

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA OSOLNIK

**PRIMERJAVA SERUMSKIH IN FOLIKLOVIH KONCENTRACIJ
STEROIDNIH HORMONOV MED SPONTANIMI IN
SPODBUJENIMI CIKLUSI PRI PACIENTKAH V POSTOPKU
ZUNAJTELESNE OPLODITVE**

**COMPARISON OF SERUM AND FOLLICLE CONCENTRATIONS
OF STEROID HORMONS BETWEEN SPONTANEOUS AND
STIMULATED CYCLES WITH PATIENTS IN PROCEDURE OF
IN VITRO FERTILIZATION**

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 Ginekološki kliniki, Klinični oddelek za reprodukcijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom prof. dr. Ede Vrtačnik-Bokal, dr.med.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju dr. Jošku Osredkarju za čas, ki ga je namenil za odgovore in razlage na moja vprašanja ter pametne napotke glede pisanja diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi somentorici dr. Edi Vrtačnik-Bokal za odlično temo in pomoč pri pisanju diplomske naloge ter vzpodbudo med samim delom.

Posebno mesto pa imajo pri zahvali tudi vsi moji domači, saj so strpno prenašali mojo občasno nejevoljo med samim pisanjem in me spodbujali. Tudi fantu se moram posebej zahvaliti, saj je najbolj občutil nihanja v mojem počutju in jih odlično prenašal.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom dr. Joška Osredkarja in somentorstvom dr. Ede Vrtačnik-Bokal.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
SLOVARČEK.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 ZGODOVINSKI PREGLED O ZANOSITVI IN ZUNAJTELESNI OPLODITVI 1	
1.2. GLAVNI VZROKI NEPLODNOSTI PRI ŽENSKAH	1
1.3 OPLODITEV Z BIOMEDICINSKO POMOČJO – OBMP	2
1.3.1 Ultrazvočna aspiracija jajčnih celic iz jajčnika	4
1.4 JAJČNA CELICA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE	5
1.4.1 Zgradba jajčne celice	5
1.4.2 Foliklova tekočina	6
1.4.3 Ocena zrelosti jajčnih celic	7
1.5 OPLODITEV.....	7
1.5.1 Priprava semenčic na oploditev	8
1.5.2 Vezava semenčice na zono pelucido jajčne celice	9
1.5.3 Aktivacija jajčne celice	9
1.6 OCENA KAKOVOSTI ZARODKOV IN OPLODITVE	10
1.6.1 Ocena kakovosti zarodkov	10
1.6.2 Ocena oploditve	11
1.7 SPONTANI POSTOPEK ZUNAJTELESNE OPLODITVE POSTOPEK IVF 12	
1.8 SPODBUJENA ZUNAJTELESNA OPLODITEV	12
1.8.1 Hormonsko spodbujanje jajčnikov	12
1.8.2 Prenos zarodkov	13
1.9 STEROIDNI HORMONI	13
1.9.1 Estradiol	13
1.9.1.1 Učinki estrogenov	13
1.9.1.2 Mehanizem delovanja.....	14
1.9.1.3 Presnova	14
1.9.1.4 Sinteza	15
1.9.2 Progesteron	15
1.9.2.1 Učinki progesterona.....	15
1.9.2.2 Sinteza	16
1.9.3 Androstendion	17
1.9.3.1 Učinki androstendiona.....	17
2 DELOVNA HIPOTEZA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Oprema, testni kompleti in reagenti za kemiluminiscenčno metodo (CLIA) pri določanju progesterona	20
3.1.2 Priprava in redčenje vzorcev za določanje progesterona	21
3.1.3 Oprema, testni kompleti in reagenti za kemiluminiscenčno metodo (CLIA) pri določanju estradiola	21
3.1.4 Priprava in redčenje vzorcev za določanje estradiola	23
3.1.5 Kalibracija aparature	23

3.1.6 Oprema, testni kompleti in reagenti za radioimunski test (RIA) pri določanju androstendiona	23
3.1.7 Priprava vzorcev za določanje androstendiona	24
3.2 METODE	25
3.2.1 Kemiluminiscenčni imuno test za določanje progesterona	25
3.2.1.1 Postopek testa	25
3.2.1.2 Kontrola kakovosti	25
3.2.1.3 Referenčno območje	26
3.2.1.4 Funkcionalna občutljivost	26
3.2.1.5 Natančnost	27
3.2.1.6 Linearnost razredčin	27
3.2.1.7 Ponovljivost	28
3.2.1.8 Specifičnost	29
3.2.1.9 Moteče snovi	29
3.2.2 Kemiluminiscenčni imuno test za določanje estradiola	30
3.2.2.1 Postopek testa	30
3.2.2.2 Kontrola kakovosti	31
3.2.2.3 Pričakovane vrednosti	31
3.2.2.4 Analitična občutljivost.....	31
3.2.2.5 Natančnost	32
3.2.2.6 Redčitveni test	33
3.2.2.7 Specifičnost	33
3.2.2.8 Ponovljivost.....	34
3.2.2.9 Moteče substance.....	36
3.2.3 Radioimunski test za določanje androstendiona	36
3.2.3.1 Postopek testa	36
3.2.3.2 Kontrola kakovosti	37
3.2.3.3 Pričakovane vrednosti	38
3.2.3.4 Analitična občutljivost.....	39
3.2.3.5 Natančnost	39
3.2.3.6 Ponovljivost.....	39
3.2.3.7 Linearnost redčenja.....	40
3.2.3.8 Specifičnost	41
4 REZULTATI	42
5 RAZPRAVA	48
6 SKLEP	51
7 LITERATURA	52

POVZETEK

Vsako leto zaradi težav z zanositvijo medicinsko pomoč poišče približno 1000 neplodnih parov oziroma vsak 10. par, ki poskuša zanositi. Razlogov za neplodnost je več. Poleg zdravstvenih stanj, kot so odstranjeni jajcevodi, endometrijoza, nepravilno delovanje jajčnikov, imajo velik vpliv tudi razna psihološka stanja, kot so napetost, stresi, travme, moteni družinski odnosi in pa tudi nezdrav način življenja. Neplodnosti zdravimo z zdravili, kirurško in s postopki z biomedicinsko pomočjo.

V raziskavo smo vključili neplodne pacientke, ki so bile zdravljene v postopku zunajtelesne oploditve, in sicer v spontanem in spodbujenem ciklusu.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti možne razlike med spontanimi in spodbujenimi ciklusi pri pacientkah v postopku zunajtelesne oploditve z analizo serumskih in foliklovih koncentracij estradiola, progesterona in androstendiona. Estradiol in progesteron smo določali z metodo CLIA kemiluminiscenčno metodo, med tem ko smo androstendion določali z RIA radioimunskim testom.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da so serumske koncentracije analiziranih steroidnih hormonov pri spodbujenem ciklusu bistveno večje kot pri spontanem ciklusu.

V foliklovi tekočini so pri spodbujenem ciklusu večje le koncentracije progesterona, medtem ko so koncentracije estradiola in androstendiona večje pri spontanem ciklusu.

Zaključimo lahko, da izbrane laboratorijske metode niso primerne le za analizo serumskih koncentracij steroidnih hormonov, temveč tudi za analizo foliklovih tekočin.

ABSTRACT

Nearly 1000 of infertile couples or every 10. couple that tries to concieve search for medical help every year because of the pregnancy problems. There are many reasons four sterility. Beside different health conditions like removed oviducts, endometriosis, incorrect activity of ovaries have also large impact various psychological conditions like tension, stress, trauma, disturbed family attitudes and also unhealthy way of life. We treat sterility with medicines, surgically and *in vitro* fertilization.

In research we engaged infertile patients that were treated in procedure of *in vitro* fertilization in spontaneous and stimulated cycle.

With this dissertation we wish to find a possible difference between spontaneous and stimulated cycle with patients in procedure of *in vitro* fertilization with analysing serum and follicle concentrations of estradiol, progesteron and androstendion. We determine estradiol and progesteron with CLIA chemiluminescence immunoassay while we determine androstendion with RIA radioimmuno assay.

Based on gained results we found out that in serum concentrations of analized steroid hormones the concentrations of stimulated cycle are much larger than of spontaneous cycle. Concentrations of progesteron in the follicle fluid are larger only in stimulated cycle while the concentrarions of estradiol and androstendion are larger in spontaneous cycle.

We can conclude that chosen laboratorial methods are suitable not only for analysing serum concentrations of steroid hormones but also for analysing follicle liquid.

SEZNAM OKRAJŠAV

<u>Okrajšava</u>	<u>Pomen</u>
AND	androstendion
ACTH	adenokortikotropin
CO₂	ogljikov dioksid
Ca²⁺	kalcijev ion
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat
cpm	število sunkov na minuto
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E2	estradiol
ERα, ERβ	estrogenska receptorja
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FSH	folikle stimulirajoči hormon
GnRH	gonadotropin sproščujoči hormon
H⁺	vodikov ion
HAMA	človeška protitelesa proti mišjemu antigenu
IVF	zunajtelesna oploditev
IVF-ET	zunajtelesna oploditev s prenosom zarodka v maternico
ICSI	oploditev z neposrednim vnosom semenčice v citoplazmo
IP3	inozitol-1,4,5-trifosfat
LH	luteotropni hormon
mRNK	obveščevalna ribonukleinska kislina
ml	mililiter
mg/dl	miligram na deciliter
μl	mikroliter
nz	nezaznaven
nmol/l	nanomol na liter
ng/ml	nanogram na mililiter
OBMP	oploditev z biomedicinsko pomočjo
PROG	progesteron
pmol/l	pikomol na liter
pg/ml	pikogram na mililiter
RIA	radioimunski test

RLU	relativna svetlobna enota
SD	standardna deviacija
ZP1, ZP2, ZP3	glikoproteinski receptorji

SLOVARČEK

Pri **POLICISTIČNIH JAJČNIKI**H gre za presnovno motnjo, kjer so jajčniki povečani in vsebujejo številne ciste. Gre za eno najpogostejših endokrinopatij pri ženskah v reproduktivnem obdobju. Znaki, ki jih kažejo ženske s policističnimi jajčniki, so: izostanek menstruacije, neplodnost, spontani splavi, povečana poraščenost, akne, povečana telesna teža. Spremembe pa so posledica nepravilnega delovanja hipofize v možganih, saj ta tvori preveč luteinizirajočega hormona in premalo folikle stimulirajočega hormona. Tako jajčniki dobivajo preveč spodbud in tvorijo nenormalne količine moških spolnih hormonov. (1)

RIA je kratica za radioimunski test za kvantitativno določanje antigenov, kjer uporabljamo radioaktivno zaznamovane reaktante. Gre za tekmovanje radioaktivno zaznamovanega antigena in nezaznamovanega antigena (v preiskovanem vzorcu) za določeno količino protiteles. Z merjenjem radioaktivno zaznamovanega antigena, vezanega v kompleks, lahko dobimo podatke o količini antigena v preiskovanem vzorcu. (2)

CLIA je kemiluminiscenčni test, kjer kot trdno fazo uporabljamo magnetne kroglice, na katere je vezan sintetični polipeptid, ki je analog nativnim virusnim antigenom. Protitelesa, ki jih določamo, se vežejo na antigen, vezavo pa dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, na katera je konjugiran izoluminolni derivat. Če pride do vezave izoluminolnega protitelesnega konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju posebnega reagenta sprosti svetlobni signal, ki ga aparatura izmeri kot relativne svetlobne enote. (3,4)

ENDOMETRIOZA je bolezen, kjer se endometrijske žleze s stromo pojavljajo tudi zunaj maternične votline. Endometriotično tkivo se lahko razraste po celotni peritonealni votlini, torej jajčnikih, črevesju in omentumu. (5)

Na vseh teh mestih maternična sluznica raste, izloča sluz in razpada prav tako kot sluznica v maternični votlini. (6)

POSTOPEK ICSI je najpomembnejši postopek za zdravljenje moške neplodnosti.

Uporabljamo pa ga lahko tudi, kadar je bila oploditev jajčnih celic po klasičnem postopku zunajtelesne oploditve neuspešna. Postopek ICSI izvedemo pod posebnim invertnim mikroskopom s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja. Z mikroinjekcijsko pipeto

previdno predremo zono pelucido in membrano jajčne celice. Semenčico nato počasi mikroinjiciramo v citoplazmo jajčne celice in previdno potegnemo mikroinjekcijsko pipeto iz celice. Mikroinjiciramo samo po eno semenčico v vsako jajčno celico. (7)

1 UVOD

1.1 ZGODOVINSKI PREGLED O ZANOSITVI IN ZUNAJTELESNI OPLODITVI

Vprašanja o nosečnosti in nezmožnosti spočetja sežejo že v antično Grčijo, kjer se je grški filozof Aristotel s svojimi deli zapisal v razvoj medicinske znanosti. Bil je prvi, ki je zagovarjal mnenje, da sta pri spočetju enako pomembna moški in ženska, saj je do takrat veljalo dejstvo, da moški v žensko notranjost iztisne majhno bitje, ki v njej dozoreva.

Menil je tudi, da otrok nastane predvsem iz krvi, ki jo ženska izgubi med menstruacijsko krvavitvijo, otrokovo obliko pa naj bi dajalo moško seme.

V 17. stoletju so se pojavile anatomske podobe ženskih teles, kjer so jajčnike poimenovali ženska moda in so pravilno poimenovanje dobili šele konec 17. stoletja.

Van Leeuwenhoek je leta 1677 pod doma izdelanim mikroskopom prvič opazil semenčice in s tem postavil novo teorijo o oploditvi, kjer naj bi semenčica imela pomembno vlogo pri prodiranju v jajčno celico.

Začetek novega obdobja pri zdravljenju neplodnosti označujemo z rojstvom Louise Brown, 25. julija 1978, ki je bila spočeta zunaj materinega telesa. Že leta 1934 so izvajali tovrstne poskuse na živalih in leta 1959 uspešno *in vitro* oplodili jajčne celice zajklje ter opravili prenos zgodnjih zarodkov.

Prvi poskus zunajtelesne oploditve pri človeku pa je opravil leta 1966 Edwards, ki je dvakrat sprane semenčice dodal jajčnim celicam, ki jih je dozoreval v pogojih *in vitro*.

V Sloveniji se je prvič začel izvajati postopek zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani leta 1983.(7)

1.2. GLAVNI VZROKI NEPLODNOSTI PRI ŽENSKAH

V Sloveniji ocenjujemo, da je neplodnih parov 10 odstotkov, zato zdravljenje neplodnosti pomeni pomemben del javnega zdravstva. Medicinsko pomoč zaradi težav z zanositvijo vsako leto poišče približno tisoč neplodnih parov oziroma vsak deseti par, ki poskuša zanositi. (7)

Oviro za normalno nosečnost predstavljajo:

- neprehodni ali odstranjeni jajcevodi
- endometrioza

- nepravilno oblikovana ali pregrajena maternica
- nepravilno delovanje jajčnika:
 - policistični jajčniki
 - bolezen, kjer v jajčniku ne dozorevajo jajčne celice ali pa jih sploh ni
 - genetske nepravilnosti (mutacije fragilnega kromosoma X področja FRAKSA na eksonu 1 gena FMR 1 na Xq27.3)
- imunski vzroki:
 - nastanek protiteles v organizmu, ki onemogoča gibanje semenčic ali prodor semenčice skozi ovojnico jajčne celice
 - lahko gre tudi za protitelesa proti semenčicam ali proti jajčni celici (npr. zoni pelucidi)
- psihološki vzroki:
 - psihična napetost
 - stresni dogodki in travme
 - moteni družinski odnosi
 - čustveni pretresi, ki preko osrednjega živčevja povzročijo neuravnovešeno delovanje jajčnikov in s tem tudi izostanek ovulacije
- nezdrav način življenja:
 - kajenje
 - prekomerno uživanje alkohola, zdravil in mamil (7, 8)

1.3 OPLODITEV Z BIOMEDICINSKO POMOČJO – OBMP

Eden izmed najpogostejših postopkov za zdravljenje neplodnosti je zunajtelesna oploditev (lat. *in vitro* fertilizacija – IVF) s prenosom zarodkov (postopek IVF – ET), seveda če prejšnje zdravljenje z različnimi zdravili, hormonskimi preparati in kirurškimi postopki ni bilo uspešno.

Jajčne celice iz jajčnika izsesamo pod kontrolo ultrazvoka in jih zunaj telesa oplodimo s pripravljenim semenom. Zarodke nato 2., 3. ali 5. dan po izsesavanju s pomočjo katetra prenesemo v maternico.

V primerih, ko je prisotna ženska neplodnost in normalna kakovost semena partnerja, izvedemo KLASIČNI POSTOPEK ZUNAJTELESNE OPLODITVE (postopek IVF).

Vsaki jajčni celici dodajamo pripravljeno seme po kapljicah v epruveti z gojiščem.

Semenčice se vežejo na zono pelucido jajčne celice, preidejo fiziološke procese kapacitacije, akrosomske reakcije in oplodijo jajčno celico.

V primerih moške neplodnosti (slaba kvaliteta semena, semenčice iz mod ali nadmodka) in predhodnih neuspešnih poskusov postopka IVF pa izvedemo NEPOSREDNI VNOS SEMENČICE V CITOPLAZMO JAJČNE CELICE (postopek ICSI oz. tako imenovana mikromanipulacija). S tem postopkom pod invertnim mikroskopom s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja s stekleno pipeto v vsako jajčno celico mikroinjiciramo po eno semenčico, s čimer obidem vse prepreke, torej zono pelucido in membrano jajčne celice, ki jih semenčice zaradi slabe kakovosti ne bi prešle. Prav tako obidem fiziološke procese semenčice, potrebne za oploditev jajčne celice (vezava na zono pelucido jajčne celice, kapacitacija, akrosomska reakcija). (7)



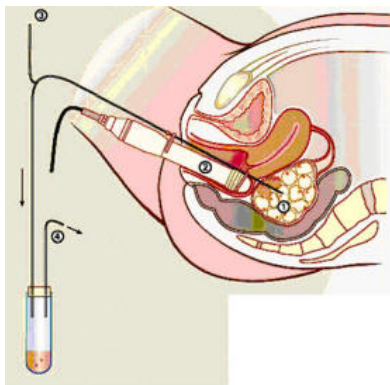
SLIKA 1: *In vitro* fertilizacija. (9)

Za zunajtelesno oploditev mora ženska imeti vsaj en delujoči jajčnik in maternico, zdravo maternično sluznico, mora biti telesno in duševno zdrava in v starosti, ki je primerna za rojevanje.

V primeru, da zaradi različnih vzrokov pri ženskah ni jajčnih celic, lahko postopek zunajtelesne oploditve izvedemo z darovanimi jajčnimi celicami. (7)

1.3.1 Ultrazvočna aspiracija jajčnih celic iz jajčnika

Ko je čas primeren, iz jajčnikov ultrazvočno izsesamo jajčne celice in izvedemo laboratorijski postopek zunajtelesne oploditve. Izsesavanje jajčnih celic poteka pod lokalno anestezijo. Z iglo na ultrazvočni sondi predremo steno nožnice in izsesamo jajčno celico iz foliklov v jajčniku. Vsak folikel je potrebno natančno prikazati na monitorju in ultrazvočno napravo namestiti tako, da smer punkcijske črte poteka skozi največji premer folikla. (10)



SLIKA 2: Ultrazvočno izsesavanja jajčnih celic. (11)

Delo poteka na 37° C v sterilnih pogojih v brezprašni komori. (7) Idealno mesto za punkcijo folikla je avaskularni stranski del folikla, saj lahko punkcija tam, kjer je stena stanjšana, povzroči defekt v steni, skozi katerega izteče folikularna tekočina z oocitom. (10) V punktatu, torej foliklovi tekočini, pod stereomikroskopom poiščemo jajčne celice. Te dobro speremo v gojišču, jim obrežemo kumulus in 1 ali 2 jajčni celici prenesemo v 1ml svežega gojišča v epruveti, ki vsebuje različne organske in anorganske snovi, ki omogočajo življenje jajčne celice, njeno oploditev in razvoj zarodka. Jajčne celice nato shranjujemo v inkubatorju v temi, na 37° C in v ozračju s 5 % koncentracijo CO₂.

Ob ultrazvočni punkciji pridobimo povprečno 8 jajčnih celic. Zelo pomembni sta kakovost in zrelost jajčne celice. Naravno degeneriranih in nezrelih je 15 % pridobljenih jajčnih celic. Od 2 do 3 ure po postopku aspiracije lahko pacientka odide domov. (7, 12)



SLIKA 3: Operacijska soba za punkcijo foliklov. (13)

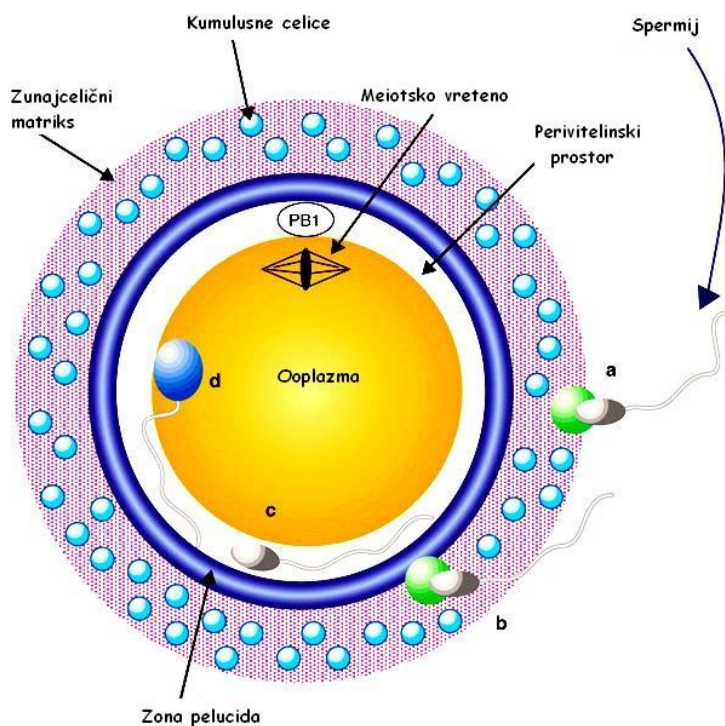
1.4 JAJČNA CELICA V POSTOPKU ZUNAJTELESNE OPLODITVE

V jajčnikih potekata dva procesa, in sicer dozorevanje jajčec in tvorba spolnih hormonov. V jajčnikih se tvori velika količina ženskih spolnih hormonov (estrogenov in progesterona) in majhna količina moških spolnih hormonov (androgenov). Tvorbo hormonov, rast foliklov in dozorevanje jajčec v jajčnikih uravnava hipotalamus, kjer nastaja gonadotropine spodbujevalni hormon, ki spodbuja hipofizo, da tvori hormone, ki delujejo na jajčnike. Hormona hipofize, ki delujeta na jajčnike in katerih sprostitve ureja hipotalamus, sta folikle stimulirajoči hormon (FSH) in luteotropni hormon (LH). FSH spodbuja folikle k rasti in sintezi estrogena, predvsem estradiola. Zvečano izločanje FSH izzove povečano tvorbo LH, ki je odgovoren za dozorevanje jajčne celice. Ko zrelo jajčece zapusti jajčnik, se na tem mestu oblikuje rumeno telesce (corpus luteum) in pod vplivom LH nastaja v njem progesteron. Pod vplivom progesterona se sluznica maternice zadebeli, postane močno prekrvavljena, sočna in tako pripravljena za sprejem oplojenega jajčeca. (14, 15)

1.4.1 Zgradba jajčne celice

Jajčna celica spada med največje celice pri živih organizmih. Obdaja jo plazmalema, imenovana oolema. Okrog jajčne celice in ooleme je glikoproteinski ovoj, imenovan zona pelucida (zona pellucida), ki ščiti jajčno celico med transportom skozi ženski genitalni trakt v naravnih pogojih in omogoča vezavo semenčic med oploditvijo. Med oolemo in zono pelucido je perivitelinski prostor, ki je napolnjen s tekočino. Gre za rezerve hranilnih snovi, podobne jajčnemu rumenjaku, ki sestoji iz proteinov in lipidov. Citoplazmo jajčne

celice imenujemo ooplazma, v kateri so glavni celični organeli mitohondriji, ki služijo celičnemu dihanju, endoplazmatski retikulum in Golgijev aparat. Jajčna celica je običajno obdana s številnimi plastmi celic, imenovanih kumulus (cumulus oophorus). Notranjo plast kumulusa pa imenujemo korona (corona radiata). (7)



SLIKA 4: Jajčna celica. (16)

1.4.2 Foliklova tekočina

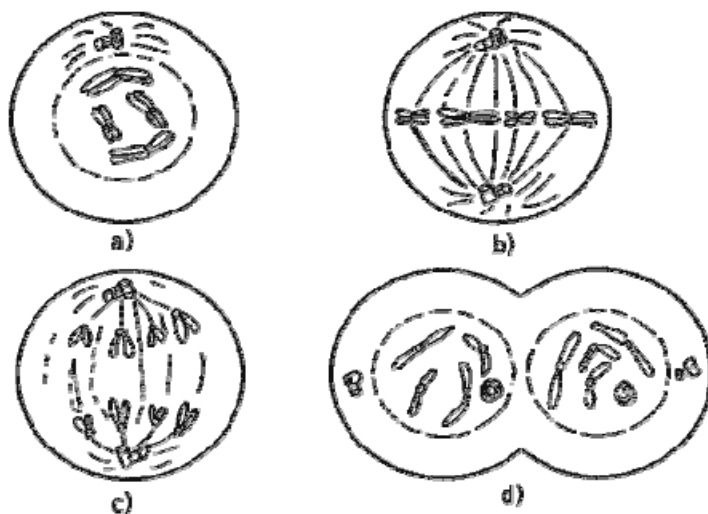
Substance, kot so proteini, hormoni (steroidi), rastne substance (citokini), metaboliti in toksini, se v foliklovo tekočino sproščajo iz celic granuloze ali po difuziji iz krvne plazme. Nekatere od teh substanc vplivajo na metabolizem folikla in so med drugim pomembne tudi za rast in dozorevanje jajčne celice. Foliklova tekočina pa olajšuje tudi transport jajčne celice skozi folikel med ovulacijo. (7)

1.4.3 Ocena zrelosti jajčnih celic

Zrelost jajčnih celic, pridobljenih v punktatu foliklove tekočine, ocenjujemo na osnovi videza celic korone radiate, kumulusa in celic granuloze, ki obdajajo jajčno celico in so pri zrelih celicah običajno velike in dobro razpršene.

Za natančno določitev zrelosti jajčne celice je potrebno mehansko odgrniti celice korone ali pa jih odstraniti z encimi hialuronidaze. Takim razgaljenim jajčnim celicam lahko natančno določimo zrelost in jih razdelimo v 3 skupine:

1. Jajčna celica v PROFAZI I ali GERMINALNI VEZIKEL je nezrela jajčna celica z vidnim jedrom in je nepravilne oblike, s temnejšim centrom in zrnato citoplazmo.
2. Jajčna celica v METAFAZI I je skoraj zrela. Končala se je profaza, jedro je razpadlo in izginilo, vendar nima izločenega 1. polarnega telesca.
3. Jajčna celica v METAFAZI II je zrela jajčna celica, ki je končala 1. meiotisko delitev in izločilo se je 1. polarno telesce. (7)



SLIKA 5: a)profaza, b)metafaza, c)anafaza, d)telofaza (17)

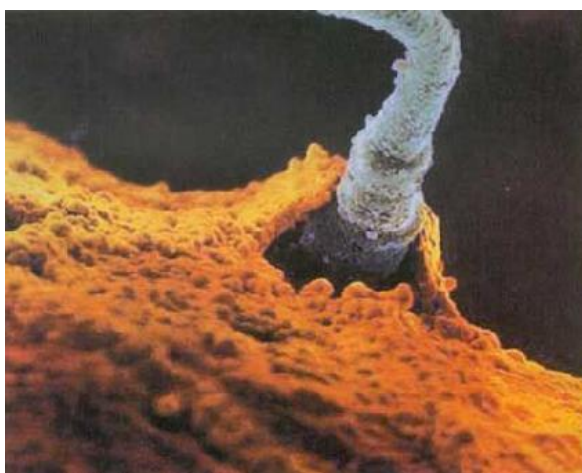
1.5 OPLODITEV

Proces oploditve se začne, ko semenčica s haploidnim številom kromosomov prodre skozi vse celične ovoje in se zlije z zono pelucido. Ta stik sproži, da akrosomski vezikel sprosti encime za razgradnjo zone pelucide, tako da semenčica lažje prodre do membrane jajčne celice. Glava semenčice se pritrdi na membrano jajčne celice in v jajčno celico pride v

procesu, podobnem fagocitozi. Samo semenčice z akrosomsko reakcijo se lahko spojijo z membrano jajčne celice in penetrirajo v jajčno celico.

Aktivacijo semenčice in jajčne celice ob oploditvi regulirajo znotrajcelične sekundarne obveščevalne substance, kot so Ca^{2+} , H^+ ioni, ciklični adenozinmonofosfat (cAMP) in inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3).

Za oploditev je dovolj, da je jajčna celica izpostavljena semenčicam eno uro. Semenčica se veže na zono pelucido jajčne celice zelo hitro in tudi vse ovoje jajčne celice preide približno tri ure po inseminaciji, tako da se pojavi v korteksu jajčne celice približno po štirih urah. (7)



SLIKA 6: Oploditev jajčne celice. (18)

1.5.1 Priprava semenčic na oploditev

Semenčica se pripravi na oploditev s tremi fiziološkimi procesi:

- ❖ KAPACITACIJO
- ❖ HIPERAKTIVACIJO
- ❖ AKROSOMSKO REAKCIJO

Pri kapacitaciji se s površine semenčic odstranijo substance nadmodka in semenske tekočine, ki preprečujejo akrosomsko reakcijo semenčic. V procesu kapacitacije pride do sprememb lipidne zgradbe membrane semenčic. Odstrani se holesterol. Med samim procesom kapacitacije pa se pri semenčicah pojavi tudi hiperaktivno gibanje.

Hiperaktivacijo semenčic prepoznamo po spremembah v gibanju, in sicer v zmanjšanem številu zamahov repa semenčic, zmanjšani linearnosti gibanja in povečanih lateralnih odmikih glave semenčic.

Med akrosomsko reakcijo pride do porasta kalcija, količine substance cAMP in dejavnosti encima adenilat ciklaze. Sprosti se vsebina akrosomskih veziklov. Ta proces je odvisen od koncentracije kalcija in koncentracije kalmodulina, ki je regulatorni protein, ki povečuje dejavnost encima adenilat ciklaze in aktivira fosfolipaze (te tvorijo proste maščobne kisline in fosfolipide, ki olajšajo zlitje membran). Iz akrosomskih veziklov se sprostijo encimi, kot so akrozin, hialuronidaza, za razgradnjo kumulusa, da semenčica lahko prodre do jajčne celice. (7)

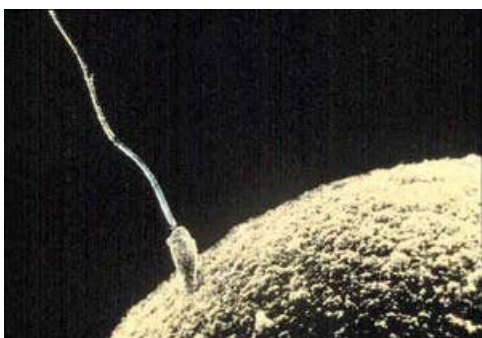
1.5.2 Vezava semenčice na zono pelucido jajčne celice

Na površini kapacitirajoče semenčice so receptorska mesta za vezavo na zono pelucido jajčne celice, ki vsebuje fukozo, galaktozo, D-manozo in acetilirane amino sladkorje.

Pomembno vlogo pri vezavi semenčice na zono pelucido jajčne celice ima akrozin.

V zoni pelucidi so trije pomembni glikoproteinski receptorji za vezavo semenčic, imenovani ZP1, ZP2 in ZP3. ZP3 je primarni receptor za vezavo semenčic.

Semenčica po akrosomski reakciji in hiperaktivaciji prodira skozi zono pelucido do membrane jajčne celice. (7)

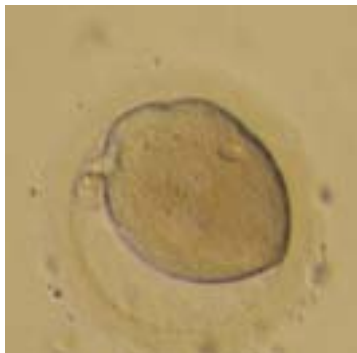


SLIKA 7: Semenčica vezana na zono pelucido jajčne celice. (19)

1.5.3 Aktivacija jajčne celice

V oolemi pride do sprememb električnega naboja in v jajčni celici močno poraste koncentracija kalcija. To privede do eksocitoze kortikalnih granul, kar spremeni kemično zgradbo zone pelucide, ki drugače ne prepušča semenčic.

Ponovno steče in se zaključi druga mejotska delitev, pri čemer ostane jajčni celici haploidno število kromosomov oziroma haploidna količina DNK. Na koncu mejoze se v perivitelinski prostor izloči sekundarno polarno telesce.(7)



SLIKA 8: Oplojena jajčna celica. (20)

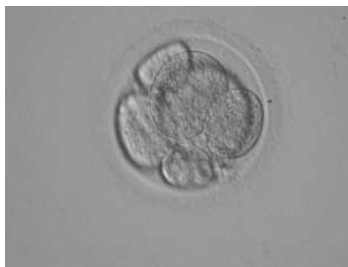
1.6 OCENA KAKOVOSTI ZARODKOV IN OPLODITVE

1.6.1 Ocena kakovosti zarodkov

Morfologija zarodkov je najpomembnejše merilo kakovosti zarodkov. Merimo jo glede na delež fragmentacije in obliko celic – blastomer. Fragmenti zmanjšujejo možnost vgnezditve zarodka v maternici, zato je obilna fragmentacija slab znak.

Na Ginekološki kliniki v Ljubljani ocenjujejo kakovost zarodkov po Boltonu:

- KAKOVOST 4 – to je zelo dobra kakovost zarodka, kjer so blastomere pravilno oblikovane in ni prisotne fragmentacije ali pa zelo malo,
- KAKOVOST 3 – tu gre za povečano kakovost zarodka, kjer so blastomere pravilno oblikovane, vendar je prisotne nekaj fragmentacije,
- KAKOVOST 2 – to je slaba kakovost zarodka, kjer so blastomere nepravilno oblikovane in je prisotne več fragmentacije,
- KAKOVOST 1 – to pa je zelo slaba kakovost zarodka, kjer so blastomere zelo slabo vidne in težko določimo njihovo obliko, prisotno pa je tudi veliko fragmentacije, ki lahko zapolnjuje ves volumen zarodka. (7)



SLIKA 9: Zaredek s šestimi blastomerami, 5. dan po oploditvi, povečava 200-krat, laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana. (21)

Vse zarodke shranimo v inkubatorju in jih še isti dan vnesemo v maternico s pomočjo plastičnega katetra in kanile.

Ob podaljšanem gojenju se zarodki kakovosti 4 in 3 bolje razvijejo do razvojne stopnje blastociste kot zarodki kakovosti 2 in 1. (7)



SLIKA 10: Blastocista povečana 200-krat, laboratorij za OBMP, Ginekološka klinika, Klinični center Ljubljana. (21)

1.6.2 Ocena oploditve

Dan po postopku IVF oziroma mikroinjiciranju semenčic s postopkom ICSI pod stereomikroskopom jajčnim celicam previdno odgrnemo kumulus s celicami granuloze in pogledamo, ali so oplojene. Oplojene jajčne celice prenesemo v sveže gojišče v posodicah. Jajčne celice s tremi pronukleusi (to je sekundarno polarno telo), ki so nepravilno oplojene, ali z več pronukleusi zavržemo. Jajčne celice z dvema polarnima telesoma tudi prenesemo v sveže gojišče. V inkubatorju v epruveh shranimo tudi vse neoplojene jajčne celice. (7)

1.7 SPONTANI POSTOPEK ZUNAJTELESNE OPLODITVE

POSTOPEK IVF

Normalni menstruacijski cikel uravnava zapleteno medsebojno delovanje več hormonov, ki se začne z gonadoliberinom (gonadotropin sproščujočim hormonom, GnRH), ki ga izloča hipotalamus v možganih in spodbuja delovanje hipofize. (1) V začetku folikularne faze nizka raven estradiola in progesterona povzroči, da se maternična sluznica degenerira, odlušči in izloči kot menstruacijska krvavitev. V prvi polovici folikularne faze rahlo povišana raven FSH spodbudi k rasti folikel. Proti koncu folikularne faze se raven estradiola, ki ga izločajo jajčniki, rahlo poveča in to spodbudi rast maternične sluznice. Z vrhom ravni FSH in LH se prične ovulacijska faza in jajčece se sprostijo od 16 do 32 ur po začetku vrha. V času vrha estradiol doseže najvišjo raven, medtem ko raven progesterona začne naraščati. Med lutealno fazo se raven LH in FSH zmanjša. Po sprostitvi jajčeca se pretrgani folikel zapre in začne tvoriti rumeno telo, ki izloča progesteron. Progesteron skupaj z estradiolom povzroča zadebelitev maternične sluznice. V primeru, da jajčece ni oplojeno, rumeno telo propade in ne proizvaja več progesterona. Tudi raven estradiola se zmanjša in začne se nov menstruacijski cikel. (22, 23)

Pri spontanem postopku zunajtelesne oploditve mora biti rast vodilnega folikla nadzorovana s pomočjo ultrazvoka in določanjem estrogenov. Šele ko je folikel dovolj velik in zrel, ga lahko aspiriramo. (7)

1.8 SPODBUJENA ZUNAJTELESNA OPLODITEV

1.8.1 Hormonsko spodbujanje jajčnikov

V prvi fazi postopka se pri ženski izzove rast večjega števila jajčnih celic v jajčniku. Ženska prejme hormonske injekcije gonadotropinov v kombinaciji z analogi gonadoliberinov. Njihov učinek je potrebno nadzorovati z določanjem količine estradiola v krvi in z ugotavljanjem števila in velikosti jajčnih foliklov.

Ko je premer foliklov v jajčniku vsaj 18 mm in je dokazana zadostna koncentracija estradiola v krvi, so izpolnjena merila za zorenje jajčnih celic s humanimi gonadotropini. Aspiracijo foliklov opravimo od 34 do 36 ur po vnosu humanih gonadotropinov. (7, 10, 24)

1.8.2 Prenos zarodkov

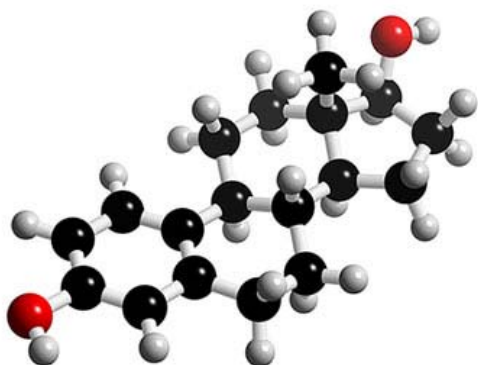
Za vnos v maternico uporabljamo različne katetre. Kateter napolnimo z gojiščem, nato pa v presledkih, ki jih delijo zračni mehurčki, posrkamo embrije. Zarodki morajo biti čim manj časa zunaj inkubatorja, zato napolnimo kateter šele, ko smo pacientki že vstavili kanilo v maternico. Uspeh implantacije prenesenih zarodkov je odvisen od števila zarodkov in njihove vitalnosti. (10)

1.9 STEROIDNI HORMONI

1.9.1 Estradiol

Estradiol je spolni hormon. Ni prisoten le pri ženskah, temveč tudi pri moških, saj predstavlja glaven estrogen pri ljudeh.

V plodnih letih največ estradiola pri ženskah izločajo granulozne celice jajčnikov z aromatizacijo androstendiona v estron, čemur sledi pretvorba estrona v estradiol s pomočjo encima 17 β -hidroksisteroid reduktaze. Manjšo količino estradiola proizvede tudi skorja nadledvične žleze in pri moških moda. Estradiol ne proizvajajo le spolne žleze. Pri obeh spolih se predhodni hormon, predvsem testosteron, pretvori z aromatizacijo do estradiola s pomočjo maščobnih celic. Proizvaja pa se tudi v možganih in stenah arterij. (25, 26)



SLIKA 14: Estradiol. (27)

1.9.1.1 Učinki estrogenov

Sodelujejo pri razvoju ženskih spolnih organov in ženskih sekundarnih spolnih znakov. Vplivajo na dozorevanje jajčec ter na pripravo ženskega reprodukcijskega sistema na sprejem semenčic in vgnezditev oplojenega jajčeca.

Povečajo osteoblastno aktivnost v kosteh, ki povzroči zaviranje rasti pri ženskah, prav tako pa tudi zgodnjo spojitev epifize in diafize dolgih kosti. Posledica tega je, da se rast pri ženskah ustavi že nekaj let prej kot pri moških. Povečajo tudi aktivnost osteoblastov, zadržujejo kalcij in fosfate in tako prispevajo k večji količini kostnega matriksa (preventiva osteoporoze). Povzročajo zadrževanje soli in vode. Imajo šibek anabolični učinek (rast dlak) in vplivajo na povečano nalaganje maščob v podkožnem tkivu, dojkah in v predelu zadnjice in stegnih. Imajo ugoden vpliv na razmerje lipidov v krvi, kar je vzrok za zaščitno vlogo estrogenov pri razvoju kardiovaskularnih in ateroskleroznih obolenj pri ženskah pred menopavzo. (28)

Kadar je raven estrogena previsoka, hkrati pa je prisotno premalo progesterona, privede to do prevelike in nezadržne stimulacije celic. Tako stanje lahko povzroči raka na rodilih in dojkah, razrast tumorjev, prizadetost imunskega sistema (lupus), nastanek fibroznega tkiva v prsih, depresije, razdražljivosti, migrene, prekomerne telesne teže, težave z uravnavanjem sladkorja v krvi, pri moških pa do zmanjšane produkcije sperme, povečane prostate in raka na prostati. (29)

Visoka raven estrogena vzdraži možganske tokokroge, da se začnejo hitreje vzpostavljati. Pospeši rast in razvoj nevronov ter v ženskih možganih okrepi središča za opazovanje, komunikacijo in intuicijo. Ženske, katerih jajčniki proizvajajo največ estrogena in progesterona, so bolj odporne na stres, ker imajo v možganih več serotoninskih celic (serotonin pomirja). Estrogen lahko pomaga, da pretok krvi v možganih ostane krepak dolgo v starost. (30)

1.9.1.2 Mehanizem delovanja

Estradiol vstopi v celico neovirano, saj je hidrofobna molekula in reagira s citoplazemskimi tarčnimi receptorji v celici. Ko se estrogen poveže z receptorjem, ligand lahko vstopi v jedro tarčnih celic in regulira gensko transkripcijo, ki vodi v nastanek mRNA. mRNA reagira z ribosomi, da proizvede specifične proteine, ki izražajo učinek estradiola na tarčne celice. Estradiol se dobro veže na oba estrogenska receptorja, ER α in ER β , glede na druge estrogene, ki se vežejo le na enega od teh receptorjev. (25)

1.9.1.3 Presnova

V plazmi je velika količina estradiola, vezanega na albumin in manj na globulin. Jetra konjugirajo estradiol in tvorijo sulfate in glukuronide. Nekaj teh konjugiranih produktov se

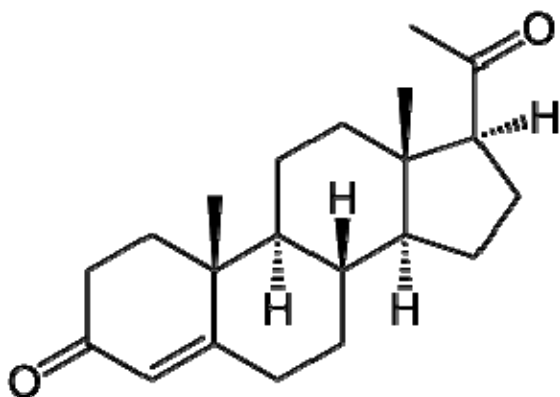
izloča z žolčem in se delno reabsorbira skozi črevesni trakt, večji del pa se izloča preko ledvic z urinom. (25)

1.9.1.4 Sinteza

Estradiol se tako kot drugi steroidi sintetizira iz holesterola. Androstendion je ključni posrednik. Frakcija androstendiona se pretvori v testosteron, ki nato opravi pretvorbo v estradiol s pomočjo encima aromataze. Druga možnost je, da je androstendion aromatiziran na estron, ki se nato pretvori v estradiol. (25)

1.9.2 Progesteron

Progesteron je C-21 steroidni hormon. Kot drugi steroidi je sestavljen iz štirih medsebojno povezanih cikličnih ogljikovodikov. Vsebuje dve keto in dve metilni skupini. Je hidrofoben. (31)



SLIKA 15: Progesteron. (32)

Progesteron nastaja predvsem v jajčnikih, tvorijo pa ga tudi možgani, periferni živci in v času nosečnosti posteljica. Luteinizirajoči hormon pospešuje tvorbo rumenega telesca, v katerem nastaja progesteron. Skupaj z estradiolom učinkovito sinergično vplivata na hipofizo z negativno povratno zvezo, saj po ovulaciji raven FSH in LH v krvi naglo pade. (31)

1.9.2.1 Učinki progesterona

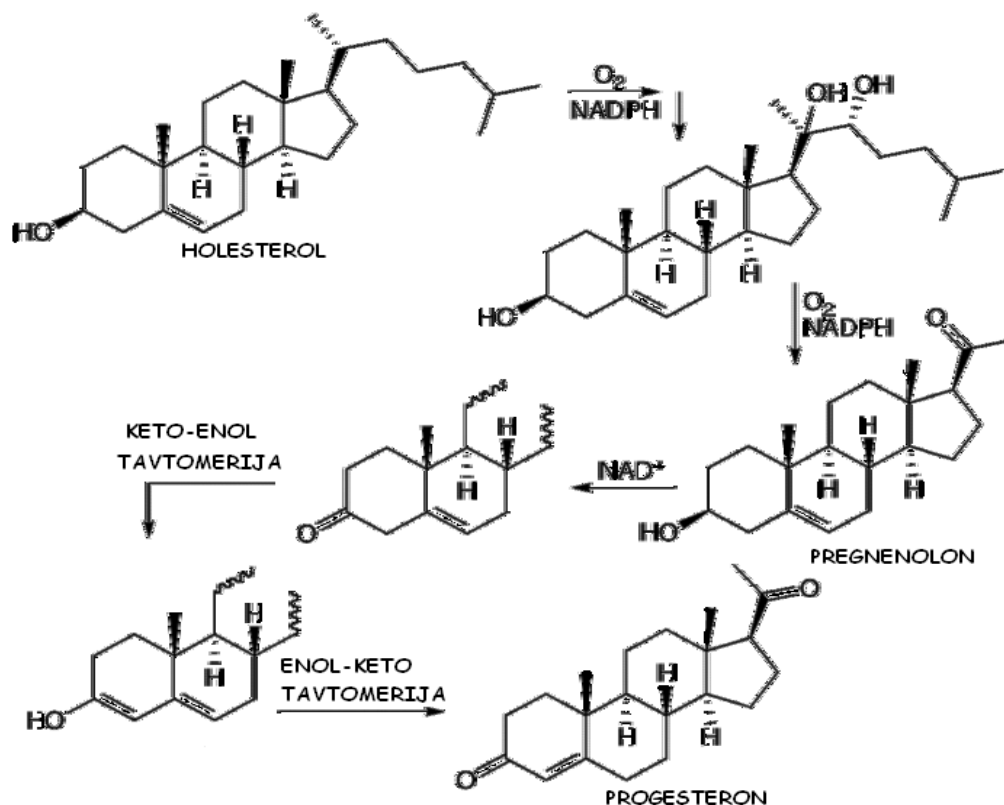
Njegova glavna naloga je, da maternico pripravi na nosečnost. Prav tako v nosečnosti skrbi za sproščanje materničnih mišic in s tem preprečuje prezgodnje popadke. V pričakovanju

nosečnosti količina progesterona vsak mesec v telesu strmo naraste in spodbudi maternično sluznico, da se odebeli. Če do nosečnosti ne pride, njegova količina strmo upade, to pa se izrazi v obliki menstruacijske krvavitve. Progesteron poleg tega vpliva tudi na delovanje možganov. Povzroča občutek umirjenosti. Progesteron zniža sladkor v krvi, kar sproži potrebo po sladkem, to pa lahko sproži simptome, kot so glavobol, občutljivost dojk in zastajanje tekočin. (33)

Progesteron ima termogenični učinek, tako telesna temperatura naraste za približno $0,5^{\circ}\text{C}$ ob ovulaciji in traja do konca ciklusa. Stimulira respiratorni center in lahko olajša bolečine. Povečuje izločanje vode in soli, lahko pa tudi zadržujejo sol in vodo. Progesteron ima tudi blag katabolični (razgradni) učinek na beljakovine v telesu. (28)

1.9.2.2 Sinteza

Progesteron se sintetizira iz pregnenolona, ki je derivat holesterola. 3-hidroksi skupina se pretvori v keto skupino in dvojna vez se premakne iz mesta C-5 na C-4. Progesteron je predhodnik mineralokortikoida aldosterona, po pretvorbi do 17-hidroksiprogesterona pa je predhodnik za kortizol in androstendion, le-ta se lahko pretvori v testosteron, estron in estradiol. (34)



SLIKA 16: Sinteza progesterona. (35)

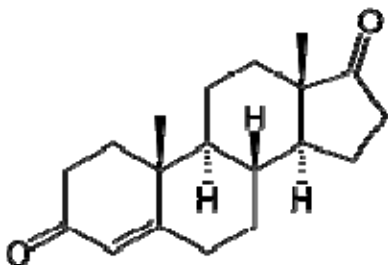
1.9.3 Androstendion

Je C-19 steroidni hormon, ki se sintetizira v nadledvični žlezi in spolnih žlezah obeh spolov. Androstendion se lahko izloča v plazmo in se v perifernem tkivu pretvori v testosteron in estrogen. Izvira iz pretvorbe dehidroepiandrosterona ali 17-dihidroksi-progesterona.

Androstendion se nadalje pretvori v testosteron ali estrogen. Pretvorbo v testosteron omogoča encim 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaza, medtem ko pretvorbo v estrogen (estron in estradiol) izvede encim aromataze.

Pred menopavzo nadledvične žleze in jajčniki proizvedejo približno polovico celotnega androstendiona. Po menopavzi pa se količina izločanega androstendiona razpolovi, predvsem zaradi zmanjšanega izločanja steroidov iz jajčnika. Izločanje nadledvičnega androstendiona uravnava ACTH (kortikotropin), izločanje spolnega androstendiona pa uravnava gonadotropin.

Pri ženskah androstendion sproščajo v kri teka celice. S tem nudi androstendion substrat za izločanje estrogena iz granulocitnih celic. Teka celice in celice granuloze delujejo skupaj, da proizvajajo estrogen. (36)



SLIKA 17: Androstendion. (36)

Androstendion je predhormon, čeprav se izloča iz testisov in nadledvične žleze. V perifernih tkivih poteka sprememba testosterona in androstendiona v estradiol oziroma estron. (10)

1.9.3.1 Učinki androstendiona

Uravnava razvoj moških sekundarnih spolnih znakov, androgeno in anabolno delovanje. Pred rojstvom omogočijo razvoj moške spolne žleze. Povzročajo pa tudi kožne

spremembe, kot so akne, poraščenost, povečujejo mišično maso in moč, zmanjšajo podkožno maščobo, odebelijo kosti in povečujejo eritropoezo. (37)

Androgeni hormoni specifično delujejo na spolne organe, vendar pa delujejo tudi na metabolizem, in sicer pospešujejo razgradnjo proteinov in zvišujejo retencijo dušika. (26)

Pomanjkanje androgenov pred 12. tednom nosečnosti pri moškem plodu povzroči nepopolni razvoj spolovil. Ustje sečnice se lahko razvije na spodnji strani penisa namesto na njegovem koncu ali pa se pri dečku razvijejo ženska spolovila (moški psevdohermafroditizem). Če se pojavi pomanjkanje v kasnejšem času nosečnosti, to lahko privede do nenormalno majhnega penisa ali pa, da se moda ne spustijo popolnoma v mošnjo. Če je ženski plod v zgodnji nosečnosti izpostavljen veliki koncentraciji androgenov, se spolovilo ne razvije normalno, saj je zunanje spolovilo maskulinizirano (ženski psevdohermafroditizem). Visoka raven androgenov pri ženskah včasih povzroči spremembe, kot so akne in ščetinasti lasje. Pri majhnih dečkih povečana koncentracija povzroči pospešeno rast. Vendar pa kosti zaradi prehitrega dozorevanja predčasno nehajo rasti, kar privede do nižje končne telesne višine. (22)

2 DELOVNA HIPOTEZA

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.

V raziskavo smo vključili neplodne pacientke, ki so bile zdravljene v postopku zunajtelesne oploditve in sicer v spontanem in spodbujenem ciklusu. V vsako skupino smo vključili 29 pacientk. Vse pacientke so imele tubarni vzrok neplodnosti, torej nepravilnosti na jajcevodih zaradi vnetij rodil. Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti možne razlike med spontanimi in spodbujenimi ciklusi pri pacientkah v postopku zunajtelesne oploditve z analizo serumskih in foliklovih koncentracij estradiola, progesterona in androstendiona. Estradiol in progesteron smo določali z metodo CLIA kemiluminiscenčno metodo, medtem ko smo androstendion določali z RIA radioimunskim testom.

Z raziskavo smo želeli ovrednotiti vrednost omenjenih laboratorijskih preiskav v klinični praksi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Oprema, testni kompleti in reagenti za kemiluminiscenčno metodo (CLIA) pri določanju progesterona

Za izvedbo kemiluminiscenčnega testa (CLIA) smo uporabili aparaturo LIAISON proizvajalca DiaSorin in ustrezne komercialne reagente za določanje progesterona.

Vsi reagenti so vloženi v posebna stojala – integrale (količinsko za 100 testov), ki vsebujejo:

- Magnetne delčke (2,3 ml), ki so obdani s protitelesi za progesteron. Dodan je tudi fosfatni pufer in <0,1 % natrijev azid.
- Konjugat (20 ml): progesteron je konjugiran z izoluminolnim derivatom. Dodan je tudi fosfatni pufer in <0,1 % natrijev azid.
- Kalibrator 1 (1,2 ml): vsebuje človeški serum brez hormonov, 0,1 % Proclin 300 in progesteron.
- Kalibrator 2 (1,2 ml): vsebuje človeški serum brez hormonov, 0,1 % Proclin 300 in progesteron.
- Pufer za redčenje vzorcev (2,0 ml): vsebuje človeški serum brez hormonov in 0,1 % Proclin 300.

Vsi reagenti so pripravljani za takojšnjo uporabo. Integrale z reagenti moramo shranjevati pri temperaturi od 2 do 8° C in v temi. Uporabni so le do datuma uporabe, ki je navedena na intervalih. Po uporabi morajo biti intervali z reagenti zapečateni s trakom, ki je na voljo v setu in nato shranjeni v LIAISON-u ali v temnem prostoru na temperaturi od 2 do 8° C. Kalibratorji morajo biti vrnjeni v temo na temperaturo od 2 do 8° C in primerno shranjeni so odprti obstojni štiri tedne. (3)



SLIKA 13: Aparatura LIAISON, proizvajalca DiaSorin. (38)

3.1.2 Priprava in redčenje vzorcev za določanje progesterona

Pred analiziranjem vzorcev moramo preveriti, da niso prisotni mehurčki. Vzorci so lahko sedem dni po vzorčenju shranjeni na od 2 do 8° C, nato pa na -20° C.

Za prvo testiranje vzorca je minimalni volumen 300 µl, pri naslednjih testiranjih pa še 75 µl. V primeru, da so bili vzorci zamrznjeni, jih moramo pred analizo odtajati in dobro premešati. Izogibati pa se moramo večkratnemu zamrzovanju in tajanju.

Vzorci, katerih koncentracije so presegle meritveno območje, lahko redčimo s pufrom za redčenje in ponovno analiziramo. Priporočeno redčenje je 1:10 (50 µl vzorca + 450 µl pufru za redčenje).

Meritveno območje

Aparatura LIAISON proizvajalca DiaSorin meri koncentracijo progesterona od 0,4 do 40,0 ng/ml. Vrednosti, ki so pod 0,4 ng/ml, morajo biti navedene kot < 0,4 ng/ml. Najvišja vrednost brez redčenja je 40,0 ng/ml. (3)

3.1.3 Oprema, testni kompleti in reagenti za kemiluminiscenčno metodo (CLIA) pri določanju estradiola

Za izvedbo kemiluminiscenčnega testa (CLIA) smo uporabili aparaturo LIAISON proizvajalca DiaSorin in ustrezne komercialne reagente za določanje estradiola.

Integrali z reagenti (količinsko za 100 testov) vsebujejo:

- Magnetne delčke (2,3 ml): prevlečeni so s protitelesi za estradiol. Dodan je tudi fosfatni pufer, površinsko aktivne snovi in 0,09 % natrijev azid.
- Konjugat (2 ml): estradiol je konjugiran z izoluminolnimi derivati. Dodan je MES pufer z površinsko aktivne snovi in 0,1 % Proclin 300.
- Preizkusni pufer (12 ml): citrat fosfatni pufer in 0,1 % Proclin 300.
- Pufer za redčenje vzorcev (14 ml): človeški serum brez hormonov in 0,1 % Proclin 300. Raztopine je dovolj za 50 redčenj (60 µl vzorca + 240 µl pufra za redčenje).
- Kalibrator 1 (3,5 ml): človeški serum brez hormonov, 0,1 % Proclin 300 in estradiol. Kalibratorja je volumsko dovolj za 5 kalibracij.
- Kalibrator 2 (3,5 ml): človeški serum brez hormonov, 0,1 % Proclin 300 in estradiol. Kalibratorja je volumsko dovolj za 5 kalibracij.

Vsi reagenti so pripravljene za takojšnjo uporabo. Integrali z reagenti so neodprti stabilni pri temperaturi od 2 do 8° C do datuma uporabe. Ne smemo jih zamrzniti. Integrali z reagenti ne smejo biti uporabljeni po pretečenem roku uporabe.

Po uporabi so lahko integrali z reagenti shranjeni v aparaturi LIAISON ali pa na temperaturi od 2 do 8° C. Primerno shranjeni so odprti uporabni 4 tedne. (3)



SLIKA 14: Imunokemijski analizator LIAISON, proizvajalca DiaSorin. (38)

3.1.4 Priprava in redčenje vzorcev za določanje estradiola

Pred samim analiziranjem vzorcev moramo preveriti, da ne vsebuje mehurčkov. Vzorci so lahko 5 dni po vzorčenju shranjeni na temperaturi od 2 do 8° C, nato pa na -20° C.

Minimalni volumen vzorca za prvo analiziranje je 400 µl in nato 200 µl za vsak naslednji estradiolski test.

V primeru, da je bil vzorec zamrznjen, ga moramo pred analiziranjem odmrzniti in dobro premešati.

Vzorci, katerih koncentracije so presegle meritveno območje, lahko redčimo s pufrom za redčenje vzorcev in ponovno analiziramo.

Priporočeno redčenje je 1:5 (60 µl vzorca + 240 µl pufru za redčenje).

Meritveno območje

Analizator LIAISON proizvajalca DiaSorin meri vsebnost estradiola v območju med 12 in 1100 pg/ml. Vrednosti, nižje od 12 pg/ml, so označene kot <12 pg/ml. Najvišja vrednost brez redčenja je 1100 pg/ml. (4)

3.1.5 Kalibracija aparature

Kalibracijo izvajamo:

- pri vsaki novi uporabi reagentov v intervalu,
- vsakih sedem dni,
- po vsakem servisiranju LIAISON analizatorja,
- če so vrednosti kontrole kakovosti izven dovoljenih območij. (3,4)

3.1.6 Oprema, testni kompleti in reagenti za radioimunski test (RIA) pri določanju androstendiona

Za izvedbo radioimunskega testa (RIA) smo uporabili ustrezne komercialne reagente za določanje androstendiona.

▪ Androstendion standardi:

Steklenička označena z A vsebuje 0 ng/mL androstendiona, 5 stekleničk, označenih od B do F, pa vsebuje približno 0.10, 0.30, 1.00, 3.00 in 10.00 ng/ml (od 0.34 do 24.50 nmol/l) androstendiona na osnovi pufru in Na-azid kot konzervans. Neodprto hranimo

na od 2 do 8° C do roka uporabe. Standard A moramo rekonstituirati z 1 ml deionizirane vode, standarde B do F pa z 0,5 ml deionizirane vode. Po rekonstituiranju tri tedne lahko hranimo na od 2 do 8° C, za daljše obdobje pa jih shranimo na 20° C ali manj.

▪ Androstendion [I-125] reagent:

Steklenička s 55ml vsebuje <5 µCi (185 kBq) [I-125]-označenega androstendiona v pufri, ki temelji na proteinu in Na-azid. Shranjen mora biti na od 2 do 8° C do roka uporabe.

▪ Vdolbinice označene z anti-androstendion imunoglobulinom:

100 plastičnih vdolbinic vsebuje zajčji anti-androstendion imunoglobulin pritrjen na notranjo stran stene vsake vdolbinice. Hranimo na od 2 do 8° C do roka uporabe.

▪ Androstendion kontrole:

Dve steklenički stopnje I in II vsebujeta nizke in visoke koncentracije androstendiona na osnovi pufra in Na-azid kot konzervans. Neodprto hranimo na od 2 do 8° C do roka uporabe. Vsebino moramo rekonstituirati z 0,5 ml deionizirane vode. Po rekonstituiranju imamo lahko tri tedne shranjeno na od 2 do 8° C, za daljše obdobje pa hranimo na -20° C ali manj. (38)

Uporaba reagentov:

- standardna krivulja mora biti vključena v vsako preiskavo,
- med seboj ne smemo mešati reagentov iz drugih setov,
- reagentov, ki so pretečeni, ne smemo uporabljati,
- pred analizo moramo reagente stabilizirati na sobno temperaturo (~25° C),
- standardi in kontrole morajo biti pred uporabo nežno premešani.

3.1.7 Priprava vzorcev za določanje androstendiona

Serum ali plazma morata biti shranjena do 24 ur na od 2 do 8° C, pri daljšem obdobju shranjevanja pa morata biti na -20° C. Ponavljajoče zamrzovanje in tajanje lahko v vzorcu znižata raven androstendiona. Hemoliziranih in lipemičnih vzorcev ne smemo uporabljati. Izmerjene vrednosti v plazmi (heparin in EDTA) so lahko nižje kot v serumu. (38)

3.2 METODE

3.2.1 Kemiluminiscenčni imuno test za določanje progesterona

3.2.1.1 Postopek testa

Z metodo kvantitativno določamo količino progesterona v vzorcih. Specifična protitelesa za progesteron so povezana z magnetnimi delci (trda faza), progesteron pa je povezan z izoluminolnimi derivati. Med inkubacijo se progesteron loči od proteina in tekmuje z označenim (labeliranim) progesteronom za mesto na protitelesu. Po inkubaciji nevezan material odstranimo s spiranjem. Po dodatku reagenta se prične kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobni signal izmerimo v relativnih svetlobnih enotah (RLU) in je obratno sorazmeren s koncentracijo progesterona v vzorcu, kontroli in kalibraciji.

Postopek testa v analizatorju:

- vzorce, kalibratorje in kontrolo vstavimo v reaktivne module,
- v reaktivne module dodamo magnetne delce in kroglice,
- inkubiramo,
- spiramo z izpiralnim pufrom,
- dodamo zaganjalni reagent in merimo količino oddane svetlobe.

Spremljati moramo temperaturo v laboratoriju v času, ko se je začela kalibracija in ko smo dobili rezultate analiziranih vzorcev. Temperatura se ne sme spremeniti za več kot $\pm 1^\circ \text{C}$.

Interpretacija rezultatov

LIASON analizator avtomatsko preračuna koncentracije progesterona v vzorcih.

Koncentracije so preračunane v ng/ml. Če želimo spremeniti rezultate v nmol/l, moramo vrednost izraženo v ng/ml pomnožiti s 3,18.

$$\text{ng/ml} * 3,18 = \text{nmol/l}$$

3.2.1.2 Kontrola kakovosti

Kontrolo kakovosti je priporočljivo izvesti enkrat na dan uporabe aparature. LIAISON Progesteron kontrolni set je dobro opremljen glede na zahteve kontrole kakovosti. Kontrola mora biti vključena na koncu vsakega naslednjega nosilca z vzorcem ali še pogosteje.

Kadar je kontrola izven zahtevanega območja, je ponovno potrebno izvesti kalibracijo in kontrolni test. (3)

3.2.1.3 Referenčno območje

LIAISON Progesteron preizkus je bil izvršen na vzorcih 125 moških, 32 žensk po menopavzi in 90 nosečih žensk, razdeljenih v trimester. Vse osebe so bile predvideno zdrave.

Vzorci v času menstrualnega ciklusa so bili odvzeti od 32 predvideno zdravih žensk, starih od 22 do 53 let. Vzorci teh žensk so se zbirali tedensko v obdobju petih tednov.

Vsi vzorci so bili testirani za LH, FSH, estradiol in progesteron z opremo, ki je trenutno na trgu. (3)

PREGLEDNICA I: Vrednosti za določanje referenčnega območja analizatorja LIAISON
Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturu LIAISON)

Populacija	Povprečne vrednosti progesterona	Osrednje 95 % območje
Moški (125)	1.2 ng/ml	<0.4 – 2.7 ng/ml

Populacija: Ženske	Srednje vrednosti progesterona	Absolutno območje
Folikularna faza (66)	1.0 ng/ml	<0.4 – 2.5 ng/ml
Luteinska faza (93)	7.5 ng/ml	1.2 – 24.8 ng/ml
Srednja luteinska faza (26)	13.6 ng/ml	5.5 – 24.8 ng/ml
Oralna kontracepcija (32)	0.9 ng/ml	<0.4 – 2.1 ng/ml
Menopavza (30)	0.6 ng/ml	<0.4 – 1.4 ng/ml
Nosečnice:		
Prvo trimesečje (30)	28.6 ng/ml	15.8 – 46 ng/ml
Drugo trimesečje (30)	39.6 ng/ml	15.6 – 74 ng/ml
Tretje trimesečje (30)	84.6 ng/ml	45 – 143 ng/ml

3.2.1.4 Funkcionalna občutljivost

Definirana je kot koncentracija, pri kateri koeficient variacije (%) preseže 20 %.

Funkcionalna občutljivost analize za določanje natančnosti profila je 1,0 ng/ml.

3.2.1.5 Natančnost

Šest vzorčkov z vsebovanimi različnimi koncentracijami analita je bilo izmerjenih dvakrat na dan - po dve meritvi. To je potekalo 20 operativnih dni in na ta način sta bili določeni ponovljivost in obnovljivost analize. (3)

PREGLEDNICA II: Vrednosti za določanje ponovljivosti analizatorja LIAISON

Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

PONOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (ng/ml)	5.6	25.6	7.3	17.7	3.6	10.0
Standard deviacije (ng/ml)	0.5	1.2	0.5	0.8	0.3	0.5
Koeficient variacije (%)	9	5	6	4	8	5

PREGLEDNICA III: Vrednosti za določanje obnovljivosti analizatorja LIAISON

Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

OBNOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (ng/ml)	5.6	25.6	7.3	17.7	3.6	10.0
Standard deviacije (ng/ml)	0.6	1.4	0.7	1.2	0.5	0.6
Koeficient variacije (%)	11	6	9	7	15	6

3.2.1.6 Linearnost razredčin

Točnost preizkusa je bila preverjena z redčitvenim testom. Trije vzorci pacientov so bili serijsko redčeni in analizirani.

Rezultati so bili analizirani kot linearna regresija pričakovanih in opazovanih vrednosti. (3)

Enačba je: **Izmerjene vrednosti = Pričakovane vrednosti (1.01) – 0.13 ; r = 0,99**

PREGLEDNICA IV: Vrednosti za določanje linearnosti razredčin (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

RAZREDČINA	PRIČAKOVANE KONCENTRACIJE (ng/ml)	IZMERJENE KONCENTRACIJE (ng/ml)	IZMERJENE/PRIČAKOVANE (povprečje)
Redčitev		33.1	93 %
1:2	16.5	16.9	
1:4	8.3	8.5	
1:8	4.1	3.9	
1:16	2.1	1.5	

Redčitev		23.8	88 %
1:2	11.9	10.5	
1:4	5.9	6.2	
1:8	3.0	2.6	
1:16	1.5	1.1	
Redčitev		23.5	111 %
1:2	11.8	12.3	
1:4	5.9	6.5	
1:8	2.9	3.2	
1:16	1.5	1.8	

3.2.1.7 Ponovljivost

Serumu 3 žensk in 3 moških je bil dodan progesteron. Izmerjene vrednosti so bile nato primerjane z vrednostim človeškega seruma brez hormonov, kateremu je bila dodana enaka količina progesterona. S tem je bila določena ponovljivost. Povprečje ponovljivosti je 101 %.

PREGLEDNICA V: Vrednosti za določanje ponovljivosti analizatorja LIAISON
Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

	IZMERJENE KONCENTRACIJE (ng/ml)	PRIČAKOVANE KONCENTRACIJE (ng/ml)	IZMERJENE/PRIČAKOVANE = % PONOVLJIVOSTI
1. ženska-redč.	7.9		
Nizek dodatek	13.4	14.1	95
Srednji dodatek	21.7	20.5	106
Visok dodatek	37.4	33.6	111
povprečje			104
2. ženska	4.5		
Nizek dodatek	10.0	11.0	91
Srednji dodatek	15.7	16.8	93
Visok dodatek	27.7	27.8	100
povprečje			95
3. ženska	5.4		
Nizek dodatek	13.2	13.1	101
Srednji dodatek	19.3	21.0	92
Visok dodatek	36.6	34.6	106
povprečje			100
1. moški	1.6		
Nizek dodatek	8.7	7.8	112
Srednji dodatek	15.5	14.2	109
Visok dodatek	32.0	27.3	117
povprečje			113
2. moški	1.6		
Nizek dodatek	7.7	8.1	95
Srednji dodatek	13.1	13.9	94

Visok dodatek	24.7	24.9	99
povprečje			96
3. moški	1.4		
Nizek dodatek	9.1	9.1	100
Srednji dodatek	16.7	17.0	98
Visok dodatek	29.8	30.6	97
povprečje			98
		Povprečje ponovljivosti	101 %

3.2.1.8 Specifičnost

Križna reaktivnost LIAISON Progesteron preizkusa je bila ocenjena z dodatkom snovi, ki so omenjene v tabeli, v kontrolni serum. Vzorci so bili analizirani, križna reaktivnost pa je bila preračunana z uporabljenimi enačbo:

$$\% \text{ križne reaktivnosti} = (\text{vrednosti analize} / \text{koncentracije dodanih substanc}) * 100$$

PREGLEDNICA VI: Vrednosti za določanje specifičnosti analizatorja LIAISON Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturu LIAISON)

KRIŽNI REAKTANTI	TESTIRANE KONCENTRACIJE (ng/ml)	% KRIŽNE REAKTIVNOSTI
Kortizol	1000	0.3
DHEA-S	100	0.0
17-hidroprogesteron	100	3.9
Kortikosteron	1000	0.7
Danazol	100	0.1
11-dezoksikortikosteron	1000	0.8
11-deoksikortizol	1000	0.3
Estradiol	100	0.1
Pregnenolon	1000	0.2
Testosteron	100	1.6
20 α -dihidroprogesteron	1000	0.2

3.2.1.9 Moteče snovi

Študije o potencialno motečih snoveh so pokazale, da hemoliza (do 600 mg/dl), bilirubinemija (do 25 mg/dl) ali holesterolemija (do 500 mg/dl) analize niso motili. Tudi človeška protitelesa proti mišjemu antigenu (HAMA) do 360 ng/ml niso bila moteča. Povišana vrednost trigliceridov, glede na normalno raven, pa je lahko moteča. (3)

3.2.2 Kemiluminescenčni imuno test za določanje estradiola

Estradiol je močan estrogen, ki ga izločata jajčnika. Cirkulira pretežno vezan na spolni hormon, povezan z globulinom.

Prvotno ga proizvajajo jajčniki, prav tako ga proizvaja tudi skorja nadledvične žleze in v času nosečnosti posteljica (placenta).

Pri moških so glavni vir moda. Nenormalno povišana vsebnost estradiola je lahko pokazatelj tumorja na modih in ginekomastijo pri moških.

Estradiol zaustavlja proizvodnjo folikularno stimulativnega hormona (FSH). Poleg ultrazvoka pa je raven estradiola tudi dober pokazatelj nosečnosti.

3.2.2.1 Postopek testa

Določanje prisotnosti estradiola v človeškem serumu in plazmi temelji na kemiluminiscenčnem imuno testu, ki ima dva koraka. Specifična protitelesa za estradiol so povezana z magnetnimi delci (trdo fazo), preiskovalnim pufrom in kontrolo, kalibrator ali vzorec pacienta pa je združen za inkubacijo. Med inkubacijo se estradiol odcepi od proteina. Dodamo označen estradiol, ki tekmuje za vezavo na prosta mesta protiteles. Po inkubaciji nevezan material odstranimo s spiranjem. Nato dodamo zaganjalni reagent in kemiluminiscenčna reakcija se prične. Svetlobni signal izmerimo v relativnih svetlobnih enotah (RLU) in je obratno sorazmeren s koncentracijo estradiola v vzorcu, kontrolah in kalibratorjih.

Postopek testa v analizatorju:

- vzorce, kalibratorje in kontrolo vstavimo v reaktivne module,
- v reaktivne module dodamo magnetne delce in puffer,
- inkubiramo 21 minut,
- v reaktivni modul dodamo konjugat,
- inkubiramo 4 minute,
- spiramo s pufrom za spiranje,
- dodamo zaganjalni reagent in merimo količino oddane svetlobe.

Interpretacija rezultatov:

LIAISON analizator avtomatsko preračuna koncentracije estradiola v vzorcih.

Koncentracije so izražene v pg/ml (1 pg/ml = 3,67 pmol/l).

3.2.2.2 Kontrola kakovosti

Kontrola kakovosti je potrebno izvesti enkrat na dan uporabe aparature. LIAISON kontrole so predvidene za spremljanje možne odpovedi reagentov. Kadar je kontrola kakovosti izven zahtevanega območja, je ponovno potrebno izvesti kalibracijo in kontrolni test. (4) Tudi vzorce moramo ponovno analizirati, rezultatov pa ne smemo posredovati pacientom, dokler niso vrednosti v pričakovanih območjih.

3.2.2.3 Pričakovane vrednosti

95 % opazovano območje

PREGLEDNICA VII: Vrednosti za določanje specifičnosti analizatorja LIAISON
Progesteron (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

Populacija	Povprečne vrednosti estradiola	Opazovano 95 % območje
Moški (134)	23 pg/ml	*nz – 56 pg/ml
Normalne ženske		
Folikularna faza (75)	45 pg/ml	*nz – 112 pg/ml
Periovulatorno obdobje (30) ± 3 dni	111 pg/ml	36 – 251 pg/ml
Luteinska faza (75)	70 pg/ml	31 – 136 pg/ml
Nezdravljena menopavza (48)	14 pg/ml	*nz – 45 pg/ml
Menopavza (52)	117 pg/ml	25 – 406 pg/ml
Hormonska kontracepcija (55)	29 pg/ml	*nz – 95 pg/ml

*nz - nezaznavne

3.2.2.4 Analitična občutljivost

Je definirana kot minimalna vrednost koncentracije snovi, ki jo zaznamo z reagentom in v našem primeru znaša ≤ 12 pg/ml.

3.2.2.5 Natančnost

Šest vzorčkov z vsebovanimi različnimi koncentracijami analita je bilo izmerjenih dvakrat na dan po dve meritvi. To je potekalo 20 operativnih dni in na ta način sta bili določeni ponovljivost in občutljivost preizkusa.

PREGLEDNICA VIII: Vrednosti za določanje ponovljivosti analizatorja LIAISON

Estradiol (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

PONOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (ng/ml)	55	82	149	274	462	825
Standard deviacije (ng/ml)	5.0	3.8	7.9	9.5	43.8	63.1
Koeficient variacije (%)	9.1	4.6	5.3	3.5	9.5	7.6

PREGLEDNICA IX: Vrednosti za določanje obnovljivosti analizatorja LIAISON Estradiol

(DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

OBNOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (ng/ml)	55	82	149	274	462	825
Standard deviacije (ng/ml)	8.1	7.8	10.1	15.1	41.4	82.7
Koeficient variacije (%)	14.7	9.5	7.0	5.5	9.0	10.0

Šest vzorčkov, ki so vsebovali različne koncentracije višje od 1100 pg/ml, je bilo redčenih in pomerjenih v petih dneh po 4 meritve. S tem sta bili določeni ponovljivost in obnovljivost preizkusa.

PREGLEDNICA X: Vrednosti za določanje ponovljivosti analizatorja LIAISON Estradiol

(DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

PONOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	20	20	20	20	20	20
Povprečje (ng/ml)	1480	2808	3935	1480	2538	4537
Standard deviacije (ng/ml)	109.5	224.5	343.9	107.4	149.1	427.9
Koeficient variacije (%)	7.8	8.0	8.7	7.3	5.9	9.4

PREGLEDNICA XI: Vrednosti za določanje obnovljivosti analizatorja LIAISON Estradiol
(DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

OBNOVLJIVOST	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	20	20	20	20	20	20
Povprečje (ng/ml)	1480	2808	3935	1480	2538	4537
Standard deviacije (ng/ml)	103.6	310	375.9	175.7	312.9	645.3
Koeficient variacije (%)	7.4	11	9.6	11.9	12.3	14.2

3.2.2.6 Redčitveni test

Šest vzorčkov pacientov je bilo redčenih in analiziranih. Rezultati so bili interpretirani kot linearna regresija pričakovanih in izmerjenih vrednosti.

Enačba je:

$$\text{Izmerjene vrednosti} = 1.1 (\text{Pričakovane vrednosti}) + 2 \quad ; R = 0,98$$

3.2.2.7 Specifičnost

Križna reaktivnost preizkusa je bila ocenjena z dodatkom potencialnih križnih reaktantov, ki so omenjeni v tabeli, v kontrolni serum. (4)

PREGLEDNICA XII: Vrednosti za določanje specifičnosti analizatorja LIAISON
Estradiol (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

KRIŽNI REAKTANTI	TESTIRANE KONCENTRACIJE (ng/ml)	% KRIŽNE REAKTIVNOSTI
Mesterolone	50000	0,0 %
DHEA-S	50000	0,0 %
Etisteron	500	0,0 %
11-ketotestosteron	500	0,0 %
Estriol	50	0,0 %
Norgestrel	50	0,0 %
Estron	5	-0,8 %
Androstendion	100000	0,0 %
Danazol	100000	0,0 %
Testosteron dekanat	100000	0,0 %
Deksametazon	100000	0,0 %
Kortikosteron	100000	0,0 %
Progesteron	100000	0,0 %
17-hidroksiprogesteron	100000	0,0 %
Kortizol (hidrokortizon)	100000	0,0 %
Kortizon	10000	0,0 %
5 α -dihidrotestosteron	10000	0,0 %

Etiokanolon	10000	0,0 %
Testosteron	10000	0,0 %
DHEA	10000	0,0 %
Estriol-3-sulfat	10000	0,0 %
Prednizon	10000	0,0 %
11-dezoksikortikosteron	10000	0,0 %
Pregnenolon	10000	0,0 %
Androstendion	1000	0,0 %
17 α -estradiol	1000	0,0 %
Etinilestradiol	1000	0,0 %
17 α -metil-19-nortesteron	1000	0,0 %
Pregnanetriol	1000	0,0 %
Ekvilin	100	0,0 %
17 α -estradiol-3-sulfat	100	0,0 %
17 β -estradiol-3 β -D-glukuronid	100	0,0 %
17 β -estradiol-17(β)-D-glukuronid	100	0,1 %
17 β -estradiol-17-propionat	100	0,0 %
Noretindron	100	0,0 %
17 β -estradiol-3-sulfat-17-glukuronid	100	0,0 %
19-nortestosteron	100	0,1 %
Estron-3-glukuronid	100	0,1 %
Ekvilenin	10	-0,2 %
Estron natrijev sulfat	10	0,6 %
17 β -estradiol-17-valerat	10	0,0 %
Aldosteron	10000	0,0 %
Androstendiol	10000	0,0 %

3.2.2.8 Ponovljivost

Šest kliničnih in pripravljenih vzorčkov z visokimi koncentracijami in šest kliničnih vzorčkov z nizkimi koncentracijami, ki so imeli zadosten volumen, je bilo izbranih za večkratno analiziranje.

Vzorci za določanje ponovljivosti so bili pripravljani z mešanjem definiranih vzorcev z visokimi in nizkimi koncentracijami. Analizirani so bili vsaj štirje.

PREGLEDNICA XIII: Vrednosti za določanje ponovljivosti analizatorja LIAISON

Estradiol (DiaSorin navodila za aparaturo LIAISON)

	PRIČAKOVANE KONCENTRACIJE (pg/ml)	IZMERJENE KONCENTRACIJE (ng/ml)	% PONOVLJIVOSTI
Visoke redčitve		593	
2H : 1L	425	405	98
1H : 1L	324	287	89

1H : 2L	232	195	84
Nizke redčitve		55	
povprečje			90
Visoke redčitve		742	
2H : 1L	499	517	104
1H : 1L	374	419	112
1H : 2L	250	285	114
Nizke redčitve		7.3	
povprečje			110
Visoke redčitve		660	
2H : 1L	451	539	119
1H : 1L	344	467	136
1H : 2L	237	336	142
Nizke redčitve		28.5	
povprečje			132
Visoke redčitve		517	
2H : 1L	349	393	113
1H : 1L	262	350	134
1H : 2L	175	257	146
Nizke redčitve		7.3	
povprečje			131
Visoke redčitve		777	
2H : 1L	349	456	87
1H : 1L	262	288	73
1H : 2L	175	177	66
Nizke redčitve		15.4	
povprečje			75
Visoke redčitve		602	
2H : 1L	415	383	92
1H : 1L	317	280	88
1H : 2L	223	183	82
Nizke redčitve		37.2	
povprečje			87
		Povprečje ponovljivosti	104 %

3.2.2.9 Moteče substance

Študije o potencialno motečih substancah so pokazale, da holesterol (do 1000 mg/dl), hemoliza (do 600 mg/dl), bilirubin (do 10 mg/dl) in trigliceridi (do 200 mg/dl) niso vplivali na preiskave. (4)

3.2.3 Radioimunski test za določanje androstendiona

3.2.3.1 Postopek testa

Postopek temelji na principu RIA testa, kjer gre za tekmovanje med radioaktivno označenim in neoznačenim antigenom za vezavo na znano število protiteles. Količina označenega androstendiona vezanega na protitelo je obratno sorazmerna količini prisotnega androstendiona. Ločitev vezanega in prostega antigena je dosežena s pretakanjem ali praznjenjem s protitelesi prevlečene površine.

Vsi reagenti morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Po rekonstituiranju standardov in kontrol moramo le-te nežno premešati. Standardi, kontrole in neznanke morajo biti analizirani v paralelkah.

- Označimo dve vdolbinice za končno štetje in vdolbinice za standarde, kontrole in neznanke.
- Odpipetiramo 50 μl rekonstituiranega standarda, kontrole in neznanke v dno vdolbinice.
- Takoj dodamo 500 μl Androstendion [I-125] reagenta v vse vdolbinice.
- Ročno premešamo nastavek z vdolbinicami.
- Vse vdolbinice inkubiramo v vodni kopeli na temperaturi $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ od 30 do 40 minut.
- Izpraznimo ali pretočimo vse vdolbinice, razen vdolbinice s končnim seštevkom, s sočasno inverzijo z gobastim nastavkom v radioaktivno odpadno posodo. Dobro pritrdimo vdolbinice na adsorbentni material in s tem dosežemo popolno drenažo in pustimo minimalno 2 minuti. Popivnamo vdolbinice, da odstranimo kapljice, prilepljene na obod, pred vrnitvijo k pokončni legi. Če vdolbinice nismo dovolj popivnali, lahko dobimo podvojene ali nepravilne rezultate.
- Preštevanje vseh vdolbinic v γ števcu 1 minuto. (38)

Interpretacija rezultatov:

Rezultati so bili preračunani z uporabo logaritmično-linearne krivulje.

Preračunamo povprečne vrednosti na minuto za vsak standard, kontrolo in neznanko:

$$\%B/T = \text{Povprečna končna vrednost} \times 100$$

$$B/Bo = \text{Povprečne vrednosti 0 ng/ml standarda} \times 100$$

V semi-log graf na y os nanesejo mejne vrednosti (cpm), %B/T ali B/Bo za standarde, na x os pa koncentracije androstendiona. Standardno krivuljo potegnemo skozi dobljene točke.

Določimo koncentracije androstendiona od povprečnih dvojnih vrednosti vsake kontrole in neznank iz standardne krivulje.

Če je vrednost vzorca višja kot najvišji standard mora biti vzorec primerno redčen z 0ng/ml standardom A in ponovno analiziran.

Vrednost vzorca nižja od najnižje vrednosti standarda mora biti prijavljena.

Rezultati so podani v ng/ml. Če želimo preračunati v nmol/l, moramo ng/ml pomnožiti z 3,45. (38)

3.2.3.2 Kontrola kakovosti

PREGLEDNICA XIV: Vrednosti za določanje kvalitete kakovosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE.

ŠT. VDOLBINIC	OZNAKE VDOLBINIC	MEJE (cpm)	POVPREČJE (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	ANDROSTENDION (ng/ml)
1,2	Končne vrednosti	82923 82845	82884			
	Standardi:					
3,4	A	32194 32537	32365	39.0	100.0	0.00
5,6	B	30670 28779	29725	35.9	91.8	0.10
7,8	C	24358 23815	24087	29.1	74.4	0.30
9,10	D	15467 16823	16145	19.5	49.9	1.00

11,12	E	8003 7791	7879	9.5	24.4	3.00
13,14	F	3490 3464	3477	4.2	10.7	10.00
	Kontrole:					
15,16	Stopnja I	15902 16634	16268	19.6	50.3	0.98
17,18	Stopnja II	5159 5514	5336	6.4	16.5	6.02

$$ED_{50} = 0.99 \text{ ng/ml}$$

3.2.3.3 Pričakovane vrednosti

Pričakovano je, da vsak laboratorij ugotovi oziroma uvede svoje pričakovane vrednosti. V neodvisnem laboratoriju so določili območja normalnih vrednosti za DSL ACTIVE RIA analizo.

PREGLEDNICA XV: Vrednosti za določanje pričakovanih vrednosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE.

POPULACIJA	ŠTEVILO OSEB	POVPREČJE (ng/ml)	OBMOČJE 2SD (ng/ml)
Moški	39	1.46	od 0.30 do 2.63
Ženske	49	1.54	od 0.10 do 2.99
Vse osebe	88	1.53	od 0.14 do 2.92

SD - standardne deviacije

PREGLEDNICA XVI: Vrednosti za določanje pričakovanih vrednosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE.

POPULACIJA	ŠTEVILO OSEB	POVPREČJE (ng/ml)	OBMOČJE 2SD (ng/ml)
Moški (od 20 do 40 let)	20	1.70	od 0.30 do 3.10
Ženske (od 19 do 40 let)	38	1.65	od 0.21 do 3.08

SD - standardne deviacije

Vrednosti v serumu:

PREGLEDNICA XVII: Vrednosti za določanje pričakovanih vrednosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE. (38)

POPULACIJA	ŠTEVILO OSEB	POVPREČJE (ng/ml)	OBMOČJE 2SD (ng/ml)
Moški	13	1.57	od 0.53 do 2.61
Ženske	19	1.41	od 0.37 do 2.44

SD- standardne deviacije

Vrednosti v plazmi:

PREGLEDNICA XVIII: Vrednosti za določanje pričakovanih vrednosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE.

POPULACIJA	ŠTEVILO OSEB	POVPREČJE (ng/ml)	OBMOČJE 2SD (ng/ml)
Moški	13	1.50	od 0.51 do 2.48
Ženske	19	1.31	od 0.34 do 2.28

SD - standardne deviacije

3.2.3.4 Analitična občutljivost

Definirana je kot minimalna zaznana vrednost, ki je preračunana na podlagi 2 standardnih deviacij 10 analiziranj 0 ng/ml Androstendion standarda in znaša 0,03 ng/ml.

3.2.3.5 Natančnost

Preračunana je bila na podlagi povprečja 12 analiziranj.

PREGLEDNICA XIX: Vrednosti za določanje natančnosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE.

VZOREC	ŠTEVILO VZORCEV	POVPREČJE (ng/ml)	STANDARDNA DEVIACIJA (ng/ml)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
I	12	0.71	0.04	5.6
II	12	2.32	0.10	4.3
III	12	7.22	0.20	2.8

Določena je bila na podlagi srednjih vrednosti povprečja dvojnih analiziranj 13 ločenih analiz.

PREGLEDNICA XX: Vrednosti za določanje natančnosti Radioimuno seta DSL-3800 ACTIVE. (38)

VZOREC	ŠTEVILO VZORCEV	POVPREČJE (ng/ml)	STANDARDNA DEVIACIJA (ng/ml)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)
I	13	0.61	0.06	9.8
II	13	2.01	0.12	6.0
III	13	6.17	0.43	7.0

3.2.3.6 Ponovljivost

Trem vzorcem (serum), ki vsebujejo različne koncentracije endogenega androstendiona, je bila dodana znana vrednost androstendiona. Ti vzorci so bili nato analizirani.

PREGLEDNICA XXI: Vrednosti za določanje ponovljivosti Radioimuno seta DSL-3800

ACTIVE.

Vzorec	Endogeni androstendion (ng/ml)	Dodan androstendion (ng/ml)	Pričakovane vrednosti (ng/ml)	Opazovane vrednosti (ng/ml)	Ponovljivost (%)
I	0.41	0.32	0.73	0.75	103
		0.99	1.40	1.58	113
		3.10	3.51	3.83	109
II	1.18	0.32	1.50	1.50	100
		0.99	2.17	2.59	119
		3.10	4.28	5.26	123
III	3.14	0.32	3.46	2.96	86
		0.99	4.13	4.77	115
		3,10	6.24	6.92	111

3.2.3.7 Linearnost redčenja

Trije vzorci (serum) so bili redčeni z 0 ng/ml androstendion standardom in bili pomerjeni.

PREGLEDNICA XXII: Vrednosti za določanje linearnosti redčenja Radioimuno seta

DSL-3800 ACTIVE. (38)

VZOREC	FAKTOR REDČENJA	PRIČAKOVANE VREDNOSTI (ng/ml)	OPAZOVANE VREDNOSTI (ng/ml)	PONOVLJIVOST (%)
I	/	/	5.10	/
	1:2	2.55	2.07	81
	1:4	1.27	1.25	98
	1:8	0.63	0.69	110
	1:16	0.31	0.27	87
	1:32	0.15	0.12	80
II	/	/	8.43	/
	1:2	4.21	4.14	105
	1:4	2.10	2.06	98
	1:8	1.05	0.93	89
	1:16	0.52	0.63	121
	1:32	0.26	0.28	108
III	/	/	2.01	/
	1:2	1.00	1.14	114
	1:4	0.50	0.53	106
	1:8	0.25	0.21	84
	1:16	0.12	0.12	100
	1:32	0.06	0.07	117

3.2.3.8 Specifičnost

Odstotek križne reaktivnosti je izražen kot koeficient koncentracij androstendiona in koncentracij reagirajočih sestavin pri 50 % vezavi 0 ng/ml Standarda A.

PREGLEDNICA XXIII: Vrednosti za določanje specifičnosti Radioimuno seta DSL-3800

ACTIVE. (38)

KRIŽNI REAKTANTI	% KRIŽNE REAKTIVNOSTI
Androstendion	100
Androsteron	0.33
17-hidroksiprogesteron	0.25
Kortizon	0.16
Izoandrosteron	0.10
Deoksikortizon	0.09
Etioholanon	0.08
5 α -dihidrotestosteron	0.08
Dehidroepiandrosteron (DHEA)	0.07
Progesteron	0.06
Kortikosteron	0.04
Kortizol	0.04
Estron	0.03
Pregnenolon	0.02
Holesterol	Nezaznan
DHEA-sulfat	Nezaznan
Estradiol	Nezaznan
Estirol	Nezaznan
17-hidroksipregnenolon	Nezaznan

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 29 pacientk v vsako skupino, torej spontano in spodbujeno zunajtelesno oploditev. Vključili smo pacientke s tubarnim vzrokom neplodnosti.

Koncentracije androstendiona, estradiola in progesterona smo določali v serumu in foliklih pacientk. Raven progesterona in estradiola smo določali s kemiluminiscenčno metodo CLIA, medtem ko smo vsebnost androstendiona določali z radioimunsko metodo RIA.

Rezultati spontanega cikla zunajtelesne oploditve:

Št. pacientk	PROG v serumu (nmol/l)	PROG v foliklih (nmol/l)	AND v serumu (nmol/l)	AND v foliklih (nmol/l)	E2 v serumu (nmol/l)	E2 v foliklih (nmol/l)
1	0,4	44855	3,2	96,1	0,32	9600
2	1,4	41520	5,9	110,9	0,61	6000
3	2,5	25440	3,4	95,5	0,31	5520
4	0,4	17040	4	144,2	0,34	3600
5	3,7	18720	7,2	102,8	0,65	3360
6	0,4	37680	3,7	111,1	0,65	2400
7	0,4	26750	4,6	115,2	0,32	1680
8	1,5	37750	3,8	107,9	/	2400
9	0,8	25750	9,3	85,7	0,34	7200
10	6,5	11250	4,1	115,6	0,55	2880
11	3,4	37750	5,2	112,5	0,51	6720
12	0,5	22750	5,3	97,6	0,31	11400
13	17,4	28000	13,4	103,3	0,45	13968
14	/	28250	/	95,6	/	14184
15	0,5	25750	3,7	125,9	0,33	15144
16	1,7	28500	7,6	117,4	0,45	7440
17	/	26750	/	110,6	/	5040
18	1,4	38200	7,4	116,7	0,72	1680
19	/	50160	/	113,5	/	3120
20	4,3	13200	4,5	140,4	0,38	13920
21	1,8	49680	4,9	106,2	0,42	12720
22	0,4	10080	4,1	131,1	0,42	7920
23	/	38640	/	120,7	0,54	8880
24	1,5	13200	11,7	129,2	0,74	12240
25	/	3120	/	99,2	/	4560
26	0,5	28560	7,2	112,8	0,41	10080
27	3,6	24960	7,8	132,9	0,52	13680
28	1,3	4560	6,7	75,2	0,61	2640
29	1,3	9120	6,7	135,7	0,61	6000

Rezultati spodbujenega cikla zunajtelesne oploditve:

Št. pacientk	Št. foliklov	PROG v serumu (nmol/l)	PROG v foliklih (nmol/l)	AND v serumu (nmol/l)	AND v foliklih (nmol/l)	E2 v serumu (nmol/l)	E2 v foliklih (nmol/l)
1	1	8,9	36000	6	106	3,52	6720
	2	8,9	54000	6	108,3	3,52	3840
	3	8,9	41280	6	105,9	3,52	4560
	4	8,9	19920	6	105,1	3,52	3840
	5	8,9	24960	6	104,4	3,52	6720
	6	8,9	25440	6	95,5	3,52	4560
2	1	2,2	34320	4,7	96	0,11	48
3	1	1,5	48720	4	107,7	0,41	2640
	2	1,5	37920	4	117,8	0,41	3600
4	1	5	21840	6,3	102,9	1,19	3840
	2	5	20640	6,3	97	1,19	3360
	3	5	62400	6,3	92,4	1,19	960
	4	5	40800	6,3	75,9	1,19	1200
	5	5	23280	6,3	99,6	1,19	1680
5	1	8	23280	4,6	82,2	5,27	3120
	2	8	21840	4,6	95,4	5,27	2640
	3	8	25200	4,6	90,2	5,27	1920
	4	8	41280	4,6	116,3	5,27	2640
	5	8	40560	4,6	110	5,27	1656
	6	8	19200	4,6	93,1	5,27	1704
	7	8	16320	4,6	91,4	5,27	1680
	8	8	19200	4,6	83,8	5,27	1440
6	1	/	51120	/	91,8	/	240
	2	/	36960	/	90,4	/	120
	3	/	22800	/	89,4	/	1200
	4	/	48240	/	104,9	/	720
	5	/	14640	/	85,1	/	744
	6	/	28080	/	101,6	/	1080
	7	/	74880	/	86,1	/	960
7	1	173,5	25000	17,7	101	6,99	1440
	2	173,5	26750	17,7	120,1	6,99	240
	3	173,5	26250	17,7	102,2	6,99	720
	4	173,5	28000	17,7	96,4	6,99	48
	5	173,5	22500	17,7	84,4	6,99	792
	6	173,5	25750	17,7	90,7	6,99	960
	7	173,5	/	17,7	/	6,99	/
8	1	7,8	/	5,5	/	3,11	/
	2	7,8	/	5,5	/	3,11	/
	3	7,8	/	5,5	/	3,11	/
	4	7,8	/	5,5	/	3,11	/
	5	7,8	/	5,5	/	3,11	/
	6	7,8	/	5,5	/	3,11	/
9	1	4,6	20000	7	89,2	6,52	1440

	2	4,6	27250	7	109	6,52	2160
	3	4,6	12500	7	93,7	6,52	2880
	4	4,6	26500	7	105,9	6,52	2640
	5	4,6	39750	7	109,8	6,52	2640
	6	4,6	15000	7	108,3	6,52	12288
	7	4,6	10000	7	89,6	6,52	4320
	8	4,6	21250	7	103,8	6,52	4560
10	1	2,3	28000	3,6	99,3	1,21	4320
	2	2,3	27000	3,6	93,6	1,21	5760
	3	2,3	37750	3,6	93,5	1,21	4080
	4	2,3	37250	3,6	92	1,21	2640
11	1	18	27000	5,8	89,1	4,25	1200
	2	18	37750	5,8	80,9	4,25	960
	3	18	27000	5,8	100,2	4,25	720
	4	18	25750	5,8	96,6	4,25	480
	5	18	17500	5,8	95,9	4,25	744
	6	18	2500	5,8	97,4	4,25	960
12	1	/	/	/	/	/	/
	2	/	/	/	/	/	/
	3	/	/	/	/	/	/
	4	/	/	/	/	/	/
	5	/	/	/	/	/	/
13	1	9,8	38750	9,1	110,8	2,31	13800
	2	9,8	40500	9,1	103	2,31	4800
	3	9,8	35000	9,1	102,8	2,31	2640
	4	9,8	34500	9,1	125,4	2,31	3840
	5	9,8	34750	9,1	116,9	2,31	3360
	6	9,8	33750	9,1	102,7	2,31	2400
	7	9,8	32750	9,1	102,6	2,31	4080
14	1	14,5	34250	14,7	113,1	5,85	5520
	2	14,5	30000	14,7	104,3	5,85	5760
	3	14,5	25750	14,7	123,3	5,85	2160
	4	14,5	27000	14,7	104,6	5,85	3600
	5	14,5	27500	14,7	116,1	5,85	3360
	6	14,5	27000	14,7	101,8	5,85	8400
	7	14,5	50400	14,7	111,5	5,85	1200
15	1	19,5	36720	7,7	91,7	6,01	1440
	2	19,5	40320	7,7	88,1	6,01	960
	3	19,5	25440	7,7	92,7	6,01	1200
	4	19,5	35520	7,7	95,9	6,01	2640
16	1	/	68400	/	102,5	/	9360
	2	/	30240	/	103,7	/	6480
	3	/	20400	/	111,9	/	6504
	4	/	39600	/	111,1	/	3840
	5	/	51360	/	100,2	/	6720
	6	/	47760	/	114,8	/	11760
17	1	10	61680	5,7	108,1	5,52	5040

	2	10	34560	5,7	106,9	5,52	2880
	3	10	51360	5,7	102,9	5,52	3360
	4	10	41760	5,7	109,7	5,52	2160
	5	10	70800	5,7	97,9	5,52	9840
	6	10	53520	5,7	117,8	5,52	6960
18	1	12,1	43440	8,2	98,7	5,23	6984
	2	12,1	36720	8,2	106,9	5,23	4080
	3	12,1	38400	8,2	97,2	5,23	3840
	4	12,1	65040	8,2	98,2	5,23	4560
	5	12,1	28560	8,2	103,6	5,23	4584
	6	12,1	55920	8,2	111,1	5,23	6720
	7	12,1	34800	8,2	113,3	5,23	4320
19	1	9,3	40080	9,6	123,3	5,28	6480
	2	9,3	66960	9,6	131,5	5,28	5280
	3	9,3	39120	9,6	137,7	5,28	11520
	4	9,3	50640	9,6	135,6	5,28	9840
20	1	11,2	/	9,4	/	7,17	/
	2	11,2	/	9,4	/	7,17	/
	3	11,2	/	9,4	/	7,17	/
	4	11,2	/	9,4	/	7,17	/
	5	11,2	/	9,4	/	7,17	/
	6	11,2	/	9,4	/	7,17	/
21	1	1,3	8640	4,1	89,1	1,42	1440
	2	1,3	19200	4,1	98,9	1,42	4320
	3	1,3	17520	4,1	107,3	1,42	3384
	4	1,3	22080	4,1	95,5	1,42	3360
22	1	6,4	54960	3,4	89,9	1,21	960
	2	6,4	54720	3,4	101,9	1,21	1200
	3	6,4	32880	3,4	101,1	1,21	480
23	1	6	59040	3,3	110,7	0,94	3600
	2	6	49440	3,3	109,2	0,94	1200
24	1	16,2	38400	17,5	95,8	7,15	4800
	2	16,2	30960	17,5	118,7	7,15	5280
	3	16,2	18720	17,5	109,5	7,15	9360
	4	16,2	25680	17,5	121,2	7,15	5520
	5	16,2	720	17,5	127,2	7,15	120
25	1	15,4	480	7,6	52,9	5,32	144
	2	15,4	960	7,6	74,5	5,32	72
	3	15,4	1200	7,6	109,6	5,32	96
	4	15,4	1440	7,6	86,4	5,32	48
26	1	7,4	38400	7,2	102,9	1,92	2400
	2	7,4	14400	7,2	92,3	1,92	3600
	3	7,4	7440	7,2	88,4	1,92	2880
	4	7,4	37440	7,2	105,2	1,92	1920
	5	7,4	2400	7,2	95,1	1,92	1440
	6	7,4	28320	7,2	97,2	1,92	3600
	7	7,4	28080	7,2	95,2	1,92	2400

27	1	/	37920	/	123,5	/	6480
	2	/	28080	/	112,3	/	2880
	3	/	38880	/	131,5	/	3600
	4	/	18000	/	102,6	/	4320
	5	/	52560	/	114,5	/	4800
	6	/	34560	/	120,9	/	3600
28	1	13,2	48720	8,2	97,3	3,71	1680
	2	13,2	35520	8,2	91,6	3,71	960
29	1	6,8	53520	6,4	120,8	4,12	1920
	2	6,8	67200	6,4	106,7	4,12	2208
	3	6,8	57600	6,4	119,5	4,12	2160
	4	6,8	24960	6,4	90	4,12	480
	5	6,8	51360	6,4	108,8	4,12	1680

Statistični rezultati koncentracij steroidnih hormonov pri spontani in spodbujeni zunajtelesni oploditvi v **serumu**:

PARAMETER	SPONTANI CIKLUS (n = 29)	SPODBUJENI CIKLUS (n = 29)	p
Progesteron (nmol/l)	2.4 ± 3.5	18.7 ± 38.0	<0.001
Estradiol (nmol/l)	0.4 ± 0.1	4.3 ± 2.1	<0.001
Androstendion (nmol/l)	6.1 ± 2.6	8.0 ± 4.0	<0.01

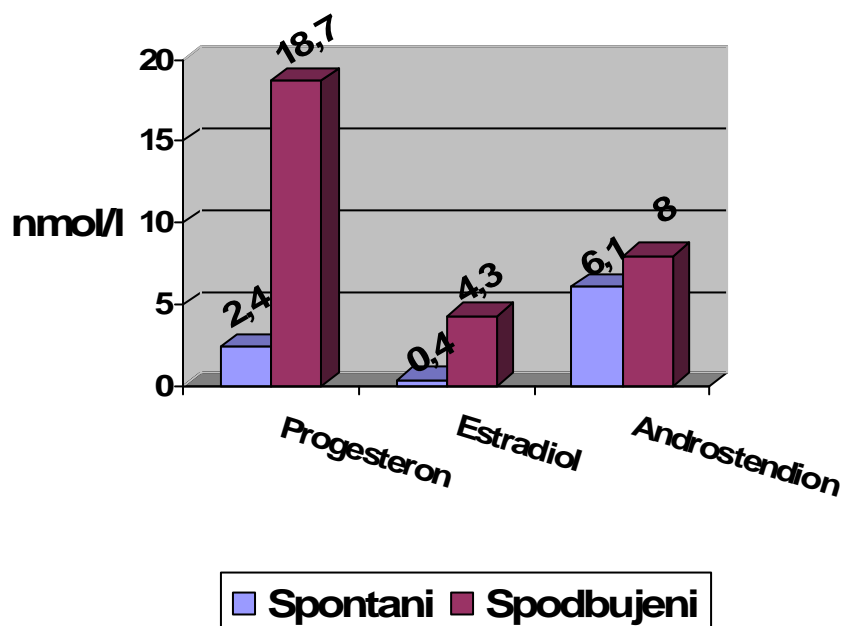
n - število foliklov

Statistični rezultati koncentracij steroidnih hormonov pri spontani in spodbujeni zunajtelesni oploditvi v **foliklovi tekočini**:

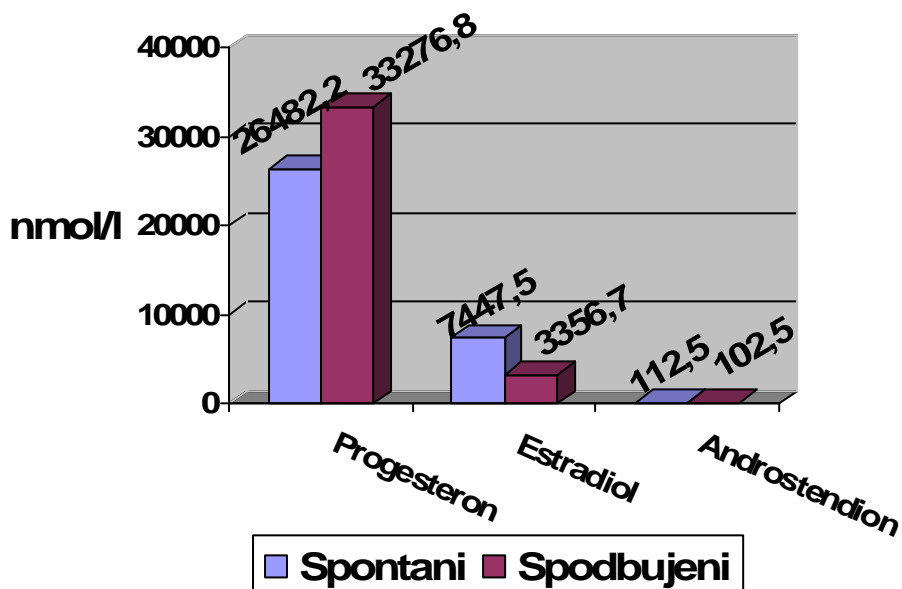
PARAMETER	SPONTAN CIKLUS (n = 29)	SPODBUJENI CIKLUS (n = 132)	p
Progesteron (nmol/l)	26482.2 ± 12942.7	33276.8 ± 15827.4	0.05
Estradiol (nmol/l)	7447.5 ± 4401.4	3356.7 ± 2742.8	<0.001
Androstendion (nmol/l)	112.5 ± 16.1	102.5 ± 12.8	0.001

n - število foliklov

Grafični prikaz razmerja koncentracij steroidnih hormonov v serumu med spontano in spodbujeno zunajtelesno oploditvijo:



Grafični prikaz razmerja koncentracij steroidnih hormonov v foliklovni tekočini med spontano in spodbujeno zunajtelesno oploditvijo:



5 RAZPRAVA

Izsledki raziskave kažejo, da so serumske koncentracije analiziranih steroidnih hormonov pri spodbujenem ciklusu bistveno večje kot pri spontanem ciklusu. Ta rezultat je bil tudi pričakovan, saj je k višji serumski koncentraciji vseh steroidnih hormonov prispeval vsak folikel posebej. Znano je, da se v spodbujenem ciklusu vedno razvije več foliklov, v povprečju približno osem. Tako lahko za nadzorovanje hormonskega spodbujevanja z gonadotropini, poleg ultrazvočne preiskave, s katerim na enostaven in neinvaziven način lahko določimo število in velikost foliklov, tvorno uporabljamo tudi laboratorijsko določevanje serumskih koncentracij steroidnih hormonov. Pri tistih ženskah, ki močneje reagirajo na spodbujanje z gonadotropini, lahko pričakujemo bistveno višje serumske koncentracije steroidnih hormonov kot pri tistih s slabšim odzivom. To lahko pojasnimo z izsledkom naše raziskave, saj je bila serumska koncentracija estradiola v spodbujenem ciklusu 10-krat višja kot v spontanem ciklusu, kjer se je razvil en sam folikel. Prisotnost večjega števila foliklov se je močno izražala tudi v serumski koncentraciji progesterona, ki je bila v spodbujenem ciklusu 8-krat višja v primerjavi s spontanim ciklusom. Najmanjša je bila razlika v serumski koncentraciji androstendiona med obema skupinama, vendar je bila tudi tukaj razlika statistično pomembna. V spodbujenem ciklusu je bila serumska koncentracija androstendiona višja skoraj za 50 %. Iz rezultatov analiz serumskih koncentracij estradiola, progesterona in androstendiona in ultrazvočnega spremljanja spodbujanja jajčnikov lahko zaključimo, da gre za dopolnilni metodi, od katerih vsaka dodatno pripomore k natančnemu nadzoru spontanega menstruacijskega ciklusa ali spodbujenega menstruacijskega ciklusa z gonadotropini.

Naslednji velik doprinos omenjene raziskave je ugotovitev, da so prisotne velike razlike med foliklovimi in serumskimi koncentracijami estradiola, progesterona in androstendiona tako pri spodbujenem kot tudi pri spontanem menstruacijskem ciklusu. Serumska koncentracija estradiola v spontanem menstruacijskem ciklusu je bila 0,4 nmol/l in v spodbujenem ciklusu 4,3 nmol/l, medtem ko je bila koncentracija estradiola v foliklih v spontanem menstruacijskem ciklusu 7447,5 nmol/l in v spodbujenem menstruacijskem ciklusu 3356,7 nmol/l.

Serumske koncentracije progesterona v spontanem menstruacijskem ciklusu znašajo 2,4 nmol/l in v spodbujenem menstruacijskem ciklusu 18,7 nmol/l, medtem ko so bile

foliklove koncentracije progesterona v spontanem menstruacijskem ciklusu 26482,2 nmol/l in v spodbujenem 33276,8 nmol/l.

Tudi koncentracije androstendiona so se razlikovale, in sicer so serumske koncentracije v spontanem menstruacijskem ciklusu znašale 6,1 nmol/l in v spodbujenem 8,0 nmol/l, medtem ko je bilo v foliklih v spontanem menstruacijskem ciklusu prisotno 112,5 nmol/l androstendiona in v spodbujenem 102,5 nmol/L.

Omenjene laboratorijske metode so se izkazale kot zelo učinkovite v klinični aplikaciji, saj so omogočile določanje tako nizkih koncentracij v serumu, kot tudi izjemno visokih v folikovi tekočini. Prav izsledki raziskave z izjemno visokimi koncentracijami steroidnih hormonov v foliklih so nazorno pokazali tudi na mesto sinteze steroidnih hormonov.

Progesteron in estradiol smo določali s kemiluminiscenčno metodo (CLIA), androstendion pa z radioimunsko metodo (RIA). Včasih so vse tri hormone določali z metodo RIA, vendar se je izkazalo, da je metoda CLIA enako zanesljiva in natančna za določanje progesterona in estradiola kot RIA. Obe metodi imata širok spekter meritve, tako da lahko določamo tako nizke koncentracije steroidnih hormonov kot tudi visoke. To je razvidno iz samih razlik v serumskih in foliklovih koncentracijah, saj so v serumu bistveno nižje kot v foliklih. Pri določanju estradiola s CLIA metodo je bilo meritveno območje brez redčenja od 12 do 1100 pg/ml. Meritveno območje za določanje progesterona s CLIA metodo brez redčenja pa je znašala od 0,4 do 40 ng/ml.

Tretji pomemben izsledek pa se je pokazal s statistično pomembnimi razlikami med foliklovimi koncentracijami estradiola, progesterona in androstendiona med spodbujenimi menstruacijskimi cikli in spontanimi menstruacijskimi cikli. Predvidevamo, da na to razliko lahko vpliva delovanje zdravil na granulozne celice v foliklih ali pa gre za časovno drugačno regulirano sintezo steroidnih hormonov.

Pri spontanem ciklusu telo samo spodbuja rast jajčne celice, medtem ko pri spodbujenem ciklusu ženska prejema hormonske injekcije gonadotropinov v kombinaciji z analogi gonadoliberinov in tako spodbuja rast in zorenje številnih foliklov. Vse to ima verjetno vpliv na granulozne celice, ki izločajo estrogen, ki skupaj s FSH stimulira izločanje LH, ki nato spodbuja izločanje progesterona. Vpliv LH v stimuliranem ciklusu je blokiran z analogi gonadoliberinov in njegovo delovanje za zorenje jajčnih celic nadomestimo s humanim menopavznim gonadotropinom. V foliklih je bila vsebnost progesterona večja pri

spodbujenih menstruacijskih ciklusih, medtem ko je bila vsebnost estradiola in androstendiona nižja. Visoka koncentracija estradiola v foliklih spontanega menstruacijskega ciklusa kaže na to, da je bila sinteza estradiola ob aspiraciji foliklov na vrhuncu, medtem ko je v vzpodbujenem menstruacijskem ciklusu verjetno že padala.

Zaključimo lahko, da sta CLIA metoda za določanje estradiola in progesterona in RIA metoda za določanje androstendiona primerni za analizo serumskih in foliklovih koncentracij steroidnih hormonov, kar jim daje klinično aplikativno uporabno vrednost.

6 SKLEP

Pri raziskavi smo opazili razlike med koncentracijami steroidnih hormonov pri spontani in spodbujeni zunajtelesni oploditvi.

Dobljeni rezultati so pokazali tudi razlike med foliklovimi in serumskimi koncentracijami steroidnih hormonov, saj so foliklove koncentracije bistveno večje kot serumske.

Menimo, da sta metodi CLIA in RIA dovolj občutljivi in natančni za določanje steroidnih hormonov in imata širok spekter meritve glede na razlike v koncentracijah.

7 LITERATURA

1. Dr. Lesley Hickin: Vodnik za vsako žensko. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2002. 146, 168.
2. Marjan Vozelj: Imunologija, Enciklopedijski priročnik. Ljubljana: DZS, 1996. 300, 301.
3. DiaSorin LIAISON Progesteron (310420), Instructions.
4. DiaSorin LIAISON Estradiol (310400), Instructions.
5. Tina Šmuc, Martina Ribič-Pucelj, Tea Lanišnik-Rižner: Molekularne osnove patogeneze endometrioze. Zdrav Vestn, 2008. 77:515-518. <http://vestnik.szd.si/st08-8/515-518.pdf> (12.1.2009)
6. Friedrich W. Dittmar, Hans-Peter Legal: Zrela ženska. Ljubljana: DZS, 1982. 51. Prevedel prof.dr.Vito Lavrič.
7. Irma Viriant-Klun, Helena Meden-Vrtovec, Tomaž Tomaževič: Od nastanka gamet do rojstva, Oploditev z biomedicinsko pomočjo. Radovljica: Didakta, 2002. 45-47, 53, 55, 66, 97, 98, 101-103, 112, 116-119, 125-128, 142-147, 151-154, 164, 165.
8. www.neplodnost.com/vzrokinneplodnosti.html (9.11.2008)
9. <http://health.howstuffworks.com/in-vitro-fertilization.htm> (21.11.2008)
10. Helena Meden-Vrtovec s sodelavci: Neplodnost. Ljubljana: CZ, 1989. 224, 225, 349, 350, 355.
11. http://www.ivf-amman.com/Eng_services_page.htm (21.11.2008)
12. Paul A. Rainsbury, MA, FRCOG and David A. Viniker MD, FRCOG: Practical Guide to Reproductive Medicine. The Parthenon Publishing Group, 1997. 158-163.

13. <http://www.neplodnost.com/nasiprostori.html> (9.11.2008)
14. Dr. Andreja Kocijančič: Knjiga o klimakteriju. Ljubljana: EWO, cop. 1996.18-20.
15. Bruce D. Shephard, Carroll A. Shephard,: Ženski zdravstveni vodnik. Ljubljana: DZS, 1987. 30. Prevedel dr.Vito Lavrič.
16. www.nature.com/fertility/content/fig_tab/ncb-nm-fertility57_f1.html (13.11.2008)
17. <http://old.ournet.md/~biochim/ghid/divcel/divcel.html> (26.11.2008)
18. <http://picasaweb.google.com/liugg70/SpermStory#5180749055705860226> (5.1.2009)
19. www.delo.si/clanek/60024 (9.11.2008)
20. www.gea-on.net/clanek.asp?ID=435 (21.11.2008)
21. Lili Bačer-Kermavner, Irma Virant-Klun, Brigita Valentinčič-Gruden, Jerneja Kmecl, Jožica Mivšek, Tomaž Tomaževič, Martina Ribič-Pucelj, Andrej Vogler, Eda Bokal-Vrtačnik, Branko Zorn, Sašo Drobnič, Bojana Pinter, Helena Meden-Vrtovec: Dvoplodna nosečnost po prenosu dveh zarodkov. Zdrav Vestn, 2003. 72: Supl. II: 69-72. <http://vestnik.szdz.si/st3-s2/st3-s2-069-72.htm> (12.1.2009)
22. Robert Berkow, Mark H. Beers, Andrew J. Fletcher: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo. Ljubljana: MK, 1998. 1076, 1091,1297-1298.
23. Mara Bresjanac, Marjan Rupnik: Patofiziologija s temelji fiziologije. Ljubljana: Inštitut za patološko fiziologijo, 2002. 161,162.
24. Peter R. Brinsden: A textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. The Parthenon Publishing Group, 1999. 583.

25. <http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol> (26.1.2009)
26. Peter Karlson: Biokemija. Ljubljana: DZS, 1980. 333,334.
27. www.3dchem.com/molecules.asp?ID=241 (26.1.2009)
28. <http://www.iskreni.net/nacrtovanje-druzine/59-zenski-spolni-hormoni-.html>
(26.1.2009)
29. <http://www.najnaj.net/hormoni.html> (27.1.2009)
30. Louann Brizendine: Ženski možgani. Ljubljana: Modrijan, 2007. 38,67. Prevedla Lili Potpara
31. E. Perilleux, B. Auselme, D. Richard: Biologija človeka. Anatomija, fiziologija, zdravje. Ljubljana: DZS, 1999. 322.
32. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Progesteron.svg> (26.1.2009)
33. <http://www.osebnost.si/clanki/preglej.php?id=281> (9.11.2008)
34. <http://de.wikipedia.org/wiki/Progesteron> (26.1.2009)
35. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosynthesis_progesterone.png (26.1.2009)
36. <http://de.wikipedia.org/wiki/Androstendion> (26.1.2009)
37. http://cfgbc.mf.uni-lj.si/people/damjana/teaching/steroidi_6_5_08.pdf (26.1.2009)
38. www.hexalab.co.yu/imunohemija.html (9.11.2008)
39. DSL-3800 ACTIVE Androstendione Coated-Tube Radioimmunoassay Kit
Instructions