

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DANIJELA MANDIĆ

**PRIMERJAVA SERUMSKEGA IN FOLIKLOVEGA ANTI-
MULLERJEVEGA HORMONA MED SPONTANIMI IN SPODBUJENIMI
CIKLUSI PRI PACIENTKAH V POSTOPKU ZUNAJTELESNE
OPLODITVE**

**COMPARASION OF SERUM AND FOLLICULAR CONCENTRATIONS
OF ANTI-MULLERIAN HORMONE BETWEEN SPONTANEOUS AND
STIMULATED CYCLES IN THE PATIENTS ATTENDING IN VITRO
FERTILIZATION PROGRAM**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo in na Kliničnem oddelku za reprodukcijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom izr. prof. dr. Ede Bokal - Vrtačnik, dr.med.

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., ki je sprejel mentorstvo ter mi z spodbudnimi besedami in koristnimi nasveti pomagal pri pisanju mojega diplomskega dela.

Posebna zahvala gre somentorici, izr. prof. dr. Ede Bokal - Vrtačnik, dr.med., za veliko potrpežljivosti in razumevanje, ter za vso pomoč in dobronamerne pripombe pri izdelavi diplomske naloge.

Najlepša hvala mami in očetu, ki sta mi omogočila študij, za vso podporo in razumevanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom izr. prof. dr. Ede Bokal – Vrtačnik, dr. med.

Kazalo

Povzetek.....	III
Seznam okrajšav.....	V
Uvod.....	1
Neplodnost in postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo	1
OPIS ZUNAJTELESNE OPLODITVE	4
JAJČNA CELICA	7
SEMENČICA	9
OPLODITEV, ZRELOST IN GENTSKE NEPRAVILNOSTI GAMET	10
OPLOJENA JAJČNA CELICA	10
Ocena kakovosti zarodkov	13
Sinteza AMH (Anti-Mullerian hormone) v granuloznih celicah	14
Metode za določanje AMH (Anti-Mullerian hormone)	16
Namen dela.....	21
Eksperimentalni del	22
Osnovni potek eksperimentalnega dela	22
Opis eksperimentalnega dela	22
Pridobitev jajčnih celic in oploditev	23
Merjenje hormonskih vrednosti v serumu in foliklovi tekočini	24
Statistična analiza	24
Oprema in reagenti za analizo	25
Postopek testa v aparaturi	28
Podajanje rezultatov	29
Rezultati	33
Razprava	38
Sklepi – zaključek.....	40
Viri in literatura	41
KAZALO SLIK.....	43
KAZALO TABEL	43

Povzetek

Pri zdravljenju neplodnosti se poleg zdravljenja z zdravili in kirurškimi postopki, čedalje več uporabljajo tudi postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo. Da bi s temi postopki dosegli ali celo presegli stopnjo spontane zanositve pri plodnih parih, je potrebno postopke izpolnjevati in odkrivati nove načine za selekcijo najboljših gamet in zarodkov.

Z določitvijo koncentracije Anti-Mullerjevega (AMH) hormona v serumu lahko napovemo, katere ženske imajo primerno ovarijsko rezervo, da bodo z rastjo foliklov odgovorile na spodbujanje z gonadotropini. Malo pa je znanega, kako foliklova koncentracija AMH vpliva na razvoj jajčne celice, ki je potem primerna za oploditev in razvoj zarodkov. Predvidevamo, da so višje vrednosti AMH v foliklovi tekočini pozitivno povezane s kvaliteto jajčnih celic, implantacijo in višjo stopnjo kliničnih nosečnosti v postopku zunajtelesne oploditve.

V raziskavo smo vključili 58 neplodnih žensk, vključenih v postopke zunajtelesne oploditve (in vitro fertilizacijo (IVF)). Pri polovici žensk smo izvedli IVF postopek v spontanah menstruacijskih ciklih, pri drugi polovici pa v ciklih kontrolirane hiperstimulacije jajčnikov z uporabo antagonistov gonadoliberinov (GnRH) in gonadotropinov. V raziskavo smo vključili ženske s tubarnim vzrokom neplodnosti.

Za določitev koncentracije AMH v serumu in foliklovi tekočini smo uporabili encimsko – imunski test ELISA.

Namen raziskave je bilo ugotoviti, kako sinteza AMH v granuloznih celicah folikla v spontanem in spodbujenem menstruacijskem ciklusu vpliva na kvaliteto jajčnih celic in posledično na oploditev in razvoj zarodkov. Prav tako nas je zanimalo, ali je bila izbrana laboratorijska metoda primerna za določitev serumskih in foliklovih koncentracij AMH.

Z raziskavo smo potrdili, da je tako serumska kot foliklova koncentracija AMH različna pri ženskah v spontanah ciklih v primerjavi s spodbujenimi cikli.

Z laboratorijskega vidika rezultati kažejo, da je metoda ELISA dovolj zanesljiva in primerna za določanje koncentracije AMH tako v foliklovih tekočinah kot tudi v serumu.

Summary

For the treatment of infertility in addition to treatment with drugs and surgical procedures, more and more are used procedures with biomedical assistance. To achieve, or even exceed the rate of spontaneous conception in the fertile pairs, it is necessary to comply with the procedures and identify new ways for the best selection of gametes and embryos.

By setting the concentration of Anti-Mullerian hormone (AMH) in the serum can be declared, which women have an adequate ovarian reserve that the growth of follicles respond to the promotion of gonadotrophins. Little is known how the follicular concentration of AMH affect the development of the oocytes, which are then suitable for fertilization and embryo development. It is known that the higher levels of AMH in follicles fluid positively correlate to the quality of oocytes, implantation and on higher pregnancy rate in the process of in vitro fertilization.

In the study we included 58 infertile women included in the procedures of in vitro fertilization . In half of women, we performed IVF procedure in natural cycles, in the second half in the cycles of controlled ovarian hyperstimulation with the use of gonadotrophin-releasing hormone antagonist and (GnRH) and gonadotrophins. In the survey we included women with tubal factor of infertility.

To determine the serum concentrations of AMH in follicles, we used the enzyme - immunoassay ELISA, which has proven to be a suitable method for use in diagnostic purposes.

The aim of the study was to determine, how the synthesis of AMH in granulosa follicles cells in spontaneous and stimulated cycle effects on the quality of oocytes and, consequently on the fertilization and embryo development. Also, we wondered whether the selected laboratory method for determining the appropriate serum concentrations of AMH in follicles.

In this study we confirmed that the serum and follicular AMH concentrations were different comparing natural and stimulated cycles. Laboratory data show that ELISA is an appropriate method for the analysis of follicular AMH as well as serum AMH.

Seznam okrajšav

OBMP – oploditev z biomedicinsko pomočjo

IVF-ET – zunajtelesna oploditev s prenosom zarodka

FSH – folikle stimulirajoči hormon

rFSH – rekombinantni FSH

LH – luteinizirajoči hormon

PRL – prolaktin

HCG – humani horiontski gonadotropin

GnRH – gonadotropin sproščujoči hormon, gonadoliberin

HMG – humani menopavzni gonadotropin

E2 – estradiol

AMH – anti-Mullerjev hormon

ICSI – postopek neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice

UZ – ultrazvok

COH – nadzorovana hiperstimulacija jajčnikov

NC – naravni cikel

Ab1 – primarno protitelo

Ab2 – sekundarno protitelo

Uvod

Neplodnost in postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo

O neplodnosti govorimo, kadar ženska ne zanosi po enem letu rednih spolnih odnosov (dva- do trikrat tedensko) brez uporabe kontracepcije, pri starejših parih pa se preiskave neplodnosti lahko začnejo tudi prej (po pol leta). Približno 30 odstotkov vzrokov za neplodnost lahko poiščemo pri ženskah, 30 odstotkov pri moških, 25 odstotkov pri obeh, pri 15 odstotkih parov pa vzroka ne moremo ugotoviti. **(1)**

Verjetnost, da bo ploden par spočel otroka po naravni poti je v naravnem ciklusu 25%. V idealnih pogojih le okoli 80% plodnih parov spočne otroka v enem letu. V primeru, ko je plodnost zmanjšana pri ženi, možu ali obeh, pa je ta doba lahko zelo dolga, ali pa je spočetje brez medicinske pomoči nemogoče. Neplodnost ali zmanjšana plodnost je pogost pojav, saj eden od desetih parov ne uspe spočeti otroka v željnem obdobju. Današnje medicinsko znanje omogoča uspešno terapijo neplodnosti pri 60% do 70% neplodnih parov. Spodbuden je podatek, da iz skupine neplodnih parov, pri katerih ni mogoče ugotoviti vzroka, pozneje spontano zanosi kar 50 odstotkov žensk, kar morda vsaj delno potrjuje dejstvo, da je neplodnost lahko tudi psihološkega izvora. **(2)**

Zunajtelesna oploditev je eden izmed najpomembnejših postopkov oploditev z biomedicinsko pomočjo. Pod izrazom oploditev z biomedicinsko pomočjo razumemo različne postopke zdravljenja neplodnosti. Mednje štejemo:

- intrauterino inseminacijo IUI
- zunajtelesno oploditev s prenosom zarodka (IVF-ET).

NEPLODNOST PRI ŽENSKI

Možnost za zanositev in rojstvo živega otroka je podana, če pri ženski v rodnem obdobju delujejo vsi organi in organski sistemi, ki so udeleženi v tem procesu. Notranja in zunanja spolovila morajo biti normalno razvita in normalno delujoča. Hipotalamusni faktorji, še posebno luteinizirajoči

hormon sproščujoči hormoni in dopamin, regulirajo sekrecijo žlez za hormone FSH, LH in prolaktin. Ti hormoni regulirajo celotno delovanje jajčnika, skupaj z ravnimi faktorji.

GLAVNI VZROKI NEPLODNOSTI

Oviro za normalno nosečnost predstavljajo organske napake in motnje:

- **Neprehodni ali odstranjeni jajcevodni** (ker se oploditev jajčne celice s semenčico dogodi v jajcevodu, pomeni takšna motnja vzrok za neplodnost)
- **Endometrioza** (materična sluznica je prisotna in delujoča zunaj maternice, na jajcevodih, po trebušni votlini in na jajčnikih. Endometrioza zmanjšuje verjetnost zanositve zaradi mehanskih ali imunskih zaprek.)
- **Neppravilno oblikovana ali pregrajena maternica** (ta razvojna ali pridobljena napaka maternice lahko omogoči zanositev, je pa pogosto vzrok za spontane splave ali prezgodnje porode.)
- **Vnetje materične sluznice** (zaradi sprememb v sestavi sluznice ugnezditev oplojene jajčne celice ni mogoča.)
- **Neppravilno delovanje jajčnika** (ena izmed najtežjih in najpogostejših motenj so policistični jajčniki (PCO). Motnje v dozorevanju jajčnih celic, ki so značilne za PCO, onemogočajo sprostitve jajčnih celic. Hujše oblike motenj v delovanju jajčnikov predstavljajo bolezni, pri katerih v jajčniku ne dozorevajo jajčne celice ali pa jih sploh ni. Posredno v jajčniku ne dozorevajo celice tudi takrat, kadar se v hipofizi izloča preveč hormona prolaktina.
- **Imunski vzroki** (povezani so z nastajanjem protiteles v organizmu, ki onemogočajo gibanje semenčic ali prodor semenčice skozi ovojnico jajčne celice. Lahko gre za protitelesa proti semenčicam ali proti jajčni celici.)
- **Psihološki vzroki** (velika psihična napetost, stresni dogodki in travme, čustveni pretresi preko osrednjega živčevja povzročijo neuravnovešeno delovanje jajčnikov in tako povzročijo tudi izostanek ovulacije. Pri zdravljenju neplodnega para je zato koristno sodelovanje psihologa.)
- **Nezdrav način življenja** (kajenje, prekomerno uživanje alkohola, zdravil in mamil)

DIAGNOSTIKA

Preiskave v zvezi z neplodnostjo začnemo, kadar do nosečnosti ne pride po enem letu rednih spolnih odnosih (2- do 3- krat tedensko) brez uporabe kontracepcije. Pri neplodnem paru tedaj opravimo preiskave, ki nam omogočajo oceniti, ali pride do odlaganja semenčic v nožnico, ali so semenčice sposobne potovanja po maternici in jajcevodih, ali nastajajo v jajčniku jajčne celice, ali so sposobne, da se oplodijo, ali le-te lahko, ko so že oplojene potujejo v maternico in se tam ugnezdijo. Pri ženski je potrebno oceniti delovanje jajčnikov in prehodnost jajcevodov, ugotoviti moramo tudi kakšna je oblika maternične votline in maternice. Oceno stanja nam omogočajo merjenje bazalne temperature, rentgensko slikanje maternice in jajcevodov, pregled notranjosti maternice (histeroskopija) in pregled ter ocena oblike in prehodnosti jajcevodov ter položaj in izgled jajčnikov (laparoskopija). Dodatne informacije dobimo tudi z merjenjem količine spolnih in drugih hormonov v krvi.

ZDRAVLJENJE

Na temelju ugotovljenih vzrokov uvedemo zdravljenje, ki lahko obsega zdravljenje s hormoni, pogosto pa je treba opraviti kirurške posege na jajcevodih, jajčnikih ali maternici pri ženski in kirurške posege na semenovodih ali modih pri moških. Če so vse te metode zdravljenja neuspešne, se odločimo za postopke OBMP, med katerimi najpogosteje opravljamo zunajtelesno oploditev. **(1)**

NEPLODNOST PRI MOŠKEM

V primeru moške neplodnosti (slaba kakovost semena, semenčice iz mod ali nadmodka) ali predhodno neuspešnih poskusov postopkov IVF, izvedemo *neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice (postopek ICSI- IntraCytoplasmic Sperm Injection)*. Ta postopek lahko imenujemo tudi mikromanipulacija. Odločitev za ICSI temelji na:

1. številu in kakovosti semenčic
2. predhodno neuspešnih postopkih
3. starosti pacientke in obdobje neplodnosti
4. številu in kakovosti jajčnih celic **(2)**

OPIS ZUNAJTELESNE OPLODITVE

Pri ženski se med normalnim menstruacijskim ciklusom razvije in dozori ena sama spolna celica – *jajčna celica*. Tudi z jajčno celico, ki se razvije v naravnem ciklusu, lahko izvedemo postopek zunajtelesne oploditve, vendar običajno vzpodbudimo jajčnike bolnice s hormoni, da pridobimo več jajčnih celic, tako ima par veliko več možnosti, da pride do zanositve.

Za razliko od ženske je v semenu zdravega moškega ogromno spolnih celic (od 20 milijonov do več 100 milijonov *spermijev*). V naravnih razmerah je le peščica spermijev sposobna oploditve, v postopku zunajtelesne oploditve pa se srečujemo z bolniki, ki imajo zelo malo spermijev. Tako kot v naravi, je tudi *in vitro*, za nastanek novega živega bitja potrebna združitev jajčne celice in spermija v laboratoriju. Ustvarimo razmere za oploditev, vendar sama oploditev poteka povsem naravno; razvoj zarodka samo spremljamo in mu zagotovimo najboljše razmere. **(3)**

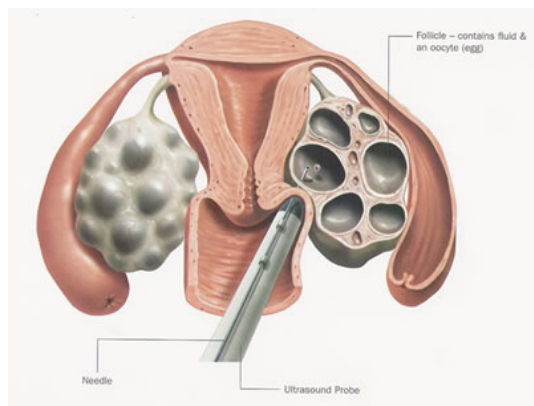
Uspešnost te metode je odvisna od mnogih dejavnikov in je za vsak par individualna, nadvse pomembna pa sta ženina in moževa sposobnost, da v spolnih žlezah tvorijo spolne celice (jajčne celice in semenčice), ki jih lahko uporabimo za oploditev zunaj telesa. **(4)** Če hočemo povečati uspešnost, moramo spodbuditi zorenje več jajčnih celic, zato v prvi fazi postopka ženske dobivajo hormonsko terapijo v obliki injekcij. Pri odločitvi za postopek zunajtelesne oploditve je potrebno upoštevati poleg ginekoloških obolenj in nepravilnosti rodil tudi zdravstveno stanje bolnice in njeno starost. Zgornja starostna meja za uvrstitev v postopek je dopolnjenih 42 let pri ženski. Ves postopek je fizično in psihično zahteven, tudi precej zapleten in je zato potrebno v vseh fazah postopka tesno sodelovanje para, ki je vključen v postopek oploditve zunaj telesa.

KLINIČNA PRIPRAVA NA POSTOPEK ZUNAJTELESNE OPLODITVE s prenosom zarodka (IVF-ET)

Postopek zunajtelesne oploditve se prične s pripravo ženske s *hormonskim vzpodbujanjem jajčnikov z gonadotropini*, da v jajčniku dozori več foliklov in jajčnih celic hkrati. Postopek zunajtelesne oploditve lahko poteka tudi v naravnem ciklusu – na jajčni celici, ki se v foliklu razvije naravno, brez dodajanja hormonov. (5)

Rast in zorenje foliklov ginekolog spremlja ultrazvočno z ugotavljanjem velikosti foliklov in z določanjem ravni hormonov v krvi.

Ko so folikli dovolj veliki, po zorenju jajčnih celic s humanim horionskim gonadotropinom sledi *aspiracija* foliklov (Slika 1) pod nadzorom ultrazvoka, ki jo izvede ginekolog. V laboratoriju za zunajtelesno oploditev klinični embriolog (biolog) v foliklovi tekočini pod stereomikroskopom poišče jajčne celice. V povprečju pri bolnicah izsrkamo 8 jajčnih celic. Več je jajčnih celic, večja je verjetnost, da bo postopek zunajtelesne oploditve uspel. V naravnem ciklusu običajno najdemo 1 jajčno celico. (7)

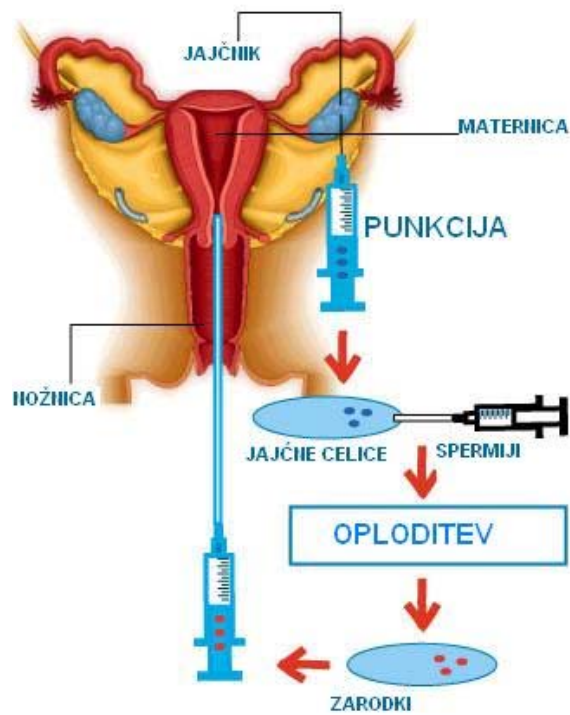


Slika 1

- Izsrkvanje foliklove tekočine (v kateri se nahaja jajčna celica) pod kontrolo ultrazvoka.

Po pridobitvi jajčnih celic *pripravimo seme partnerja* in izvedemo postopek zunajtelesne oploditve. Seme pripravimo na različne načine: očistimo ga in selekcioniramo najbolj kakovostne spermije za oploditev. Če v semenskem izlivu ni spermijev, za postopek uporabimo spermije iz mod in nadmodka.

V bistvu gre pri zunajtelesni oploditvi za posnemanje dogajanj v jajcevodu, za njegovo nadomestilo. (6)



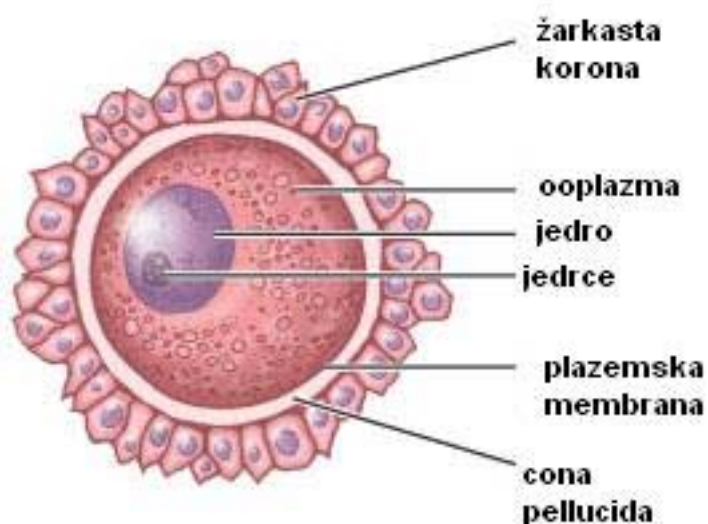
Slika 2
- Slikovni prikaz postopka IVF - ET

JAJČNA CELICA

Jajčna celica (Slika 3) je ženska haploidna spolna celica (gameta) in spada med največje celice v telesu, vidna je s prostim očesom, saj njen premer meri 110 do 115 μm . Nastane v procesu oogeneze v ženskih spolnih žlezah. Vsebuje celoten dedni material, ki se prenese na potomca s strani matere.

Vsebino jajčne celice predstavlja citoplazma (ooplazma) z jedrom (dedni material) in celičnimi organeli, nosilci celičnega življenja. Ooplazma je obdana s celično membrano, preko katere se boči glikoproteinska ovojnica – steklasta kožica jajčnikovega folikla z receptorji za vezavo spermija, imenovana cona pelucida. Okrog jajčne celice se širi masa foliklovih celic, imenovana kumulus (cumulus oophorus).

Jajčne celice se razvija v posebnem mehurčku (foliklu) v jajčniku, v procesu, imenovanem oogeneza. (1)



Slika 3
- Zgradba jajčne celice

Vsaka jajčne celica je nastala že v fetalnem obdobju življenja ženske in dolga leta mirovala v nezrelem foliklu, vse dokler folikel ni bil izbran med množico drugih foliklov in pričel rasti. S tem je pričela rasti in dozorevati tudi jajčna celica. Vse dogajanje skrbno nadzorujejo hormoni, ki delujejo na celice folikla, posredno pa tudi na jajčno celico. Med rastjo in dozorevanjem jajčne celice so se dogajale številne spremembe, med drugim se je okrog jajčne celice razvila cona pellucida s posebnimi receptorskimi mesti, na katera se ob oploditvi veže spermij. Med razvojem je jajčna celica odvisna od ostalih celic v foliklu, predvsem od celic zrnatega sklada jajčnikovega folikla – granulose. Med razvojem in dozorevanjem se v jajčni celici dedni material in biosintezni sistem pripravljata na morebitni kasnejši razvoj zarodka.

Večina jajčnih celic, ki jih pridobimo v postopku zunajtelesne oploditve, je normalno zrelih, približno 12 % jajčnih celic pa je nezrelih ali začenja propadati in se razgrajevati. (5)

Normalno zrele in oploditve sposobne jajčne celice v postopku zunajtelesne oploditve

Zrela, oploditve sposobna jajčna celica še nima zaključene zoritvene delitve – meioze. Meioza je proces, v katerem se v spolni celici reducira število kromosomov in nastane enojni (haploidni) set kromosomov za razliko od preostalih celic telesa, ki imajo dvojni (diploidni) set kromosomov. V zreli jajčni celici je meioza zaustavljena v metafazi II druge meiotске delitve, ki se zaključi šele po oploditvi jajčne celice s spermijem.

Zrelo (metafaza II), oploditve sposobno jajčno celico (Slika 4) prepoznamo po polarnemu telescu na površini celice, ki je v bistvu majhna in nefunkcionalna spolna celica. Polarno telesce je običajno okroglo.

Zrelost lahko ocenjujemo tudi po videzu kumulusa.



Slika 4

- Zrele jajčne celice z opaznim mehurčkom – polarnim telescem v postopku zunajtelesne oploditve

Zrelost jajčne celice vključuje tako zrelost jedra, kot tudi zrelost citoplazme. V zreli (metafaza II) jajčni celici lahko včasih opazimo tudi nepravilnosti, kot sta fragmentirano polarno telesce in ponekod ali po vsej celici grobo zrnata ali nehomogena citoplazma.

SEMENČICA

Morfologija semenčic močno vpliva na njihovo oploditveno sposobnost, zato zahteva natančno analizo. Skrbna ocena morfologije semenčic zahteva upoštevanje natančno določenega merila prepoznavanja morfološko normalnih oblik semenčic in razlikovanje le-teh od različnih nepravilnih oblik, ki so tudi prisotne v semenskem izlivu. Morfološke analize semena izvajamo z uporabo svetlobnega mikroskopa pri 1000-kratni povečavi (razmaz fiksiramo in obarvamo po tehniki Papanicolaou).

Spermij nastane v modu, natančneje v semenski cevki v procesu, imenovanem spermatogeneza. Na poti skozi genitalni trakt spermij dozori in pridobi funkcijo gibanja.

Normalen, zrel spermij je sestavljen iz ovalne glave, ki vsebuje jedro z genetskim materialom in poseben mehurček – akrosom z encimi, potrebnimi za oploditev (predvsem za razgradnjo cone pelucide jajčne celice), vratu, sprednjega dela in dolgega repa, ki ji omogoča gibanje. V srednjem delu spermija je veliko mitohondrijev, ki so središče celičnega dihanja, nastala kemična energija pa se uporabi predvsem za aktivno gibanje spermija. Po kriterijih Svetovne zdravstvene

organizacije (1999) je normalna dolžina glave spermija 4 do 5 μm , širina glave 2,5 do 3,5 μm in dolžina repa 45 μm , akrosom pa zavzema 40 do 70 % glave.

Vsak spermij ima svoje lastne individualne značilnosti – lastno obliko (morfologijo) in način gibanja. Glede na kriterije Svetovne zdravstvene organizacije je v semenu zdravega moškega 20 milijonov do več kot 100 milijonov spermijev na mililiter. Pri zdravem moškem ima vsaj 14 % spermijev normalno obliko in je vsaj 50 % spermijev napredujoče gibljivih. Pri približno dveh tretjinah moških v postopku zunajtelesne oploditve opazimo slabšo kakovost semena. **(1)**

OPLODITEV, ZRELOST IN GENTSKE NEPRAVILNOSTI GAMET

V postopku zunajtelesne oploditve se ne oplodijo vse inseminirane ali mikroinjicirane jajčne celice. Najpomembnejša vidika oploditvene sposobnosti gamet sta njihova zrelost in genetska normalnost.

V postopku zunajtelesne oploditve je približno 30 % neoplojenih jajčnih celic v času interakcije s semenčico nezrelih (profaza I ali metafaza I).

Pomembna je tudi zrelost semenčic. Nezrele semenčice imajo nepravilnosti kromatina – nepravilni nukleoproteinski vzorec (histoni namesto protaminov, nepravilni promatinski vzorec) in porušeno integriteto DNK (enovijačna DNK, fragmentirana DNK). To zmanjšuje njihovo oploditveno sposobnost. **(1)**

OPLOJENA JAJČNA CELICA

Proces oploditve je eden izmed najbolj kompleksnih in zahtevnih procesov v naravi, saj se ustvari zametek novega živega bitja oziroma življenja.

Ob klasičnem postopku zunajtelesne oploditve moramo vsaki jajčni celici dodati približno 25 000 gibljivih spermijev (inseminacija). Tako kot v naravi, mora spermij v gojišču preiti več sprememb, da lahko oplodi jajčno celico, saj takoj po ejakulaciji spermiji niso sposobni

oploditve. Pomembna je kapacitacija, ki vključuje spremembe gibanja spermija in biokemične ter strukturne spremembe na površini spermija (sprostitvev mest za vezavo na cono pellucidi jajčne celice), nato se spermij veže na receptor ZP3 na cono pellucidi jajčne celice. To se zgodi eno uro do tri ure po inseminaciji. Prične se akrosomska reakcija spermija. Iz mehurčka na sprednji strani glave (akrosoma) se sprostijo različni hidrolitični encimi (hialuronidaza, akrozin, proakrozin, fosfataza, kolagenaza...), s pomočjo katerih spermij prodre v 2 do 15 minutah skozi cono pellucido jajčne celice, citoplazma jajčne celice pa oblije glavo spermija. Pride do zlitja membrane spermija in jajčne celice, proces združitve pa je odvisen predvsem od temperature, pH in kalcija Ca^{2+} . Spermij se popolnoma inkorporira v citoplazmo jajčne celice v približno 15 minutah. Klasični postopek zunajtelesne oploditve vključuje vse te naravne spremembe, medtem ko jih z metodo ICSI obidemo.

Spermij med oploditvijo (tudi po metodi ICSI) s še neznano substanco aktivira jajčno celico. Ob vezavi spermija na cono pellucido se sprožijo mehanizmi (vezani na G-protein v membrani), v katerih je prenašalec znotraj jajčne celice inozitol trifosfat (IP3). Aktivacijo jajčne celice prepoznamo po sproščanju kalcija iz celičnega organela – endoplazmatskega retikuluma, kar se odraža v nihajočih povečanjih koncentracije kalcija v jajčni celici, sproščanje pa sproži IP3. Drugi pomembni pokazatelj aktivacije jajčne celice pa je kortikalna reakcija. Pod membrano jajčne celice se naberejo majhni, z encimi in proteoglikani napolnjeni vezikli (mehurčki), imenovani kortikalni granuli. Ti povzročijo strukturne spremembe membrane in s tem okrepijo membrano in cono pellucido. Namen tega je drugim spermijem preprečiti oploditev in zaščititi oplojeno jajčno celico in razvijajoči se zarodek.

Jedro spermija v citoplazmi jajčne celice se razpusti in oblikuje se novo jedro (pronukleus) v približno 1 uri, med tem se izoblikuje tudi pronukleus jajčne celice. Spermij nosi s seboj centriol, ki omogoča potovanje moškega pronukleusa proti ženskemu pronukleusu, kasneje pa zagotavlja pola delitvenega vretena za prvo celično delitev zigote, saj jajčna celica nima centriola. Preostala dela spermija, sprednji del in rep se popolnoma razgradita, nastale substance pa se uporabijo med razvojem zigote oziroma zarodka.

V oplojeni jajčni celici torej opazimo 2 prehodni jedri (pronukleusa), en (očetov) pronukleus vsebuje dedno maso (genetski material) spermija, drugi (materin) pronukleus pa dedno maso jajčne celice. Govorimo o oplojeni jajčni celici ali zigoti. Po oploditvi se zaključi mejoza jajčne celice in na površini jajčne celice se sprosti druga majhna celica – polarno telesce. Oplojeno jajčno celico torej prepoznamo po 2 pronukleusih in 2 polarnih telescih.

Že v času tvorbe pronukleusov se tvorijo informacijske ribonukleiske kisline (mRNK), ki jih nastajoč zarodek potrebuje za hiter razvoj. V moškem pronukleusu so aktivirani določeni geni, predvsem gena na kromosomu Y – ZFY in SRY, prepise teh genov najdemo tudi v dvoceličnem zarodku pred aktivacijo embrionalnega genoma.

Sledi zlitje obeh pronukleusov, čemur pravimo singamija, pride do združitve materinega in očetovega dednega materiala. Oplojena jajčna celica se prične deliti in nastaja zarodek. Ker ima tako spermij kot jajčna celica enojno število kromosomov, ima vsaka celica zarodka dvojno število kromosomov. Vsak kromosom se pojavlja v paru (homologna kromosoma), en kromosom izvira od matere in drugi od očeta. Kljub enakosti kromosomov se geni na kromosomih lahko izrazijo različno na podlagi molekularnih mehanizmov – vtisnjenja (imprintinga). Kmalu po singamiji se prične prva celična delitev (mitoza) in razvijati se prične zarodek. (3)

Morfologija oplojene jajčne celice

Morfologija in lega pronukleusov je zelo pomembna, poleg tega pa je pomembno tudi število in razporeditev nukleolusov (jedrc) v pronukleusih (Slika 5). Vsi ti dejavniki so povezani z genetskim statusom zarodka, ki se razvija in vplivajo na razvoj zarodka do blastociste in njegovo ugnezditev.

V notranjosti zarodka se začne centralno tvoriti medcelična votlina, napolnjena s tekočino, to votlino imenujemo blastocel. Ta je na zunanji strani obdan z eno samo plastjo celic, ki tvori trofoblast, na notranji strani pa iz več slojev celic, imenovanih embrioblast. V nadaljnjem razvoju po ugnezditvi blastociste v maternici trofoblast sodeluje pri razvoju posteljice, embrioblast pa pri razvoju zarodka oziroma ploda. V razvojnem obdobju blastociste se zona pellucida odebeli, zaradi kopičenja tekočine v blastocelu pa volumen blastociste naraste. V tekočino blastocela se sproščajo proteini, ki se na novo tvorijo v celicah trofoblasta in embrioblasta, pravimo, da je

blastocista razvita (ekspandirana). Sledi izluščenje blastociste, ki ga opazimo tudi v pogojih in vitro, pri čemer citoplazma začne izstopati iz ovoja zone pellucide. Taka blastocista se lahko hitro ugnezdi v maternici. **(3)**



Slika 5

- *Oplojena jajčna celica normalne velikost* (pronukleusa ležita centralno, sta enako velika s približno enako velikimi nukleusi, ki so nameščeni vzporedno).

Ocena kakovosti zarodkov

Dva dni po ultrazvočni aspiraciji foliklov in inseminaciji jajčnih celic ali izvedbi postopka ICSI zjutraj pod stereomikroskopom pogledamo, ali so se iz oplojenih jajčnih celic razvili zarodki, in ocenimo kakovost zarodkov. Najpomembnejše merilo kakovosti zarodkov je morfologija zarodkov. Kakovost zarodkov ocenimo glede na delež fragmentacije in obliko celic – blastomer.

Kakovost zarodkov lahko ocenimo po različnih merilih (po Boltonu):

Kakovost 4 (IV): zelo dobra kakovost zarodka; blastomere so pravilno oblikovane, okrogle, med seboj enake, ni fragmentacij ali je fragmentacij zelo malo (do 10 % volumna).

Kakovost 3 (III): povprečna kakovost zarodka; blastomere so pravilno oblikovane, okrogle, med seboj enake, z nekoliko fragmentacijami (11 do 30 % volumna).

Kakovost 2 (II): slaba kakovost zarodka; blastomere so nepravilno oblikovane, niso okrogle in niso med seboj enake, z več fragmentacijami (31 do 50 % volumna).

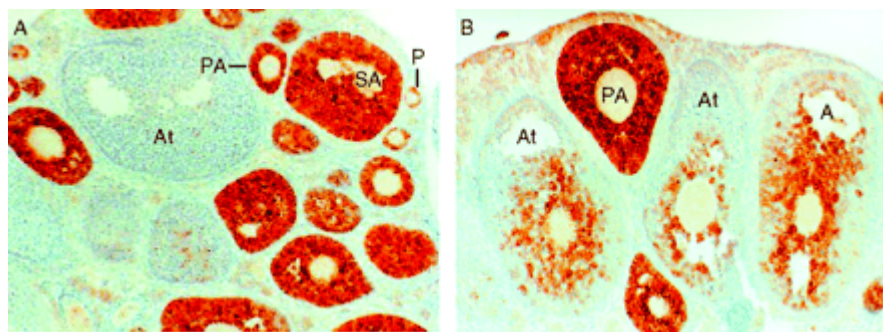
Kakovost 1 (I): zelo slaba kakovost zarodka; blastomere so zelo slabo vidne, težko določimo njihovo obliko, z veliko fragmentacij (več kot 50 % volumna), ki lahko zapolnjuje praktično ves volumen zarodka. (1)

Sinteza AMH (Anti-Mullerian hormone) v granuloznih celicah

AMH (Anti-Mullerjev hormon), poznan tudi kot Mullerjeva zaviralna spojina (Mullerian Inhibiting Substance – MIS) oziroma Anti-Mullerjeva zaviralna snov (Anti-Mullerian Inhibition Substance – AMH) je bil v glavnem raziskan zaradi svoje regulatorne vloge v moški spolni diferenciaciji. (7) Pri ženskah se AMH tvori v granuloznih celicah folikla.

Podrobne študije pri glodalcih so pokazale, da se AMH prične sintetizirati v granuloznih celicah primordialnih foliklov takoj po diferenciaciji pregranuloznih celic primordialnih foliklov. Do največje sinteze AMH pride v preantralnih granuloznih celicah in majhnih antralnih foliklih, ter se postopno zmanjšuje v poznejših fazah razvoja folikla (Slika 6). AMH ni več izražen v končnih fazah rasti folikla, ki so odvisne od FSH.

Prav tako ni AMH v atretičnih foliklih.



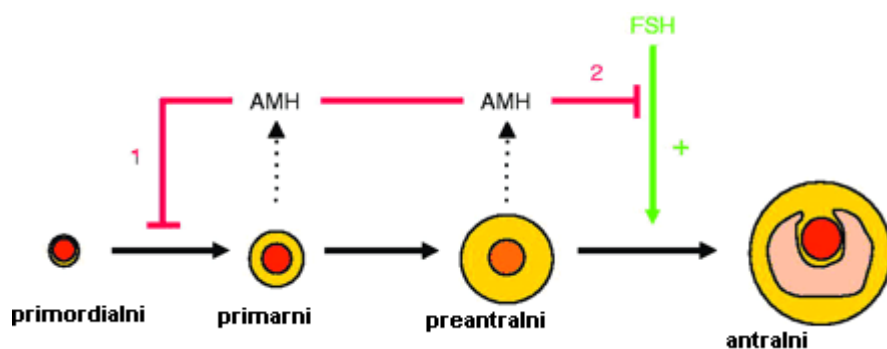
Slika 6

- Izražanje AMH v jajčnikih miške.

Slika (A): AMH je izražen v granuloznih celicah primarnih (P), preantralnih (PA) in majhnih antralnih (SA) foliklih.

Slika (B): Izražanje AMH izgine v antralnih (A) in atretičnih (At) foliklih.

Dosedanje raziskave so bile opravljene predvsem na glodalcih, vendar pa so rezultati teh raziskav primerljivi s človeškimi parametri (jajčniki). Pri ženskah lahko izražanje AMH najprej opazimo v granuloznih celicah primarnih foliklov, stopnja izražanja pa je največja v preantralnih in majhnih antralnih foliklih (≤ 4 mm). Izražanje AMH izgine s povečanjem velikosti folikla in je skoraj izgubljen v foliklih, ki so večji od 8 mm, vidi se le kot madež, ki je omejen okoli granuloznih celic (kumulus). (8)



Slika 7

- Model aktivacije AMH v jajčniku:
Prikazane so faze folikulogeneze (nastajanje foliklov v jajčniku).

AMH proizvajajo majhni rastoči folikli (primarni in preantralni) v postnatalnih jajčnikih in ima dve mesti delovanja :

- preprečuje rekrutiranje primordijalnih foliklov (1)
- znižuje odzivnost rastočih foliklov na FSH (2)

AMH je glikoproteinski dimer, sestavljen iz dveh monomerskih členov povezanih z disulfidnimi vezmi. (15) Gen, ki kodira MIS/AMH je lociran na krajšem kraku kromosoma 19, struktura specifičnega receptorja za MIS/AMH je bila izolirana in karakterizirana.

AMH proizvajajo celice granuloze v jajčnikih in spada v skupino transformirajočih rastnih faktorjev. (16) AMH preprečuje rekrutiranje primordijalnih foliklov v skupino rastočih foliklov in znižuje odzivnost rastočih foliklov na FSH (Slika 7). Ugotovljeno je bilo, da je AMH dober pokazatelj ovarijske rezerve in ga lahko uporabljamo tudi za napovedovanje odziva jajčnikov na kontrolirano hiperstimulacijo. V nedavno objavljeni raziskavi so ugotovili, da so višje vrednosti

AMH v folikularni tekočini pozitivno povezane z implantacijo in višjo stopnjo kliničnih nosečnosti po postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo. (17)

AMH kot pokazatelj staranja jajčnikov

Zmanjšanje števila antralnih foliklov je odraz staranja jajčnikov. Število antralnih foliklov preštejemo s pomočjo ultrazvočne preiskave 3. do 5. dan menstruacijskega ciklusa.

S starostjo se zmanjšuje število antralnih foliklov v katerih se sintetizirajo visoke koncentracije AMH, ker s starostjo teh foliklov ni ali pa jih je zelo malo, nemorejo prispevati k serumski koncentraciji AMH, torej je nizka koncentracija AMH dober pokazatelj za zmanjšanje ovarijske rezerve in posledično zmanjšano odzivnost na stimulacijo z gonadotropini. (14)

Metode za določanje AMH (Anti-Mullerian hormone)

Encimskoimunski test, encimski imunski test ali ELISA (angleško: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je biokemijska metoda, ki se uporablja v imunologiji za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici (Slika 8). Za določanje protiteles se uporablja indirektna ELISA. Direktna ali sendvič ELISA pa je prirejena za določanje antigenov. Pri obeh načinih ELISE je na zadnje dodano protitelo vezan encim (od tu izhaja ime metode), ki omogoči spremembo barve substrata in tako detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. Ker jo lahko uporabljamo za detekcijo tako protiteles, kot tudi antigenov v vzorcu, je primerna za določanje protiteles na različne viruse (HIV test) ali za določanje prisotnosti antigenov v serumu. (10)



Slika 8

- Nanos reagenta na mikrotitrsko ploščico (ELISA test)

Princip ELISA testa

Načelo encimsko imunskega testa, imenovanega ELISA, je podobno načelu tehnike RIA z razliko, da tu uporabimo encim namesto radioaktivne oznake. Encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Pri ELISA uporabljamo različne encime, npr. alkalno fosfatazo, peroksidazo in p-nitrofenil fosfatazo. Če te encime pomešamo s primernim substratom, dajo obarvan reakcijski produkt. Testi ELISA so približno enako občutljivi kot RIA in imajo prednost, da so varnejši in cenejši.

Razvili so številne variante ELISA, s katerimi lahko kvalitativno in kvantitativno določamo protitelesa in antigene. Pripravimo umeritveno krivuljo, iz katere lahko razberemo neznano koncentracijo v vzorcu. Količino konjugiranih antiimunoglobulinov določimo s stopnjo razgradnje substrata, ki je obarvan in s spektrofotometrom merimo absorbanco, ki je sorazmerna s koncentracijo preiskovanega analita. Z ELISA metodo poleg protiteles, direktno ali kompetitivno, določamo tudi antigene.

Določevanje antigena

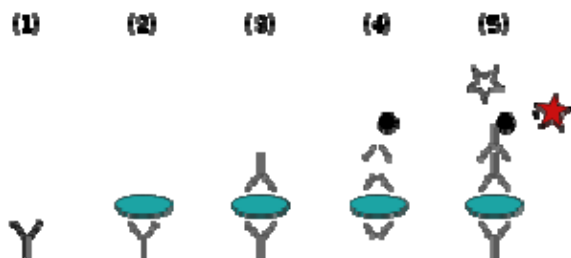
Antigene, ki imajo več epitopov, lahko določamo kvantitativno s sendvič ELISA (slika 9). Pri tej tehniki imobiliziramo v mikrotitrski jamici protitelo, dodamo vzorec, ki vsebuje antigen in pustimo, da reagira z vezanimi protitelesi. Ko speremo jamico, da odstranimo nevezane antigene, dodamo drugo z encimom vezano protitelo, specifično za drug epitop na antigenu in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. Ko s spiranjem odstranimo prosto drugo protitelo, dodamo substrat in izmerimo obarvan produkt reakcije.

Direktna (sendvič) ELISA

Osnovni koraki:

1. Na trdni nosilec vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo.
2. Dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovan antigen.
3. Speremo nosilec, da odstranimo nevezane antigene.
4. Dodamo protitelesa specifična na vezan antigen, ki so označena z encimom.
5. Speremo ploščo, da odstranimo nevezana protitelesa.
6. Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
7. Detektiramo intenzivnost barve.

Slika 9 vsebuje še dodaten korak. Po vezavi preiskovanega antigena, dodamo detekcijsko protitelo. Šele nato dodamo z encimom označeno protitelo na detekcijsko protitelo. Takšna protitelesa se vežejo na Fc-regije drugih protiteles. Na ta način se izognemo zamudnemu postopku konjugacije protiteles z encimom, za vsak posamezen antigen, ki ga želimo določiti.



Slika 9
- Direktna (sendvič) ELISA.

(1) Na površini plošče so vezana protitelesa; (2) dodamo vzorec in preiskovani antigen se veže na pritrjeno protitelo; (3) dodamo detekcijsko protitelo, ki se veže na vezan antigen; (4) dodamo encimsko označeno protitelo, ki se veže na detekcijsko protitelo; (5) dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima spremeni barvo.

Določevanje protiteles

Protitelesa lahko odkrijemo in kvantitativno določimo z indirektno metodo ELISA. Serum ali kak drugi vzorec, v katerem je primarno protitelo (Ab1), damo v mikrotitrsko jamico, prekrito z antigenom, in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. Ko speremo nevezana protitelesa, določimo vezana protitelesa z dodajanjem z encimom konjugiranega sekundarnega antiizotipskega protitelesa (Ab2), ki se veže s primarnim protitelesom. Prosta Ab2 speremo in dodamo substrat za encim. Obarvani produkt reakcije merimo v posebnem, v ta namen pripravljenem spektrofotometru za merjenje v mikrotitrskih ploščicah, ki lahko izmerijo absorbanco 96 jamic v manj kot eni minuti. Indirektno ELISA so izbrali za ugotavljanje serumskih protiteles proti človeškemu virusu imunske pomankljivosti (HIV), povzročitelju AIDS-a.

Indirektna ELISA

Se uporablja za detekcijo specifičnih protiteles v vzorcu. Osnovni koraki so:

1. Na trdni nosilec vežemo znan antigen.
2. Dodamo vzorec s preiskovanimi protitelesi, ki so ponavadi raztopljena v serumu druge živalske vrste, da se izognemo vezavi drugih nespecifičnih protiteles.
3. Speremo nevezana protitelesa.
4. Dodamo protitelesa označena z encimom, ki se vežejo na že vezana protitelesa.
5. Speremo nevezana označena protitelesa.
6. Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
7. Detektiramo barvo. **(11)**

Namen dela

V današnjem času predstavljajo vse večji problem bolezni, ki so se razvile zaradi načina življenja, ki ga živimo. V ta sklop spada tudi neplodnost, ki predstavlja vse večji problem sodobnega časa. Glede na napredek v zdravljenju pa neplodnost uspešno zdravimo tudi s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo.

1. V raziskavo smo vključili dve skupini neplodnih žensk, vključenih v postopke zunajtelesne oploditve. Pri prvi skupini žensk smo izvedli IVF postopek v spontanah menstruacijskih ciklih, pri drugi skupini pa v ciklih kontrolirane hiperstimulacije jajčnikov z uporabo antagonistov gonadoliberinov (GnRH) in gonadotropinov. Hormon, ki je bil predmet naše raziskave spada v skupino transformirajočih rastnih faktorjev, proizvajajo pa ga celice granulose v jajčnikih. Gre za Anti-Mullerjev hormon (AMH), za katerega smo želeli ugotoviti, kakšen vpliv so imela zdravila, ki so jih uporabljale ženske za stimulacijo ovulacije, na sintezo AMH v granuloznih celicah folikla.

V raziskavi smo torej želeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v serumski in foliklovi AMH koncentraciji med spontanimi in spodbujenimi cikli pri pacientkah v postopku zunajtelesne oploditve.

2. Na sam uspeh postopka IVF ima velik vpliv kvaliteta in število jajčnih celic, saj so le kvalitetne jajčne celice sposobne oploditve in posledično pripomorejo k razvoju kvalitetnih zarodkov. Zato smo v naši raziskavi hkrati želeli ugotoviti tudi vpliv AMH na kvaliteto jajčnih celic in zarodkov.

3. Za analizo koncentracij AMH smo uporabili encimsko imunsko test ELISA, ki temelji na reakciji antigen-protitelo, zato nas je zanimalo, ali je bila izbrana laboratorijska metoda primerna za določitev serumskih in foliklovih koncentracij AMH.

Eksperimentalni del

Osnovni potek eksperimentalnega dela

Klinični del eksperimentalnega dela smo opravili na Kliničnem oddelku za reprodukcijo Ginekološke klinike v Ljubljani, laboratorijske meritve pa v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

V raziskavo smo vključili 58 žensk, ki so bile v postopku zunajtelesne oploditve zaradi tubarnega faktorja neplodnosti. Pri 29-tih smo izvedli IVF postopek v spontanem ciklusu (NC), pri drugi polovici pa v ciklusih kontrolirane hiperstimulacije jajčnikov (COH).

Foliklove in serumske koncentracije AMH smo izmerili z encimsko imunskim testom ELISA.

Analizirali smo 188 foliklov in 152 jajčnih celic pri 58-tih ženskah., 24 jajčnih celic smo pridobili v NC skupini in 128 pri COH skupini.

Opis eksperimentalnega dela

Kontroliran stimulacijski protokol

NC skupina

Pri pacientkah v NC skupini smo deveti dan menstruacijskega ciklusa opravili ultrazvočno preiskavo in izmerili velikost vodilnega folikla. Istočasno smo pacientki odvzeli kri za določitev ravni serumskega E2 ter testirali vzorec urina za ugotavljanje vrha LH. Za določevanje E2 smo uporabili komercialno primeren kit (oestradiol-2: Sorin Biomedica, Saluggia, Italy), za LH pa kit (RapiTest LH: Morwell Diagnostics GmbH, Egg, Switzerland).

Ko je bila velikost vodilnega folikla ≥ 16 mm v premeru in pripadajoča serumska koncentracija E2 več kot 0,39 nmol/l brez porasta LH v urinu, smo pacientki subkutano injicirali 5000 IU HCG (human chorionic gonadotropin; Pregnyl; N.V. Organon, Oss, The Netherlands) za zorenje jajčne celice. Aspiracijo dominantnega folikla pod kontrolo ultrazvoka smo izvedli 31-32 h po injiciranju HCG. Vodenje postopka zunajtelesne oploditve v spontanem ciklusu smo izvedli po metodi, ki jo je uvedel Tomazevic et al. (1999).

COH skupina

V COH skupini smo 2.dan menstruacijskega ciklusa pričeli s subkutanim vnašanjem gonadotropin folitrophin alpha (Gonal F; Industria Farmaceutica Serono S.p.A, Bari, Italy) v odmerku 225 IU. Ko so dominantni folikli dosegli velikost 13 mm v premeru smo subkutano vnesli še GnRH antagonist cetrorelix acetate (Cetrotide; Asta Medica AG, Frankfurt, Germany). Ko so vodilni trije folikli dosegli ≥ 17 mm v premeru s pripadajočo serumsko koncentracijo $E2 \geq 0.40$ nmol/l na vsak dominanten folikel, smo injicirali 10 000 HCG (Pregnyl; N.V. Organon, Oss, The Netherlands). Aspiracijo foliklov pod kontrolo ultrazvoka smo izvedli 34-36 h po injiciranju HCG.

Pridobitev jajčnih celic in oploditev

Iz vsakega folikla smo posamično aspirirali foliklovo tekočino s pomočjo injekcijskega seta TIK (TIK d.d., Kobarid, Slovenia). Pri uporabi tega seta v sistemu ostane 1,5 ml foliklove tekočine. **(12)** Da smo se izognili mešanju foliklovih tekočin, smo rezidualni volumen oddelili v posebno označeno epruveto in ga nato dodali aspiriranem foliklu. V foliklovih tekočinah smo nato takoj izolirali jajčne celice, izmerili volumne foliklovih tekočin in shranili po 1 ml foliklove tekočine vsakega folikla. Folikulove tekočine smo centrifugirali 500 x g 10 min in supernatant shranili na -20 °C za kasnejšo analizo AMH.

Zrelost jajčnih celic smo ocenili po videzu kompleksa jajčna celica – kumulus in jih razdelili na zrele, nezrele in degenerirane jajčne celice.

Zrela jajčna celica je obdana z vsaj 10-mi plastmi granuloznih celic, ki so organizirane v žarkasto strukturo. Zrela jajčna celica je tudi jasno vidna skozi kumulusno maso.

Nezrela jajčna celica je tesno obdana z majhnim številom (dveh ali treh) granuloznih plasti in je v primerjavi z zrelo jajčno celico kompleks jajčna celica – kumulus znatno temnejši.

Degenerirane jajčne celice pa imajo temnejšo, vakuolasto in nepravilno grajeno citoplazmo (ooplasm) obdana z nekaj nezdravimi granuloznimi celicami. **(14)**

Vsako jajčno celico smo nato posamično gojili v komercialno pripravljenemu mediju (MediCult, Jyllinge, Denmark) in ker smo jih gojili do stopnje blastociste, smo jih nato prenesli v novo gojišče (Blast Assist System; MediCult, Jyllinge, Denmark). Razvoj zarodkov smo ocenjevali 5.dan gojenja in jih razdelili v: ≤ 10 celične zarodke, morule ali blastociste. V maternico smo prenesli največ dva zarodka, ostale nadštevilne blastociste pa smo zamrznili. Nosečnost smo potrdili 14 dni po prenosu zarodka z merjenjem serumskega β -HCG.

Merjenje hormonskih vrednosti v serumu in foliklovi tekočini

Na dan, ko smo aspirirali jajčne celice, smo pacientkam odvzeli tudi kri za določitev serumskih, koncentracij AMH. Prav tako smo AMH določali tudi v v foliklovi tekočini..

Analizo serumske in foliklove AMH koncentracije smo opravili z encimskoimunskim testom ELISA; DSL-10-14400 Active MIS/AMH ELISA (Diagnostics Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA) na analizatorju (Adaltis, Italia). Koeficient variacije znotraj serije in med serijami je bil manjši od 5% oz. 8%, najnižja meja zaznavnosti pa 0,006 $\mu\text{g/l}$ in linearnost do 15 $\mu\text{g/l}$ AMH.

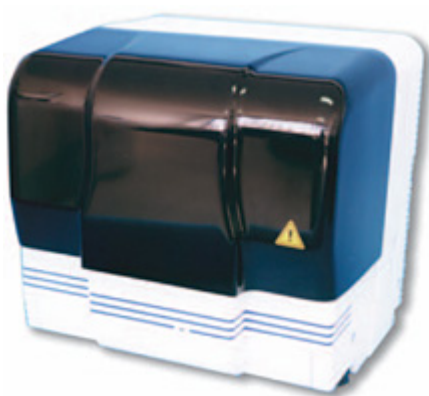
Statistična analiza

Statistično obdelavo podatkov analize smo opravili s pomočjo statističnega programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

V vseh spremenljivkah je bil uporabljen Kolmogorov-Smirnov test za testiranje normalne razporeditve (distribucije). Mann-Whitney U test smo uporabili za primerjavo značilnosti žensk in foliklov v NC skupini in COH skupini. Logistično regresijo smo uporabili za ugotavljanje vpliva folikularne koncentracije AMH na kvaliteto jajčnih celic in kvaliteto zarodkov v NC skupini in COH skupini.

Oprema in reagenti za analizo

Za določitev koncentracije AMH smo uporabili analizator Adaltis Personal Lab (Slika 10), proizvajalca ADALTIS, Italia, rezultate pa smo obdelali s programom Work Bench. To je popolnoma avtomatski analizator, ki lahko istočasno analizira dve mikrotitrski ploščici. Povezan je z osebnim računalnikom preko katerega dobimo pisne rezultate, hkrati pa omogoča tudi vnos protokola za posamično analizo (npr. pozicije vzorcev in reagentov, spremembo temperature, možnost stresanja,..). Analizator celotno analizo opravi sam, od pipetiranja vzorcev in reagentov do inkubacije. Naloga laboratorijskega osebja je samo vstavitve vzorcev in reagentov, zapis protokola in občasno opazovanje poteka analize, da v primeru kakršne koli napake zna ustrezno reagirati in odpraviti napako, ali pa v skrajnem primeru analizo dokončati ročno.



Slika 10
- Analizator Adaltis Personal LAB

Vsi reagenti za določitev so zapakirani v komercialno uporabnem kitu MIS / AMH ELISA Kit (kataloška številka DSL-10-14400, proizvajalec Diagnostics Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA). V kitu se nahaja :

1. Mikrotitrna ploščica

DSL-10-14410

- Mikrotitrna ploščica kapacitete 96-ih jamic, ki so kovtane z anti-MIS/AMH protitelesi razreda IgG imobilizirana znotraj jamic
- Skladišče: 2 °C do 8 °C, rok uporabe označen na zapečateni vrečki, ki vsebuje sušilo, ki varuje pred vlago

2. MIS/AMH Standard A / Sample Diluent

DSL-10-14401

- Pripravljen za uporabo
- Nahaja se v 20 ml viali (označena A) koncentracije 0 ng/ml MIS/AMH
- Nanaša se v vse jamice za določanje natančne koncentracije

3. MIS/AMH Standard B-G

DSL-10-14402, DSL-10-14403, DSL-10-14404, DSL-10-14405, DSL-10-14406,
DSL-10-14407

- Pripravljeni za uporabo
- Gre za 6 vijal, vsaka volumna 0,5 ml, označene od B-G, koncentracije 0,05; 0,10; 0,25; 1,8; 7,5 in 15 µg/l MIS/AMH
- Dobljeni rezultati MIS/AMH standardov so dokumentirani in izsledljivi v fabrikantu (poročilu proizvajalca) za delo kalibracije in so osnovane preko uporabe reprezentativnih vzorcev določenega Lot-a standardov

4. MIS/AMH Kontroli

DSL-10-14451, DSL-10-14452

- Pripravljeni za uporabo
- Dve vijali, vsaka volumna 0,5 ml, označeni z I in II, ena vsebuje nizko, druga pa visko koncentracijo MIS/AMH
- Dodaja se za natančno določanje kontrolne meje

- Skladišče: 2 °C do 8 °C

5. MIS/AMH Antibody-Biotin Konjugat

DSL-10-14420

- Pripravljen za uporabo
- Ena vijala, volumna 11 ml, vsebuje biotinirana MIS/AMH protitelesa
- Skladišče: 2 °C do 8 °C

6. Streptavidin-encim Konjugat

DSL-10-14425

- Pripravljen za uporabo
- Ena vijala, volumna 11 ml, vsebuje streptavidin HRP
- Skladišče: 2 °C do 8 °C

7. MIS/AMH pufer

DSL-10-14440

- Ena vijala, volumna 11 ml, vsebuje bovin serumski albumin (BSA) < 0.05% ProClin 300
- Skladišče : 2 °C do 8 °C

8. TMB Raztopina Kromogena

DSL-10-9755

- Ena steklenička, volumna 11 ml, vsebuje raztopino TMB v citratnem pufru z hidrogen peroksidazo.
- Skladišče: 2 °C do 8 °C

9. Koncentrat za spiranje

DSL-10-4030

- Ena steklenička, volumna 100 ml, vsebuje slano pufersko raztopino z detergentom
- Skladišče : 2 °C do 8 °C
- Razredčimo z 10-kratno količino dionizirane vode

10. Raztopina za prekinitev reakcije (Stop Solution)

DSL-10-9780

- Ena steklenička, volumna 11 ml, vsebuje 0,2M sulfonsko kislino
- Skladišče : 2 °C do 8 °C

Postopek testa v aparaturi

Vsi reagenti, standardi in vzorci morajo biti pred uporabo stabilizirani/segreti na sobno temperaturo (~25°C) ter na ploščico nanešeni v paralelkah.

1. Vstavimo mikrotitrsko ploščico (lahko tudi dve) z vzorci v stojalo, dodamo reagente, kontrole, dionizirano vodo za spiranje in napišemo protokol analize.
2. Analizator odpipetira 20 µL standarda, kontrole in vzorcev v pripadajoče jamice
3. Doda 100 µL MIS/AMH puffer
4. Sledi inkubacija na stresalniku pri 500-700 rpm, 1h pri 25 °C
5. Sledi spiranje vsake jamice ~ 30 sek z raztopino za spiranje s pomočjo avtomatskega spiralnika
6. Doda 100 µL Pt-biotin konjugata v vsako jamico
7. Sledi ponovna inkubacija na stresalniku, 1h pri 25 °C
8. Spiranje vsake jamice 5x z raztopino za spiranje na avtomatskem spiralniku
9. Doda 100 µL streptavidin encim konjugata v vsako jamico
10. Inkubacija na stresalniku (500-700 rpm), 30 min pri 25 °C

11. Spiranje jamic 5x z raztopino za spiranje
 12. Doda 100 μL TMB kromogena (opozorilo: izogibanje neposredni izpostavljenosti sončni svetlobi!)
 13. Inkubacija, stresanje (500-700 rpm), 10-15 min pri 25 °C
 14. Doda 100 μL raztopine za prekinitvev reakcije v vsako jamico
 15. Sledi spektrofotometrično odčitavanje rezultatov absorbance pri 600 nm
- (18)**

Podajanje rezultatov

Količino konjugiranih antiimunoglobulinov določimo s stopnjo razgradnje substrata, ki se obarva in s spektrofotometrom merimo absorbanco med 600 nm in 630 nm, ta pa je proporcionalna koncentraciji preiskovanega analita.

Vrednosti MIS/AMH standardov uporabimo za izdelavo standardne krivulje odvisnosti absorbance (povprečje obeh paralelk) MIS/AMH od koncentracije. Ta nam predstavlja merilo uspešnosti analiznega postopka. V kolikor so pridobljeni koeficienti variacije v pričakovanih mejah, je tudi rezultat meritve sprejemljiv. V primeru, da je določena koncentracija nad 15 $\mu\text{g/l}$, potem moramo vzorec razredčiti.

Tabela I
– prikaz vrednosti standardne krivulje

Št.	STANDARDI	POVPREČJE ABSORBANC	KONCENTRACIJA ($\mu\text{g/l}$)
A1, A2	A	0,03 (Slepa)	0
B1, B2	B	0,01	0,05
C1, C2	C	0,02	0,10
D1, D2	D	0,06	0,25
E1, E2	E	0,39	1,8
F1, F2	F	1,50	7,5
G1, G2	G	3,13	15

Vrednotenje rezultatov

Analitična občutljivost

Občutljivost (Se; ang. sensitivity) je definirana z naklonom umeritvene krivulje od standardne deviacije umeritvene krivulje, odčitamo jo lahko iz kalibracijskega grafa.

Najnižja meja zaznavnosti (minimum detection limit-LOD) podaja najnižjo koncentracijo komponente v vzorcu, ki jo lahko z določeno natančnostjo še določimo s postopkom. Meja zaznavnosti je tista koncentracija, pri kateri je izmerjena fizikalna količina enaka merjeni fizikalni količini slepe povečana za dva standardna odklona slepe.

Večja kot je občutljivost, večjo sposobnost zaznave ima test. Če je relativna sposobnost testa 1 oziroma v odstotkih 100%, pomeni da je test 100% sposoben zaznati določano komponento.

Najnižja meja zaznavnosti MIS/AMH z 95% zaupanjem je 0,006 $\mu\text{g/L}$. Ta vrednost je pridobljena preko vseh sedmih točk (A1 do G1) kalibracijske krivulj, točk kontrol in osmih ponovitvah treh vzorcev. Vrednost analitične občutljivosti je pridobljena iz točke krivulje, ki je za vrednost dveh standardnih deviacij večja od ničelnega kalibracijskega signala.

Natančnost / točnost

Točnost je kot statična kakovostna meroslovna značilnica stopnja verodostojnosti, natančnost pa je stopnja ponovljivosti, kjer se pojavlja raztros vrednosti količin. Je stopnja merjene ali izračunane količine glede na njeno dejansko (resnično) vrednost. Idealna merilna priprava je hkrati točna in natančna, ter daje meritve, ki so vse blizu skupaj in porazdeljene brez raztrosa okoli znane vrednosti. Točnost in natančnost merilnega procesa se po navadi doseže s ponavljajočimi meritvami sledljive referenčne standardne količine. Te količine so določene z mednarodnim sistemom enot, vzdržujejo pa jih nacionalne organizacije za standarde.

Natančnost / točnost smo določili z merjenjem treh vzorcev, vsakega smo posamično analizirali 8x oz. 10x v paralelkah.

Tabela II
– Ponovljivost med serijami

VZOREC	N (število ponovitev)	POVPREČJE (µg/l)	STANDARDNA DEVIACIJA (µg/l)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
I	8	0,144	0,006	4,6
II	8	0,843	0,020	2,4
III	8	4,408	0,147	3,3

Tabela III
– Ponovljivost izven serije

VZOREC	N (število ponovitev)	POVPREČJE (µg/l)	STANDARDNA DEVIACIJA (µg/l)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
I	10	0,149	0,012	8,0
II	10	0,850	0,041	4,8
III	10	4,279	0,290	6,7

Standardni odklon / standardna deviacija: $RSD = S / \bar{X}$ (aritmetična sredina-mediana)

Koeficient variacije: $CV = S / \bar{X} * 100\%$

Varianca: $S^2 = (X_i - \bar{X})^2 / n-1$

Linearnost

Tabela IV

– Dva naključna serumska vzorca smo redčili z standardom (0 µg/l MIS/AMH) in dobili naslednje rezultate:

VZOREC	FAKTOR REDČENJA	PRIČAKOVANE VREDNOST (µg/l)	IZMERJENE VREDNOSTI (µg/l)	PRIDOBITEV DODATKA (%)
1	N/A	N/A	0,88	N/A
	1:2	0,44	0,40	91
	1:4	0,22	0,18	82
	1:8	0,11	0,08	75
	1:16	0,055	0,049	89
2	N/A	N/A	10,6	N/A
	1:2	5,3	5,1	96
	1:4	2,65	2,65	100
	1:8	1,33	1,18	89
	1:16	0,66	0,53	80

Rezultati

Osnovni podatki o pacientkah, vključenih v raziskavo, so razvidni iz tabele V.

Tabela V

– Prikazuje starost pacientk, BMI in hormonske koncentracije na 3. dan menstruacijskega ciklusa v NC in COH skupini.

Parameter	NC skupina (n = 29)	COH skupina (n = 29)	P- vrednost
Starost	34.9 ± 3.4	33.6 ± 4.1	NS
BMI (kg/m ²)	21.9 ± 2.5	23.6 ± 4.3	NS
FSH (IU/l)	6.7 ± 4.1	6.7 ± 2.4	NS
LH (IU/l)	5.1 ± 3.4	6.0 ± 3.9	NS
Prolaktin (µg/l)	12.2 ± 5.7	11.0 ± 5.9	NS

Vse vrednosti predstavljajo povprečje ± standardna deviacija

Legenda : NC – naravni cikel; COH – kontrolirana hiperstimulacija jajčnikov; BMI – indeks telesne teže; FSH – folikle stimulirajoči hormon; LH – luteinizirajoči hormon; E2 – estradiol; NS – ni signifikantno

Analiza kvalitete jajčnih celic in zarodkov, stopnje zanositve in kliničnih nosečnosti.

V NC skupini smo pridobili $0,8 \pm 0,5$ jajčnih celic na punkcijo in $6,3 \pm 4,3$ jajčnih celic v COH skupini. ($p < 0,001$).

Od 24 jajčnih celic pridobljenih v NC skupini je bilo 21 zrelih jajčnih celic (87,5%) in 3 nezrele jajčne celice (12,5%). V COH skupini smo pridobili 128 jajčnih celic, od tega je bilo 112 zrelih jajčnih celic (87,5%), 12 nezrelih jajčnih celic (9,4%), 4 jajčne celice pa so bile degenerirane (3,1%).

V NC skupini se je oplodilo 20 jajčnih celic (83,3%), v COH skupini pa 81 jajčnih celic (63,3%). Na 5. dan gojenja smo v NC skupini pridobili 4 (20%) ≤ 10 celičnih zarodkov, 3 (15%) morul in 11 (55%) blastocist. V COH skupini pa 23 (28,4%) ≤ 10 celičnih zarodkov, 16 (19,8%) morul in 35 (43,2%) blastocist.

Analiza kvalitete jajčnih celic in zarodkov ni pokazala statističnih razlik v primerjavi med obema skupinama.

Prenos zarodkov je bil izveden pri 17-tih (58,6%) ženskah v NC skupini in pri 22-tih (75,9%) ženskah v COH skupini, od tega je bilo pri 9-tih (40,9%) ženskah izveden prenos dveh zarodkov..

V NC skupini se je samo eni ženski rodil otrok, v COH skupini pa 6-tim ženskam en otrok, eni ženski trojčki, pri eni ženski z dvojčki pa je prišlo do spontanega splava.

Delež vsaditve je bil v NC skupini 5,9%, pri COH skupini pa 35,5% ($P = 0,031$).

Različne foliklove koncentracije AMH v foliklih, ki so bili prazni, ali so vsebovali jajčne celice različne kvalitete, ki so se razvijali v zarodke različne kvalitete so razvidne iz Tabele 6.

Tabela VI

– Prikaz foliklove koncentracije AMH v različnih foliklih

	AMH ($\mu\text{g/l}$)		P-vrednost
	NC	COH	
Prazni folikli	4.7 \pm 4.8	2.3 \pm 1.7 ^a	NS
Zrele jajčne celice	7.1 \pm 7.7	2.5 \pm 1.7 ^b	0.002
Nezrele jajčne celice	10.4 \pm 5.9	2.8 \pm 2.3	0.049
Degenerirane jajčne celice	-	1.2 \pm 0.5 ^{ab}	-
Neoplojene jajčne celice	11.9 \pm 10.7	1.7 \pm 1.2	0.001
< 10 celični zarodek	3.3 \pm 1.6	2.7 \pm 1.6	NS
Morula	2.8 \pm 2.3	3.0 \pm 2.1	NS
Blastocista	5.6 \pm 5.2	2.1 \pm 1.1	0.008

Vse vrednosti predstavljajo povprečje \pm standardna deviacija

Legenda : NC – naravni ciklus; COH – kontrolirana hiperstimulacija jajčnikov; FSH – folikle stimulirajoči hormon; LH – luteinizirajoči hormon; NS – ni signifikantno

^aP=0.05; ^bP=0.03

REZULTATI FOLIKLOVEGA IN SERUMSKEGA AMH NA DAN PRIDOBITEV JAJČNIH CELIC V NC IN COH SKUPINI

Tabela VII

– Izračunano povprečje serumskega in foliklovega AMH za spodbujen in spontani ciklus (n=29)

Parameter	Vrednosti ($\mu\text{g/l}$) v COH skupini	Vrednosti ($\mu\text{g/l}$) v NC skupini	P - vrednost
Serumski AMH	1,4 \pm 0,9	2,3 \pm 2,0	< 0,001
Foliklov AMH	2,5 \pm 1,7	6,1 \pm 5,5	< 0,001

Vrednosti predstavljajo povprečje \pm standardna deviacija

Spontani ciklus (skupina NC)**Tabela VIII**

– Prikaz starosti pacientk, BMI, število foliklov ter serumski in foliklov AMH za 29 pacientk vključenih v postopek IVF-ET

Oznaka pacientke	Starost pacientke	BMI (body mass index)	Število foliklov	Foliklov AMH ($\mu\text{g/l}$)	Serumski AMH ($\mu\text{g/l}$)
1	33	22,8	1	3,55	0,43
2	36	21,5	1	2,02	1,07
3	38	17,2	1	3,2	2,31
4	38	19	1	19,46	4,78
5	34	22,2	1	4,37	3,64
6	38	23,7	1	3,51	0,42
7	39	22,6	1	1,34	0,31
8	35	18,4	1	1,69	0,51
9	34	19,4	1	12,97	9,07
10	31	22,7	1	0,44	0,34
11	35	19,2	1	1,39	1,31
12	37	18,8	1	5,49	2,83
13	32	24,1	1	3,65	0,12
14	36	25,9	1	5	5,04
15	36	21,2	1	2,37	0,43
16	30	20	1	2,24	1,76
17	26	20,1	1	5,53	3,93
18	35	24,8	1	3,18	4,04
19	38	27,2	1	15	2,31
20	37	19,5	1	14,9	/
21	30	23	1	14	4,78
22	31	21	1	/	0,85
23	37	25,8	1	2,84	1,65
24	34	18,4	1	1,29	0,51
25	40	21,5	1	15	2,18
26	40	21,5	1	3,26	2,18
27	38	20,3	1	2,46	2,95
28	31	21	1	5,82	0,85
29	31	23,6	1	14,67	3,21

Spodbujeni ciklus (skupina COH)

Tabela IX

- Prikaz starosti pacientk, BMI, serumski in foliklov AMH za 29 pacientk vključenih v postopek IVF-ET

Oznaka pacientke	Starost pacientke	BMI (body mass index)	F1 AMH (µg/l)	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	Serumski AMH (µg/l)
1	37	20,2	2,46	6,4	2,05	1,87	0,59	1,86			0,39
2	28	24,7	1,89								0,92
3	36	19,5	8,33	5,7							0,75
4	35	23,3	1,47	3,77	1,56	2,01	2,48				1,05
5	37	23	1,9	2,28	2,54	1,89	1,86	3,95	2,42	2,03	1,32
6	41	19,6	1,35	1,88	1,37	1,23	7,23	2,86	2,35		0,88
7	28	23,3	2,26	2,33	2,5	3,45	3,42	2,43			3,56
8	35	21	/	/	/	/	/	/			0,73
9	40	21,1	0,61	3,11	6,23	1,1	0,95	1,1	0,98	3,27	0,36
10	33	28,7	1,05	1,02	0,88	0,86					0,45
11	26	21,4	2,86	4,05	3,82	2,37	3,11	2,93			3,24
12	37	22	/	/	/	/	/				1,84
13	27	23,5	1,55	1,11	1,41	1	1,96	1,19	1,32		0,9
14	32	20,6	2,54	2,24	4,91	6,45	5,71	2,24	2,59		1,71
15	30	20,9	1,68	2,21	3,05	2,11					1,69
16	30	33,4	1,96	1,98	1,7	1,13	1,98	1,59			1,43
17	30	19,4	2,26	1,65	1,78	2,37	1,65	1,59			1,69
18	34	24,2	1,19	1,28	1,73	1,66	1,4	1,52	1,46		1,38
19	34	22,1	0,94	1,39	1,11	2,06					0,71
20	33	29,4	/	/	/	/	/	/			1,52
21	37	25,8	3,51	2,27	3,6	1,88					0,81
22	36	20,4	0,39	0,39	0,95						0,27
23	36	25,9	0,8	0,36							0,32
24	31	32,4	3,6	3,17	3,5	3,07	3,54				3,19
25	32	19,1	2,32	2,98	2,94	2,99					2,23
26	35	17,7	3,64	9,41	6,64	3,65	4,34	7,53	8,29		1,9
27	29	32	0,87	0,95	0,78	0,72	0,85	1,32			0,95
28	41	29,2	1,43	1,45							0,81
29	38	23,7	1,68	5,26	1,4	2,76	1,43				1,12

Legenda : F1 – F8(označuje zapredno številko folikla, vrednosti so podane v µg/l).

Razprava

Z raziskavo smo potrdili, da je tako serumska kot foliklova koncentracija AMH različna pri ženskah v spontanah ciklusih v primerjavi s spodbujenimi ciklusi. Izsledki raziskave so tudi pripomogli k dodatnemu razumevanju procesov, ki se dogajajo v foliklovem mikrookolju v naravnem in stimuliranem ciklusu.

V raziskavo smo vključili 58 neplodnih žensk vključenih v postopke zunajtelesne oploditve zaradi tubarnega vzroka neplodnosti. Pri polovici žensk smo izvedli IVF v spontanem menstruacijskem ciklusu, pri drugi polovici pa v ciklusih kontrolirane hiperstimulacije jajčnikov. Punkcijo jajčnikov smo izvedli na tak način, da smo aspirirali vsak folikel posebej. Na dan punkcije jajčnikov in po izolaciji jajčne celice smo v foliklovi tekočini in vzorcih seruma določili koncentracijo AMH z encimsko imunskim testom ELISA. Po oploditvi v laboratoriju smo zarodke gojili v laboratorijskih pogojih 5 dni, nato pa smo jih prenesli v maternico. Zabeležili smo stopnjo klinične nosečnosti in stopnjo rojenih otrok.

Izsledki raziskave so pokazali, da statistično višje vrednosti serumskih in foliklovih koncentracij AMH v NC skupini na dan pridobitve jajčnih celic nimajo nikakršnega vpliva na kvaliteto jajčnih celic in zarodkov, kajti jajčne celice dozoriyo s pomočjo aplikacije HCG in te zrele jajčne celice so prav tako zmožne oploditve in razvoja do dobro kvalitetnih zarodkov kot je to v COH skupini.

V predstavljeni raziskavi nismo uspeli dokazati, kako foliklova koncentracija AMH vpliva na kvaliteto zarodkov oziroma stopnjo zanositve v obeh skupinah, čeprav je foliklova koncentracija AMH značilno višja v NC skupini v primerjavi s skupino, kjer smo spodbujali jajčnike z gonadotropini.

V NC skupini imajo folikli visoko raven AMH zaradi intenzivnega metabolizma granuloznih celic, ki je najbolj izražen v zgodnji fazi folikulogeneze. Dokazano je (Fanchin HR 2005), da granulozne celice v majhnih foliklih proizvedejo približno 3x več AMH kot jih proizvedejo v velikih foliklih, zato posledično manjši folikli v NC skupini dajejo višjo foliklovo koncentracijo AMH. Domnevamo tudi, da ima zgodnja aplikacija HCG v NC skupini, takrat, ko so folikli majhni in ko je koncentracija E2 nizka, negativen vpliv na endometrijo in posledično na stopnjo zanositve.

S strani tujih avtorjev (Fanchin et al., 2003a, 2005; Weenen et al., 2004; Andersen and Byskov, 2006; Feyereisen et al., 2006) je bilo tudi predstavljeno, da granulozne celice v zrelih foliklih postopoma izgubljajo sposobnost proizvodnje AMH in to lahko zaznamo v atretičnih foliklih.

Posamezni raziskovalci (Seifer et al., 2002; van Rooij et al., 2002; Fanchin et al., 2003b) so še dokazali, da FSH negativno vpliva na proizvodnjo AMH. Na osnovi rezultatov naše raziskave in podatkov iz zgoraj navedene literature lahko sklepamo, da povišano doziranje eksogenega FSH med spodbujanjem jajčnikov zavira sintezo AMH v granuloznih celicah. Po drugi strani pa v NC skupini granulozne celice niso pod vplivom FSH kot so med spodbujanjem z gonadotropini, zato lahko proizvedejo več AMH.

Zaključimo lahko, da vzrok za visoko serumsko in foliklovo koncentracijo AMH v NC skupini v primerjavi s COH skupino lahko iščemo v negativnem vplivu eksogenega FSH na sintezo AMH. Izsledki raziskave analiz serumske in foliklove koncentracije AMH pa nam niso uspeli pojasniti razloga za nizko stopnjo nosečnosti v NC skupini.

Z laboratorijskega vidika rezultati kažejo, da sta analizator Adaltis Personal LAB in metoda ELISA dovolj zanesljiva in primerna za določanje koncentracije AMH tako v foliklovih tekočinah kot tudi v serumu, saj se je izkazala, da deluje v širokem spektru merilnega območja. S tem je bila potrjena tudi klinična uporabnost omenjene laboratorijske metode. Kljub temu pa smo ugotovili določene pomanjkljivosti, ki jih je potrebno upoštevati. Tako je potrebno pri vzorcih, ki dajejo rezultate višje kot je najvišja vrednost (točka) umeritvene krivulje, redčiti z najnižjim standardom A, koncentracije 0 ng/ml, pri tem pa nikoli ne smemo redčiti standardov in kontrolnih vzorcev. Nadalje je potrebno pred analizo vse uporabljene reagentne in vzorce segreti do sobne temperature, saj se na ta način izognemo predanalitičnim napakam in tako omejimo možnost odstopanja rezultatov od pričakovanih vrednosti. Zelo pomembno pri sami analizi je tudi temeljito spiranje mikrotitrne ploščice s spiralno tekočino, saj obstaja možnost, da se cevke avtomatiziranega spiralnika zamašijo in na ta način ne sperejo jamic v celoti, kar lahko vpliva na točnost rezultatov.

Sklepi – zaključek

1. Rezultati naše raziskave kažejo, da se vrednosti AMH v serumu in foliklovi tekočini pri spontanem in vzpodbujenem ciklusu statistično razlikujejo, kar pomeni, da imajo zdravila, ki so jih uporabljane ženske za spodbujanje ovulacije v COH skupini vpliv na sintezo AMH v granuloznih celicah folikla, saj so vrednosti AMH pri spodbujenem ciklusu v foliklovi tekočini znatno nižje kot pri spontanem ciklusu. Razlika med obema skupinama se kaže tudi v serumskih vrednostih.
2. Rezultati naše raziskave ne potrjuje domneve, da so koncentracije AMH povezane s kvaliteto jajčnih celic, saj v raziskavi nismo našli razlik med koncentracijami AMH v foliklih, ki so vsebovali zrele, nezrele ali degenerirane jajčne celice.
3. Rezultati kažejo, da sta analizator Adaltis Personal LAB in metoda ELISA dovolj zanesljiva in primerna za uporabo v diagnostične namene, saj smo z omenjeno metodo lahko analizirali tako serumske kot foliklove vzorce, ker statistična analiza izkazuje dobre rezultate in relativno majhna odstopanja. Določevali smo lahko tako visoke kot tudi nizke koncentracije AMH.

Viri in literatura

1. Irma Virant Klun, Helena Meden Vrtovec, Tomaž Tomaževič: Od nastanka gamet do rojstva, Radovljica, Didakta, 2002. 97-110, 129-134, 160-166, 183-190, 212
2. <http://www.ivf-mb.com/oploditev.htm> (25.1.2009)
3. Irma Virant-Klun: Ta čudoviti zarodek; Atlas spolnih celic in zarodkov v postopku zunajtelesen oploditve, Ljubljana, Medi Cult, 2004. 22-69, 70-103
4. Veljko Vlaisavljević: Izvantjelesna oplodnja, publikacijo je izdala Splošna bolnišnica Maribor, služba za ginekologiju i perinatologiju. 1-2
5. Helena Meden-Vrtovec, Martina Ribič-Pucelj: Kaj morate vedeti o postopku zunaj telesa (IVF-ET), Ljubljana, Ginekološka klinika Ljubljana, Klinični oddelek za reprodukcijo, 2005. 5, 6
6. Veljko Vlaisavljević: Zunajtelesna oploditev - navodilo pacientom, Splošna bolnišnica Maribor, 2003. 3-6
7. Helena Meden-Vrtovec s sodelavci : Neplodnost, Ljubljana: CZ, 1989. 224, 225
8. Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L, Legeai L & Carré-Eusèbe: Anti-mullerian hormone, *Recent Progress in Hormone Research* 1993; 48: 1-59
9. Durlinger ALL, Visser JA & Themmen: Regulation of ovarian function; the role of anti-Mullerian hormone, APN, 2002a; *Reproduction* 124: 601-609
10. Engvall E., Perlman P.: Encyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Immunochemistry*, 1971; 8(9): 871-874

11. Marjan Vozel: Temelji imunologije, Ljubljana, DZS, 1996. 112
12. Vrtačnik Bokal E, Meden Vrtovec H, Virant Klun I: Prolonged HCG action affects angiogenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome, 2005, *Hum Reprod* 20: 1562-1568
13. Itskovitz J, Rubattu S, Rosenwaks Z: Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of in vitro fertilization, 1991, *J Clin Endocrinol Metab* 72: 165-171.
14. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW & te Velde ER: Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility, 1999, *Fertility and Sterility* 72: 845–851
15. Picard JY, Josso N: *Mol Cell Endocrinol*, 1984; 34: 23–29,
16. Masagué J: The transforming growth factor beta family, 1990; *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.
17. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N: Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization, 2007; *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1796-802.
18. Diagnostic Systems Laboratories, MIS/AMH ELISA DSL-10-14400, Inc, Texas, USA, 2007.

KAZALO SLIK:

SLIKA 1.....	5
SLIKA 2.....	6
SLIKA 3.....	7
SLIKA 4.....	9
SLIKA 5.....	13
SLIKA 6.....	14
SLIKA 7.....	15
SLIKA 8.....	17
SLIKA 9.....	19
SLIKA 10.....	25

KAZALO TABEL:

TABELA I.....	29
TABELA II.....	31
TABELA III.....	31
TABELA IV.....	32
TABELA V.....	33
TABELA VI.....	35
TABELA VII.....	35
TABELA VIII.....	36
TABELA IX.....	37

