(4):1183–8.
22. Muncey W, Dutta R, Terlecki RP, Woo LL, Scarberry K. Fertility potential in adult men treated for uncorrected bilateral cryptorchidism: A systematic literature review and analysis of case reports. *Andrology*. 2021 May 8;9(3):781–91.
23. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction*. 2001 May;16(5):972–8.
24. Moody JA, Ahmed K, Yap T, Minhas S, Shabbir M. Fertility management in testicular cancer: the need to establish a standardized and evidence-based patient-centric pathway. *BJU Int*. 2019 Jan;123(1):160–72.

25. Chatziparasidou A, Christoforidis N, Samolada G, Nijs M. Sperm aneuploidy in infertile male patients: a systematic review of the literature. *Andrologia*. 2015 Oct;47(8):847–60.
26. Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl*. 2016;18(2):179.
27. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, i sur. Varicocele and Male Factor Infertility Treatment: A New Meta-analysis and Review of the Role of Varicocele Repair. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):796–808.
28. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, i sur. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*. 2021 Nov;80(5):603–20.
29. Rowe PJ WHO. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000.
30. Ruz A, Pilatz A, Wagenlehner F, Linn T, Diemer Th, Schuppe HC, i sur. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol*. 2012 Feb 12;30(1):23–30.
31. Cioppi F, Rosta V, Krausz C. Genetics of Azoospermia. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 23;22(6):3264.
32. Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Human Reproduction*. 1993 Feb;8(2):215–20.
33. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012 Jan;27(1):25–35.
34. Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999 Jul;60(2):102–6.
35. Oduwole OO, Huhtaniemi IT, Misrahi M. The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 25;22(23):12735.
36. Boepple PA, Hayes FJ, Dwyer AA, Raivio T, Lee H, Crowley WF, i sur. Relative Roles of Inhibin B and Sex Steroids in the Negative Feedback Regulation of Follicle-Stimulating Hormone in Men across the Full Spectrum of Seminiferous Epithelium Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 May 1;93(5):1809–14.

37. O'Connor AE, de Kretser DM. Inhibins in Normal Male Physiology. *Semin Reprod Med.* 2004 Aug;22(3):177–85.
38. Plant TM, Marshall GR. The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates. *Endocr Rev.* 2001 Dec 1;22(6):764–86.
39. Bernard DJ, Li Y, Toufaily C, Schang G. Regulation of Gonadotropins. In: *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience.* Oxford University Press; 2019.
40. Bouvattier C, Maione L, Bouligand J, Dodé C, Guiochon-Mantel A, Young J. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Mar 18;8(3):172–82.
41. Zitzmann M, Aksglaede L, Corona G, Isidori AM, Juul A, T'Sjoen G, i sur. European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology.* 2021 Jan 6;9(1):145–67.
42. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):622–6.
43. Bojesen A, Gravholt CH. Klinefelter syndrome in clinical practice. *Nat Clin Pract Urol.* 2007 Apr;4(4):192–204.
44. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril.* 2000 Nov;74(5):925–9.
45. Vorona E, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E. Clinical, Endocrinological, and Epigenetic Features of the 46,XX Male Syndrome, Compared with 47,XXY Klinefelter Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep 1;92(9):3458–65.
46. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, i sur. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation.* 2011 Jan 4;121(1):328–41.
47. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, i sur. Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Mar 1;92(3):762–70.
48. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet.* 2017 May 29;136(5):637–55.

49. World Health Organization Department of Reproductive Health and Research. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva, Switzerland; 2021.
50. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, i sur. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1;23(6):660–80.
51. Anawalt BD, Page ST. Treatments for male infertility. In: *UpToDate*. Waltham, MA; 2023.
52. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, i sur. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017 May 1;23(3):265–75.
53. Flannigan R, Schlegel PN. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 Oct;44:26–37.
54. Schlegel PN, Girardi SK. In Vitro Fertilization for Male Factor Infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Mar 1;82(3):709–16.
55. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril*. 1995 Jun;63(6):1231–40.
56. Tarlatzis BC, Bili H. Intracytoplasmic Sperm Injection Survey of World Results. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jan 25;900(1):336–44.
57. Bernie AM, Mata DA, Ramasamy R, Schlegel PN. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015 Nov;104(5):1099-1103.e3.
58. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Human Reproduction*. 1999 Jan 1;14(1):131–5.
59. Esteves SC. Microdissection TESE versus conventional TESE for men with nonobstructive azoospermia undergoing sperm retrieval. *International braz j urol*. 2022 Jun;48(3):569–78.
60. El-Haggar S, Mostafa T, Abdel Nasser T, Hany R, Abdel Hadi A. Fine needle aspiration vs. mTESE in non-obstructive azoospermia. *Int J Androl*. 2008 Dec;31(6):595–601.

61. Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertil Steril*. 2006 Jun;85(6):1744–52.
62. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*. 2001 Nov;76(5):892–900.
63. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*. 2004 Oct;36(5):321–6.
64. Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelić Z, Milavec-Puretić V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies. *Andrologia*. 2001 Nov;33(6):368–78.
65. Edn. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen 2018. ISBN 978-94-92671-01-1. EAU Guidelines.
66. Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy — effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids*. 2000 Aug;106(2):145–56.
67. Fu L, An Q, Zhang K, Liu Y, Tong Y, Xu J, i sur. Quantitative proteomic characterization of human sperm cryopreservation: using data-independent acquisition mass spectrometry. *BMC Urol*. 2019 Dec 16;19(1):133.
68. Trapphoff T, Dieterle S. Cryopreservation of Ovarian and Testicular Tissue and the Influence on Epigenetic Pattern. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 4;24(13):11061.
69. Moubasher AE, Taha EA, Younis A, Fakhry ME, Morsy H. Testicular tissue oxidative stress in azoospermic patients: Effect of cryopreservation. *Andrologia*. 2020 Dec 13;52(11).
70. Oraiopoulou C, Vorniotaki A, Taki E, Papatheodorou A, Christoforidis N, Chatziparasidou A. The impact of fresh and frozen testicular tissue quality on embryological and clinical outcomes. *Andrologia*. 2021 Jun 7;53(5).
71. Caroppo E, Colpi EM, Gazzano G, Vaccalluzzo L, Scropo FI, D'Amato G, i sur. Testicular histology may predict the successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia undergoing conventional TESE: a diagnostic accuracy study. *J Assist Reprod Genet*. 2017 Jan 21;34(1):149–54.

72. Ortac M, Cilesiz NC, Demirelli E, Aydin R, Savun M, Ermec B, i sur. Undescended Testis Does Not Affect the Outcome of Microdissection Testicular Sperm Extraction. *Urology*. 2020 Jul;141:77–81.
73. Arshad MA, Majzoub A, Esteves SC. Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol*. 2020 Nov 9;52(11):2015–38.
74. Pavan-Jukic D, Stubljar D, Jukic T, Starc A. Predictive factors for sperm retrieval from males with azoospermia who are eligible for testicular sperm extraction (TESE). *Syst Biol Reprod Med*. 2020 Jan 2;66(1):70–5.
75. Ntorkou A, Tsili AC, Goussia A, Astrakas LG, Maliakas V, Sofikitis N, i sur. Testicular Apparent Diffusion Coefficient and Magnetization Transfer Ratio: Can These MRI Parameters Be Used to Predict Successful Sperm Retrieval in Nonobstructive Azoospermia? *American Journal of Roentgenology*. 2019 Sep;213(3):610–8.
76. Pavan-Jukic D, Starc A, Stubljar D, Jukic T. Obesity with High Body Mass Index Does Not Influence Sperm Retrieval in Males with Azoospermia. *Medical Science Monitor*. 2020 Apr 6;26.
77. Yang Q, Huang YP, Wang HX, Hu K, Wang YX, Huang YR, i sur. Follicle-stimulating hormone as a predictor for sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2015;17(2):281.
78. Aljubran A, Safar O, Elatreisy A, Alwadai R, Shalkamy O, Assiri HM, i sur. Factors predicting successful sperm retrieval in men with nonobstructive Azoospermia: A single center perspective. *Health Sci Rep*. 2022 Jul 21;5(4).
79. Liu YP, Qi L, Zhang NN, Shi H, Su YC. Follicle-stimulating hormone may predict sperm retrieval rate and guide surgical approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol*. 2020 Dec;20(4):573–9.
80. Deng C, Liu D, Zhao L, Lin H, Mao J, Zhang Z, i sur. Inhibin B-to-Anti-Mullerian Hormone Ratio as Noninvasive Predictors of Positive Sperm Retrieval in Idiopathic Non-Obstructive Azoospermia. *J Clin Med*. 2023 Jan 7;12(2):500.
81. Wang J, Lu N, Zhang S, Tang Z, Huang Y, Li W, i sur. Reference range and cutoff value of serum inhibin B to predict successful sperm retrieval: A cross-sectional study of 30 613 Chinese men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020 Mar 15;92(3):232–40.

82. Li J, Yang F, Dong L, Chang D, Yu X. Seminal plasma biomarkers for predicting successful sperm retrieval in patients with nonobstructive azoospermia: a narrative review of human studies. *Basic Clin Androl.* 2023 Apr 20;33(1):9.
83. Alfano M, Ventimiglia E, Locatelli I, Capogrosso P, Cazzaniga W, Pederzoli F, *i sur.* Anti-Mullerian Hormone-to-Testosterone Ratio is Predictive of Positive Sperm Retrieval in Men with Idiopathic Non-Obstructive Azoospermia. *Sci Rep.* 2017 Dec 15;7(1):17638.
84. Zhang Q, Liu Z, Han X, Li Y, Xia T, Zhu Y, *i sur.* Circulatory exosomal tRF-Glu-CTC-005 and tRF-Gly-GCC-002 serve as predictive factors of successful microdissection testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2022 Mar;117(3):512–21.
85. Bastug Y, Tokuc E, Bastug N, Artuk I, Tosun C, Cakiroglu HS, *i sur.* Systemic immune-inflammation index, neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio are predictors of sperm presence in microdissection testicular sperm extraction. *Andrologia.* 2022 Jul 9;54(6).
86. Drabovich AP, Dimitromanolakis A, Saraon P, Soosaipillai A, Batruch I, Mullen B, *i sur.* Differential Diagnosis of Azoospermia with Proteomic Biomarkers ECM1 and TEX101 Quantified in Seminal Plasma. *Sci Transl Med.* 2013 Nov 20;5(212).
87. Kamel Amer M, Zohdy W, GamalEl Din SF, Hosni Moawad H, Hasan El Saedy DA, Zaki Gamal EA, *i sur.* Evaluation of the Utility of Seminal Plasma Resistin and Leptin in Predicting Successful Surgical Sperm Retrieval in Men with Non-Obstructive Azoospermia. *J Reprod Infertil.* 2023 Apr 18;
88. Ghanami Gashti N, Sadighi Gilani MA, Kabodmehri R, Nikmahzar A, Salem M, Abbasi M. Evaluation of PGK2 and ACR proteins in seminal plasma: suggestion of potential new biomarkers for prediction of sperm retrieval in non-obstructive azoospermia patients. *Hum Fertil.* 2022 Aug 5;1–7.
89. Kati B, Gonel A, Ordek E, Pelit ES, Ciftci H. Do inflammatory markers such as NLRP3 and IL1 - β have an effect on the prediction of testicular sperm extraction success in infertile men? *Andrologia.* 2022 Dec 23;54(11).
90. Zhang Y, Tang Y, Huang J, Liu H, Liu X, Zhou Y, *i sur.* Circulating microRNAs in seminal plasma as predictors of sperm retrieval in microdissection testicular sperm extraction. *Ann Transl Med.* 2022 Apr;10(7):392–392.

91. Cannarella R, Barbagallo F, Crafa A, La Vignera S, Condorelli RA, Calogero AE. Seminal Plasma Transcriptome and Proteome: Towards a Molecular Approach in the Diagnosis of Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 3;21(19):7308.
92. Chen H, Xie Y, Li Y, Zhang C, Lv L, Yao J, i sur. Outcome prediction of microdissection testicular sperm extraction based on extracellular vesicles piRNAs. *J Assist Reprod Genet.* 2021 Jun 9;38(6):1429–39.
93. Willems M, Devriendt C, Olsen C, Caljon B, Janssen T, Gies I, i sur. Micro RNA in Semen/Urine from Non-Obstructive Azoospermia Patients as Biomarkers to Predict the Presence of Testicular Spermatozoa and Spermatogonia. *Life.* 2023 Feb 23;13(3):616.
94. Nariyoshi S, Nakano K, Sukegawa G, Sho T, Tsuji Y. Ultrasonographically determined size of seminiferous tubules predicts sperm retrieval by microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2020 Jan;113(1):97-104.e2.
95. Abdelaal AMA, El-Azizi HM, GamalEl Din SF, Abdulsalam Mohammad Azzazi O, Shokr Mohamed M. Evaluation of the potential role of shear wave elastography as a promising predictor of sperm retrieval in non-obstructive azoospermic patients: A prospective study. *Andrology.* 2021 Sep 25;9(5):1481–9.
96. Ma Y, Chen B, Wang H, Hu K, Huang Y. Prediction of sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia using artificial neural networks: leptin is a good assistant diagnostic marker. *Human Reproduction.* 2011 Feb 1;26(2):294–8.
97. Deng CY, Liu DF, Zhao LM, Lin HC, Mao JM, Zhang Z, i sur. Development of a predictive model for increasing sperm retrieval success by microdissection testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl.* 2023;25(5):598–603.
98. Zeadna A, Khateeb N, Rokach L, Lior Y, Har-Vardi I, Harlev A, i sur. Prediction of sperm extraction in non-obstructive azoospermia patients: a machine-learning perspective. *Human Reproduction.* 2020 Jul 1;35(7):1505–14.
99. Bachelot G, Dhombres F, Sermondade N, Haj Hamid R, Berthaut I, Frydman V, i sur. A Machine Learning Approach for the Prediction of Testicular Sperm Extraction in Nonobstructive Azoospermia: Algorithm Development and Validation Study. *J Med Internet Res.* 2023 Jun 21;25:e44047.

100. Koh DM, Collins DJ. Diffusion-Weighted MRI in the Body: Applications and Challenges in Oncology. *American Journal of Roentgenology*. 2007 Jun;188(6):1622–35.
101. Wang H, Guan J, Lin J, Zhang Z, Li S, Guo Y, i sur. Diffusion-Weighted and Magnetization Transfer Imaging in Testicular Spermatogenic Function Evaluation: Preliminary Results. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2018 Jan;47(1):186–90.
102. Tsili AC, Ntorkou A, Goussia A, Astrakas L, Panopoulou E, Sofikitis N, i sur. Diffusion tensor imaging parameters in testes with nonobstructive azoospermia. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2018 Nov;48(5):1318–25.
103. Han BH, Park S Bin, Seo JT, Chun YK. Usefulness of Testicular Volume, Apparent Diffusion Coefficient, and Normalized Apparent Diffusion Coefficient in the MRI Evaluation of Infertile Men With Azoospermia. *American Journal of Roentgenology*. 2018 Mar;210(3):543–8.
104. Kothari LK, Gupta AS. Effect of ageing on the volume, structure and total Leydig cell content of the human testis. *Int J Fertil*. 1974;19(3):140–6.
105. Tsili A, Giannakis D, Sylakos A, Ntorkou A, Astrakas L, Sofikitis N, i sur. Apparent diffusion coefficient values of normal testis and variations with age. *Asian J Androl*. 2014;16(3):493.
106. Tsili AC, Astrakas LG, Goussia AC, Sofikitis N, Argyropoulou MI. Volumetric apparent diffusion coefficient histogram analysis of the testes in nonobstructive azoospermia: a noninvasive fingerprint of impaired spermatogenesis? *Eur Radiol*. 2022 Apr 29;32(11):7522–31.
107. Dietary Reference Values for choline. *EFSA Journal*. 2016 Aug;14(8).
108. Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr*. 2012 Feb 6;9(1).
109. Vazquez-Levin MH, Verón GL. Myo-inositol in health and disease: its impact on semen parameters and male fertility. *Andrology*. 2020 Mar 17;8(2):277–98.
110. Pal MM. Glutamate: The Master Neurotransmitter and Its Implications in Chronic Stress and Mood Disorders. *Front Hum Neurosci*. 2021 Oct 29;15.
111. Storto M, Sallese M, Salvatore L, Poulet R, Condorelli D, Dell’Albani P, i sur. Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis. *Journal of Endocrinology*. 2001 Jul 1;170(1):71–8.

112. Ntorkou A, Tsili AC, Astrakas L, Goussia A, Panopoulou E, Sofikitis N, i sur. In vivo biochemical investigation of spermatogenic status: 1H-MR spectroscopy of testes with nonobstructive azoospermia. *Eur Radiol*. 2020 Aug 30;30(8):4284–94.
113. Tsili AC, Astrakas LG, Ntorkou A, Giannakis D, Stavrou S, Maliakas V, i sur. MR Spectra of Normal Adult Testes and Variations with Age: Preliminary Observations. *Eur Radiol*. 2016 Jul 16;26(7):2261–7.
114. Aaronson DS, Iman R, Walsh TJ, Kurhanewicz J, Turek PJ. A novel application of 1H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*. 2010 Apr 1;25(4):847–52.
115. Storey P, Gonen O, Rosenkrantz AB, Khurana KK, Zhao T, Bhatta R, i sur. Quantitative Proton Spectroscopy of the Testes at 3 T. *Invest Radiol*. 2018 Feb;53(2):87–95.
116. Parenti GC, Albarello F. Role of MR Spectroscopy (H1-MRS) of the Testis in Men with Semen Analysis Altered. *Reproductive System & Sexual Disorders*. 2016;5(3).
117. Baleato-González S, García-Figueiras R, Santiago-Pérez MI, Requejo-Isidro I, Vilanova JC. Usefulness of 1H magnetic resonance spectroscopy in human testes: preliminary study. *Clin Radiol*. 2015 Sep;70(9):1026–31.
118. Firat AK, Uğraş M, Karakaş HM, Erdem G, Kurus M, Ugras M, i sur. 1H magnetic resonance spectroscopy of the normal testis: preliminary findings. *Magn Reson Imaging*. 2008 Feb;26(2):215–20.
119. Çelik Ö, Hatırnaz Ş, Erşahin A, Başbuğ A, Yıldırım GY, Özener V, i sur. Testis spectroscopy may predict sperm retrieval rate in men with non-obstructive azoospermia undergoing micro-TESE: A pilot study. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*. 2020 Jun 8;21(2):70–8.
120. McRobbie DW, Moore EA, Graves MJ, Prince MR. *MRI from Picture to Proton*. Cambridge University Press; 2006.
121. Graveron-Demilly D. Quantification in magnetic resonance spectroscopy based on semi-parametric approaches. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2014 Apr 28;27(2):113–30.
122. Chan JKC. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int J Surg Pathol*. 2014 Feb 9;22(1):12–32.
123. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 2007;8(9):227.

124. Ribas-Maynou J, Nguyen H, Wu H, Ward WS. Functional Aspects of Sperm Chromatin Organization. In 2022. p. 295–311.
125. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983 Sep;148(3):839–43.
126. McIntosh RL, Anderson V. A comprehensive tissue properties database provided for the thermal assessment of a human at rest. *Biophys Rev Lett*. 2010 Sep 20;05(03):129–51.
127. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. Wiley; 2000.
128. MedCalc Software Ltd. Comparison of AUC of independent ROC curves. [Internet]. [cited 2023 Dec 12]. Available from: https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_independentROCTest.php
129. Abofoul-Azab M, Lunenfeld E, Kleiman S, Barda S, Hauser R, Huleihel M. Determining the expression levels of *CSF-1* and *OCT4*, *CREM-1*, and protamine in testicular biopsies of adult Klinefelter patients: Their possible correlation with spermatogenesis. *Andrologia*. 2022 Nov 19;54(10).
130. Mateus I, Feijó M, Espínola LM, Vaz C V., Correia S, Socorro S. Glucose and glutamine handling in the Sertoli cells of transgenic rats overexpressing regucalcin: plasticity towards lactate production. *Sci Rep*. 2018 Jul 9;8(1):10321.
131. Boussouar F, Benahmed M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2004 Sep;15(7):345–50.
132. Erkkila K. Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Mol Hum Reprod*. 2002 Feb 1;8(2):109–17.
133. Šifrnici HZZO-a [Internet]. 2023 [cited 2023 Nov 1]. Available from: <https://hzzo.hr/poslovni-subjekti/hzzo-za-partnere/sifrnici-hzzo-0>

11. BIOGRAFIJA

Ana Planinić rođena je 18. srpnja 1994. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Diplomirala je 2018. godine na studiju medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomskim radom pod naslovom: "Uloga subtalamičke jezgre u Parkinsonovoj bolesti". Nakon završenog staža 2019. godine upisala je poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te je zaposlena kao asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je u radu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu. Autorica je dva znanstvena rada indeksirana u časopisima svrstanim u prvu kvartilu, koautorica jednog rada indeksiranog u prvoj kvartili i jednog rada indeksiranog u trećoj kvartili, 9 sažetaka na međunarodnim kongresima te dobitnica međunarodne nagrade za najbolji poster na "European Congress of Andrology". Od 2019. godine sudjeluje u nastavi iz predmeta „Histologija i embriologija“ na preddiplomskom studiju medicine Medicinskog fakulteta u Zagrebu te istog predmeta na engleskome jeziku.