

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KOVAČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA KOVAČIČ

**VPLIV HORMONSKEGA NADOMESTNEGA
ZDRAVLJENJA NA KONCENTRACIJO TESTOSTERONA
PRI POMENOPAVZNIH ŽENSKAH**

**THE INFLUENCE OF HORMONE
REPLACEMENT THERAPY ON THE CONCENTRATION
OF TESTOSTERONE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. in somentorstvomizr. prof. dr. Ksenije Geršak, dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. ter somentoriciizr. prof. dr. Kseniji Geršak, dr. med. za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Najlepša hvala pa moji družini, Tadeju ter prijateljem za vso podporo, ki ste mi jo nudili na moji študijski poti.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. in somentorstvomizr. prof. dr. Ksenije Geršak, dr. med.

Ljubljana, september 2010

Nina Kovačič

Predsednik komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	II
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC	IV
KAZALO GRAFOV	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD	1
1.1 RAZVOJNA OBDOBJA	1
1.2 MENSTRUACJSKI CIKLUS.....	2
1.3 SPOLNI HORMONI	4
1.3.1 ESTROGENI	5
1.3.2 ANDROGENI.....	6
1.4 MENOPAVZA	8
1.4.1 FIZIOLOGIJA MENOPAVZE	8
1.4.2 DEFINICIJE POJMOV V ZVEZI Z MENOPAVZO	9
1.4.3 POSLEDICE MENOPAVZE	10
1.5 HORMONSKO NADOMESTNO ZDRAVLJENJE.....	13
1.5.1 INDIKACIJE IN KONTRAINDIKACIJE	13
1.5.2 ZDRAVLJENJE	13
1.6 ANDROGENI IN MENOPAVZA	16
2 NAMEN	18
3 MATERIALI IN METODE.....	19

3.1	OPIS ZBIRANJA PREISKOVANK	19
3.2	OPIS JEMANJA VZORCEV	19
3.3	OPIS TERAPIJE IN ZDRAVILA.....	19
3.4	OPIS KEMILUMINISCENČNE IMUNOLOŠKE METODE.....	20
3.4.1	PRINCIP METODE	20
3.4.2	OPREMA IN REAGENTI	21
3.4.3	PRIPRAVA REAGENTOV IN VZORCEV	22
3.4.4	KALIBRACIJA APARATURE.....	23
3.4.5	POTEK ANALIZE.....	23
3.4.6	SPECIFIČNE KARAKTERISTIKE NAPRAVE LIASON	24
3.5	OPIS RADIOIMUNOLOŠKE METODE	28
3.5.1	PRINCIP METODE.....	28
3.5.2	REAGENTI	28
3.5.3	POTEK ANALIZE.....	29
3.5.4	KONTROLA KAKOVOSTI.....	30
4	REZULTATI.....	32
4.1	OVREDNOTENJE CELOTNE SKUPINE.....	32
4.2	OCENITEV POMENOPAVZNEGA STATUSA.....	32
4.3	OCENITEV SPREMEMB SERUMSKIH KONCENTRACIJ SPOLNIH HORMONOV PO HNZ.....	35
5	RAZPRAVA.....	41
6	ZAKLJUČEK	44
7	LITERATURA	45

KAZALO SLIK

SLIKA 1:	SPREMINJANJE RAVNI FSH TER LH SKOZI RAZLIČNA OBDOBJA ŽIVLJENJA (2).....	2
SLIKA 2:	SHEMA MENSTRUACIJSKEGA CIKLUSA (5).....	4
SLIKA 3:	BIOSINTEZA ESTROGENOV (6).....	6
SLIKA 4:	TOČKOVNI STOPENJSKI SISTEM V REPRODUKTIVNEM STARANJU (9).....	10
SLIKA 5:	SHEMA SENDVIČ KEMILUMINISCENČNE IMUNOLOŠKE METODE.....	21
SLIKA 6:	REAGENTI V INTEGRALU IN REAKCIJSKE POSODICE.....	22
SLIKA 7:	ANALIZATOR PROIZVAJALCA LIASION.....	24

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I:	RAZPOREDITEV NASTANKA ANDROGENOV PRI ŽENSKAH (9).....	7
PREGLEDNICA II:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI FSH ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	25
PREGLEDNICA III:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI LH ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	25
PREGLEDNICA IV:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI CELOKUPNEGA TESTOSTERONA ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	25
PREGLEDNICA V:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI ESTRADIOLA ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	26
PREGLEDNICA VI:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI DHEA-S ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOST.....	26
PREGLEDNICA VII:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ FSH ZA DOLOČITEV TOČNOSTI.....	26
PREGLEDNICA VIII:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ LH ZA DOLOČITEV TOČNOSTI.....	27
PREGLEDNICA IX:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ CELOKUPNEGA TESTOSTERONA ZA DOLOČITEV TOČNOSTI..	27
PREGLEDNICA X:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ ESTRADIOLA ZA DOLOČITEV TOČNOSTI.....	27
PREGLEDNICA XI:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ DHEA-S ZA DOLOČITEV TOČNOSTI.....	27
PREGLEDNICA XII:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI PROSTEGA TESTOSTERONA ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	31
PREGLEDNICA XIII:	REZULTATI MERITEV VZORCEV Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI ESTRONA ZA DOLOČITEV PONOVLJIVOSTI.....	31
PREGLEDNICA XIV:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ ESTRONA ZA DOLOČITEV TOČNOSTI.....	31
PREGLEDNICA XV:	REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ FSH, LH TER ESTRADIOLA PRI PREISKOVANKAH PRED TERAPIJO TER REFERENČNE VREDNOSTI TEH HORMONOV ZA POMENOPAVZNO OBDOBJE.....	32
PREGLEDNICA XVI:	VREDNOSTI KONCENTRACIJ HORMONOV PRED TERAPIJO IN PO NJEJ.....	35
PREGLEDNICA XVII:	P-VREDNOSTI PRI KOLMOGOROV-SMIRNOV TESTU ZA MERITVE KONCENTRACIJ HORMONOV PRED TERAPIJO IN PO NJEJ.....	36
PREGLEDNICA XVIII:	REZULTATI WILCOXONOVEGA TESTA PREDZNAČNIH RANGOV ZA MERITVE KONCENTRACIJ HORMONOV PRED TERAPIJO IN PO NJEJ.....	37

KAZALO GRAFOV

GRAF 1:	KONCENTRACIJE FSH PRI PREISKOVANKAH	33
GRAF 2:	KONCENTRACIJE LH PRI PREISKOVANKAH	33
GRAF 3:	KONCENTRACIJE ESTRADIOLA PRI PREISKOVANKAH	34
GRAF 4:	RAZPOREDITEV KONCENTRACIJ CELOKUPNEGA TESTOSTERONA PRI PACIENTKAH PRED ZDRAVLJENJEM IN PO NJEMU	38
GRAF 5:	RAZPOREDITEV KONCENTRACIJ PROSTEGA TESTOSTERONA PRI PACIENTKAH PRED ZDRAVLJENJEM IN PO NJEMU	38
GRAF 6:	RAZPOREDITEV KONCENTRACIJ ESTRADIOLA PRI PACIENTKAH PRED ZDRAVLJENJEM IN PO NJEMU	39
GRAF 7:	RAZPOREDITEV KONCENTRACIJ ESTRONA PRI PACIENTKAH PRED ZDRAVLJENJEM IN PO NJEMU	39
GRAF 8:	RAZPOREDITEV KONCENTRACIJ DHEA-S PRI PACIENTKAH PRED ZDRAVLJENJEM IN PO NJEMU	40

POVZETEK

Menopavza je zadnja menstruacija, z njo trajno preneha menstruacija zaradi izgube funkcije jajčnikov. Pojavi se okoli 50. leta starosti. Po menopavzi se spremeni hormonsko stanje. Zmanjša se koncentracija spolnih hormonov, estradiola in progesterona, zveča pa se koncentracija gonadotropinov, folikel stimulirajočega hormona in luteinizirajočega hormona. Predvsem drastičen padec koncentracije estradiola povzroči številne menopavzne težave, ki lahko pomembno vplivajo na kakovost življenja. Menopavzne simptome lahko uspešno lajšamo s hormonskim nadomestnim zdravljenjem, ki pa ima tudi nekatere neželene učinke. Predvsem peroralno zdravljenje povzroči porast vezavnih globulinov za spolne hormone, kar ima za posledico zmanjšanje koncentracije prostega testosterona, le-ta pa lahko vpliva na zmanjšanje libida žensk. V diplomski nalogi smo se odločili, da bomo ocenili serumske koncentracije gonadotropinov in vpliv hormonskega nadomestnega zdravljenja na koncentracijo testosterona ter ostalih spolnih hormonov pri pomenopavznih ženskah. Pri 17-ih preiskovankah smo s pomočjo kemiluminiscenčne ter radioimunološke metode izmerili koncentracijo prostega ter celokupnega testosterona, estradiola, estrona in dehidroepiandrosteron sulfata pred in po uvedbi peroralne estrogenske terapije. Pred terapijo smo izmerili tudi koncentraciji folikel stimulirajočega hormona in luteinizirajočega hormona za ocenitev pomenopavznega statusa preiskovank. V raziskavi smo ugotovili, da je po terapiji koncentracija celotnega testosterona ostala nespremenjena, prostega testosterona zmanjšana, estradiola in estrona povečana ter dehidroepiandrosteron sulfata zmanjšana. Potrdili smo, da ima hormonsko nadomestno zdravljenje vpliv na spremembo koncentracije prostega testosterona, ki ima vpliv na libido žensk. Zato je pomembno, da se pred zdravljenjem bolnice seznanijo z učinkom hormonskega nadomestnega zdravljenja na spolnost, z različnimi oblikami jemanja hormonskega nadomestnega zdravljenja in ustreznostjo odmerkov, hkrati pa se jim ponudi tudi obisk pri drugih strokovnjakih, saj libido ni odvisen zgolj od testosterona, temveč nanj vplivajo tudi drugi dejavniki.

ABSTRACT

Menopause is the last menstruation; its occurrence denotes the permanent cessation of menstruation due to the loss of ova function. It normally occurs in women around their 50s. After the menopause the hormonal state is changed. The concentration of two sex hormones, estradiol and progesterone, is reduced, whereas the concentrations of gonadotropins, the follicle-stimulating hormone and the luteinizing hormone are increased. The drastic fall of estradiol concentration is the main reason for many menopausal problems, which can have significant influence on the quality of life. The menopausal symptoms can be successfully alleviated with hormone replacement therapy, which, however, also has some negative effects. Particularly peroral treatment causes the increase of sex hormone-binding globulins, which results in the decrease of free testosterone concentration and this influences the decrease of women's libido.

This thesis deals with the evaluation of the serum concentration of gonadotropins and the influence of hormone replacement therapy on the concentration of testosterone and other sex hormones in postmenopausal women. The concentration of free and total testosterone, estradiol, estrone and dehydroepiandrosterone sulphate was measured before and after the introduction of peroral estrogen therapy with the help of chemiluminiscence and radioimmunological method; the research included 17 women. The levels of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone were measured before the therapy to estimate the postmenopausal statuses of the women, included in the research. The research has shown an increase in the concentration of estradiol and estrone, a decrease in concentration of free testosterone and dehydroepiandrosterone sulphate, whereas the concentration of total testosterone remained unchanged. The research thus confirmed that the hormone replacement therapy has an influence on the concentration of free testosterone, what also influences women's libido. Therefore it is of great importance that the patients are acquainted with the influence of hormone replacement therapy on sexuality prior to the start of the therapy, with different forms of undergoing hormone replacement therapy and with the adequacy of doses; at the same time the patients should be offered a visit at other experts, since libido does not only depend on testosterone, but is also influenced by other factors.

SEZNAM OKRAJŠAV

BSO – bolezni srca in ožilja

DHEA – dehidroepiandrosteron

DHEA-S – dehidroepiandrosteron sulfat

DHT – dihidrotestosteron

DNK – deoksiribonukleinska kislina

ER – estrogenski receptor

FSH – folikel stimulirajoči hormon

GnRH – gonadotropin sproščujoči hormon (gonadotropin releasing hormone)

HDL – lipoproteini visoke gostote (high density lipoprotein)

HNZ – hormonsko nadomestno zdravljenje

IMS – International Menopause Society

LDL – lipoproteini nizke gostote (low density lipoprotein)

LH – luteinizirajoči hormon

MKG – mineralna kostna gostota

NAMS – The North American Menopause Society

RNK – ribonukleinska kislina

RSD – relativna standardna deviacija

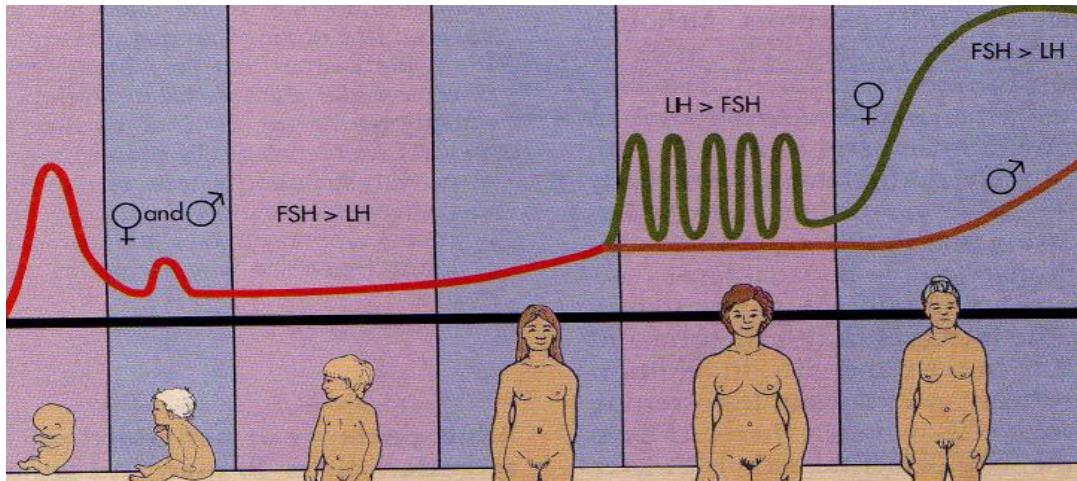
SHBG – vezavni globulini za spolne hormone (sex hormone binding globulin)

1 UVOD

1.1 RAZVOJNA OBDOBJA

Na podlagi skupnih značilnosti posameznikov, ki pripadajo določenim starostnim skupinam, delimo človekov razvoj na razvojna obdobja, in sicer na prednatalno obdobje, obdobje dojenčka in malčka, otroštvo, mladostništvo ter zgodnjo, srednjo in pozno odraslost (1).

Obdobje mladostništva se začne s puberteto. To je obdobje velikih sprememb v biološki rasti med desetim in dvanajstim letom starosti, ki je rezultat sinhronega delovanja centralnega živčnega sistema in sistema žlez z notranjim izločanjem. Sprožilni dejavnik za začetek pubertete je zelo povečana sinteza in izločanje gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH) iz hipotalamusa, ki vpliva na sintezo in sproščanje gonadotropinov iz sprednje hipofize, folikel stimulirajočega hormona (FSH) in luteinizirajočega hormon (LH). V otroštvu v hipofizi ne nastane skoraj nič FSH in LH, v puberteti pa se nastajanje zelo poveča, kar pomeni porast njunih plazemskih koncentracij. Hormona pri ženskah pospešujeta rast jajčnikov, dozorevanje jajčec in izločanje spolnih hormonov, estrogenov in progesterona. Tako se izoblikujejo sekundarni spolni znaki, povečajo se spolni organi, velikost in oblika telesa, relativna razmerja mišičja, maščevja in kosti, nastopijo spremembe v fizioloških reakcijah. V povprečju dekle pri enajstih letih dobi prvo menstruacijo, ki jo imenujemo menarha. Sledi reproduktivno obdobje. Ženska je v tej dobi zrela za materinstvo. Menstruacije se vrste v rednih presledkih, razen v primerih, če ženska zanosi. Postreproduktivno obdobje je obdobje opaznega staranja. Okoli 50. leta starosti (odvisno tudi od pogojev in navad, v katerih ženska živi) se pri ženskah pojavi menopavza, ki je zadnji menstruacijski cikel, sledi zmanjšanje delovanja jajčnikov, kar pomeni drastično zmanjšanje ravni spolnih hormonov ter značilen porast FSH in LH. Sposobnost zanositve se običajno zaključí že pred menopavzo (1, 2).



Slika 1: Spreminjanje ravni FSH ter LH skozi različna obdobja življenja (2)

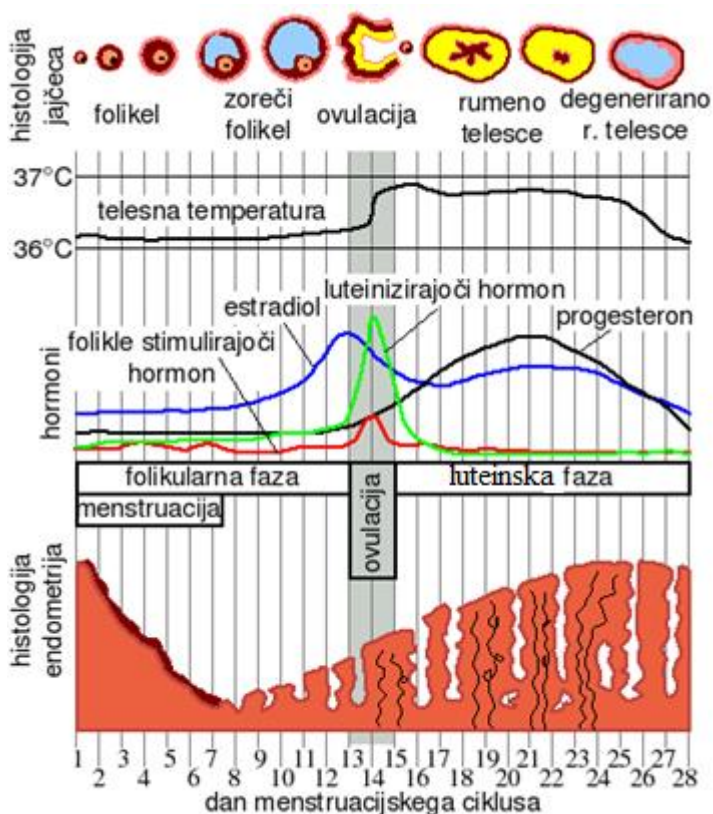
1.2 MENSTRUACJSKI CIKLUS

V reproduktivnem obdobju se ženski spolni organi ciklično spreminjajo, dolžina ciklusa je v povprečju 28 dni. Spremembe v toku ciklusa potekajo v vseh organih, ki imajo steroidne receptorje. Menstruacijski ciklus opredeljujemo glede na spremembe v jajčnikih in v sluznici maternice (endometrija). Spremembe v jajčnikih imenujemo ovarijski ciklus, ki ga sestavljata folikularna in luteinska faza. Spremembe v sluznici maternice imenujemo endometrijski ciklus, ki ga sestavljajo proliferacijska faza, sekrecijska faza ter menstruacija (3).

Menstruacijski ciklus se začne z nastopom menstruacije, ki traja 3 do 6 dni. V tem času se odlušči zgornji sloj maternične sluznice (endometrija), ki se v nadaljevanju ciklusa obnovi. Sledi folikularna faza, ki traja od zaključka krvavitve do sredine ciklusa (14. dan), ko nastopi ovulacija. Gonadotropin sproščujoči hormon (GnRH), ki ga izloča hipotalamus, stimulira hipofizo, da začne izločati hormona FSH in LH. V prvem delu ciklusa se v večji meri izloča FSH, ki vpliva na jajčnike tako, da povzroči rast 6 do 12 foliklov, med katerimi le en dozori in doseže največjo velikost ter tvori Grafov folikel. Ostali folikli propadejo v procesu atrezije. Folikel je sestavljen iz jajčeca, ki ga obdajajo granulozne celice in celice teka. Pod vplivom FSH granulozne celice proizvajajo estrogene iz androgenih prekurzorjev, ki so nastali v teka celicah pod vplivom LH. Povečana koncentracija estrogenov je odgovorna za proliferacijo endometrija (proliferacijska faza endometrijskega ciklusa). V tem času se maternična sluznica odebeli in vaskularizira (poveča se njena prekrvavitev). Poleg tega estrogeni povečajo sekrecijo mukusa v materničnem vratu (cerviksu), kar pomaga spermijem pri pravilni usmeritvi v maternico. Estrogen, ki ga

izločajo granulozne celice, povzročajo na teh celicah povečano nastajanje FSH receptorjev. To je pozitivna povratna zanka, saj povzroči, da so granulozne celice bolj občutljive na FSH. FSH in estrogen združena aktivirata LH receptorje na granuloznih celicah in stimulirata izločanje LH. Povečana koncentracija LH ter FSH vpliva na nastop ovulacije. Koncentracija LH se pred ovulacijo poveča 6 do 10-krat, koncentracija FSH pa 2 do 3-krat. Ovulacija je trenutek, ko Grafov folikel počne ter se iz njega sprosti jajčece. Pri normalnem menstruacijskem ciklusu nastopi 14 dni po menstruaciji. Nato sledi luteinska faza, kjer se pod vplivom LH celice počnega Grafovega folikla v procesu luteinizacije razvijejo v rumeno telesce (corpus luteum). Rumeno telo izloča steroidne hormone, več progesterona in manj estrogena, kar pa povzroča zmanjšano izločanje FSH in LH. Prav tako zaviranje izločanja FSH povzroča hormon inhibin, ki ga izločajo luteinske celice. Progesteron stimulira sekrecijske spremembe endometrija (sekretorna faza endometrijskega cikla). Nastane endometrij z močnim izločkom, ki vsebuje veliko prehranjevalnih substanc, kar omogoča vgnjezditev opljenega jajčeca. Če oploditev ne nastopi, se rumeno telesce zabrazgotini in sekrecija spolnih hormonov se ustavi. Prav ta nenaden upad koncentracije progesterona (tudi estrogenov) sproži menstruacijo. Med menstruacijo so koncentracije progesterona in estrogenov nizke, zato pride do ponovnega izločanja GnRH in ciklus se ponovno začne. Če pride do vgnjezditve jajčeca in s tem nosečnosti, rumeno telo še naprej sprošča progesteron in estrogene. Ti spolni hormoni preprečijo menstruacijo in povzročijo, da endometrij še naprej raste in shranjuje velike količine hranil. Po prvi tretjini nosečnosti pa to funkcijo prevzame posteljica in rumeno telesce propade (2, 4).

Usklajeno delovanje med ovarijskimi hormoni, hipofizo in hipotalamusom temelji na povratnih zankah. Povečano izločanje ovarijskih hormonov zavira delovanje hipotalamusa (GnRH) in hipofize (izločanje gonadotropnih hormonov FSH ter LH). To je mehanizem negativne povratne zanke. V preovulatornem obdobju pa velja tudi obratno, mehanizem pozitivne povratne zanke, in sicer višje vrednosti estrogenih hormonov delujejo spodbudno, tako da začne hipotalamus in hipofiza usklajeno izločati hormone, najprej GnRH, nato pa FSH in LH (2).



Slika 2: Shema menstruacijskega ciklusa (5)

1.3 SPOLNI HORMONI

Spolni hormoni so odgovorni za spolno diferenciacijo ter razvoj spolnih organov že pri zarodku, njihova koncentracija pa močno naraste v času pubertete (6). Vplivajo tudi na razvoj in vzdrževanje tkivnih struktur, ki so povezane z reprodukcijo. Glavne skupine spolnih hormonov so tri: estrogeni, gestageni in androgeni (7). Biosinteza spolnih hormonov poteka v klasičnih steroidnih tkivih (ženske in moške spolne žleze, skorja nadledvične žleze ter posteljica) ter v perifernih tkivih, kjer se spolni hormoni sintetizirajo iz neaktivnih prekurzorjev (6). Njihovo izločanje uravnava gonadotropna hormona sprednjega režnja hipofize FSH in LH. Po kemični zgradbi so maščobotopni steroidi, zato se po krvi prenašajo v obliki sulfata, ali se vežejo na vezavne globuline za spolne hormone – SHBG, ali na albumin. Vezavne beljakovine olajšajo prenos spolnih hormonov, v ciljno celico pa lahko vstopajo le nevezani, kjer se vežejo na steroidni receptor v celičnem jedru. Steroidni receptorji spadajo med t. i. od liganda odvisne transkripcijske dejavnike. Spolni hormon se veže na receptor, nato aktivna receptorska molekula z vezanim ligandom dimerizira. Ta kompleks se veže na specifično regijo DNK, ki je blizu promotorja ciljnega

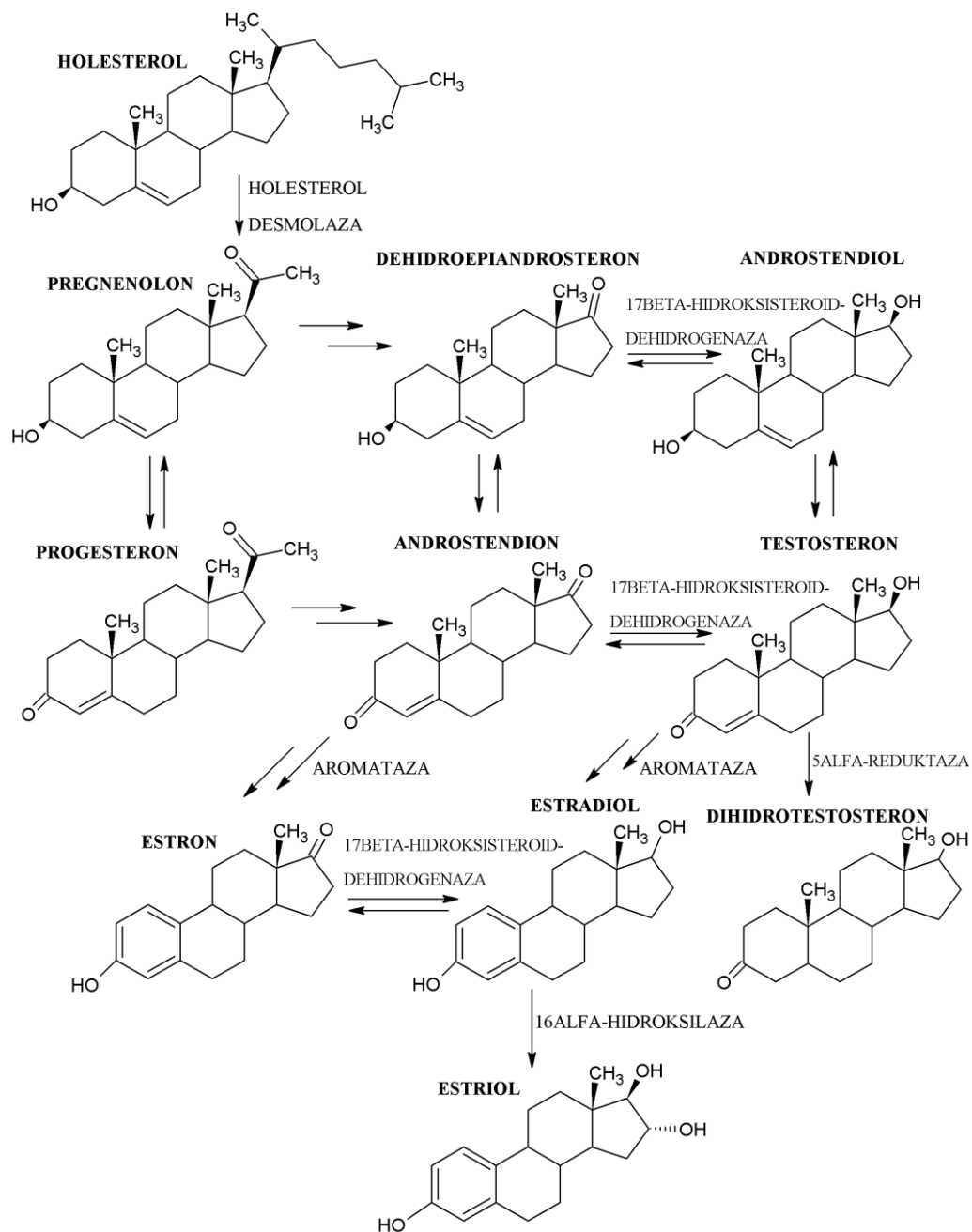
gena, in stimulira ali povzroči prepis DNK v m-RNK, ki se nato v citoplazmi prevede v beljakovino. Biološki učinek spolnih hormonov se izraža preko teh novih proteinov, ki učinkujejo avtokrino, parakrino in endokrino (7).

1.3.1 ESTROGENI

V ženski plazmi so prisotni trije estrogeni: estradiol, estron, in estriol. Najpomembnejši estrogen v reproduktivnem obdobju ženske je estradiol. Več ko 95 % cirkulirajočega estradiola izvira iz jajčnikov, nekaj pa ga nastane v nadledvični žlezi, maščobnem tkivu, jetrih ter dojkah. Estron je biološko slabše aktiven estrogen, vendar je zelo pomemben v pomenopavznem obdobju. Le polovica cirkulirajočega estrona izvira iz jajčnikov, preostala polovica pa nastane s periferno konverzijo androstendiona v maščobnem tkivu, lasnih foliklih ter jetrih. Estriol je biološko najmanj učinkovit estrogen. Večina ga nastane v nosečnosti s presnovo estradiola in estrona v placenti (7, 8).

Sintezo estrogenov aktivirata LH ter FSH. Začetna spojina, iz katere nastanejo estrogeni v jajčnikih, je holesterol. Najpogostejši vir holesterola so lipoproteini majhne gostote (LDL), nekaj pa ga nastane in situ iz acetil koencima A. Prva stopnja sinteze poteka v mitohondriju, kjer se iz holesterola odcepi stranska veriga s pomočjo encima holesterol desmolaze. Nastane pregnenolon, ki se transportira v gladki endoplazemski retikulum, kjer potekajo ostale stopnje sinteze. Ključni intermediat, ki nastane, je androstendion. Ta se iz celic teka prenese skozi bazalno membrano v granulozne celice. Androstendion se lahko s pomočjo encima aromataze pretvori v estron, le-ta pa se z encimom 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenazo pretvori v estradiol. Estradiol lahko nastane tudi tako, da se androstendion s pomočjo 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze najprej pretvori v testosteron, ta pa se z encimom aromatazo pretvori v estradiol (8).

Večina estradiola je v krvi vezanega, in sicer 60 % na albumine ter 38 % na SHBG. Približno 2 % estradiola je nevezanega (8).



Slika 3: Biosinteza estrogenov (6)

1.3.2 ANDROGENI

Glavni cirkulirajoči androgeni so dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron sulfat (DHEA-S), androstendion in testosteron. Pri ženskah androgeni nastajajo v jajčnikih, nadledvični žlezi ter v perifernih tkivih (predvsem maščobno ter mišično tkivo). Razporeditev nastanka androgenov se razlikuje pred menopavzo ter po njej (Preglednica I). Pri predmenopavznih ženskah približno 90 % DHEA-S nastane v nadledvični žlezi, preostali del pa v perifernih tkivih iz DHEA. Tudi za DHEA je glavni vir nastanka

nadledvična žleza (60 %), 30 % ga nastane s periferno konverzijo iz DHEA-S, 10 % pa v jajčnikih. Približno enak delež androstendiona pred menopavzo prispevajo nadledvična žleza ter jajčniki. Četrtnina testosterona pri predmenopavznih ženskah nastane v jajčnikih, četrtnina v nadledvični žlezi, ostala polovica pa s periferno konverzijo. Po menopavzi se delež cirkulirajočega DHEA in DHEA-S iz posameznih virov nastanka ne spremeni, vendar se zmanjša njuna plazemska koncentracija, saj se v nadledvični žlezi njuna sinteza zmanjša za 50 %. Po menopavzi zmanjšanje sinteze androgenov v jajčnikih ni tako drastično kot estradiola. Nastajanje androstendiona se v jajčnikih po menopavzi zmanjša s 40 % na 20 %, nastajanje testosterona pa se poveča z 20 % na 50 %. Čeprav je nastajanje testosterona v jajčnikih po menopavzi bolj ali manj enako, začne koncentracija cirkulirajočega testosterona upadati. To je predvsem posledica upada zmanjšane sinteze prokurzerjev testosterona, in sicer androstendiona, DHEA ter DHEA-S (9).

Preglednica I: *Razporeditev nastanka androgenov pri ženskah (9)*

	PRISPEVEK ANDROGENOV IZ POSAMEZNEGA VIRA (%)		
	SEKRECIJA IZ JAJČNIKOV	SEKRECIJA IZ NADLEDVIČNE ŽLEZE	PERIFERNA KONVERZIJA
DHEA-S			
Predmenopavza	0	90	10
Pomenopavza	0	90	10
DHEA			
Predmenopavza	10	60	30
Pomenopavza	10	60	30
ANDROSTENDION			
Predmenopavza	40	50	10
Pomenopavza	20	70	10
TESTOSTERON			
Predmenopavza	25	25	50
Pomenopavza	50	10	40

Večina testosterona (okoli 80 %) je v krvi močno vezana na SHBG, okoli 19 % pa je šibko vezanega na albumin. Prostega testosterona, ki je biološko aktiven, je le okoli 1 % (7). Za razliko od testosterona androstendion, DHEA in DHEA-S nimajo visoke afinitete

za vezavo na SHBG (9). DHEA in DHEA-S nimata androgenih lastnosti, če se ne pretvorita v testosteron in dihidrotestosteron (DHT) (8). Testosteron pa se v tkivih preko encima 5- α reduktaze presnavlja v najbolj biološko aktiven androgen DHT ali pa se aromatizira v estradiol (7).

Biosintezo androgenov aktivira LH (6). Kako poteka biosinteza, je opisano pri biosintezi estrogenov, saj estrogeni nastajajo iz androgenih prekurzorjev.

1.4 MENOPAVZA

1.4.1 FIZIOLOGIJA MENOPAVZE

Menopavza je zadnja menstruacija v življenju ženske. Jajčnika se začneta starati že v fetalnem obdobju, ko ostane od 7 milijonov foliklov ob porodu samo 700.000 foliklov, nekaj let po menopavzi pa propadejo vsi folikli. Poleg upada števila foliklov, jajčniki po 40. letu starosti tvorijo tudi manj zrelih foliklov. Folikli postanejo tudi manj odzivni na gonadotropne hormone. Zato se prvi znaki pešanja funkcije jajčnikov pokažejo z zmanjšano sposobnostjo oploditve, nato pa kot spremembe v dolžini menstruacijskega ciklusa, ki je lahko krajši ali daljši, kar je posledica krajših ali daljših folikularnih faz. Hormonska slika v času nerednih krvavitev je spreminjajoča in vključuje zmerno zvečane koncentracije FSH in estradiola, ne pa LH in progesterona. Zvišana koncentracija FSH je posledica zmanjšane koncentracije inhibina, ki je posledica zmanjšanja števila foliklov. Zvišan FSH spodbuja rast foliklov, vendar le-ti redko dosežejo zrelost, zato je vse več ciklusov anovulacijskih. Hkrati hiperstimulirani folikli izločajo vse več estradiola, toda zaradi anovulacij proizvodnja rumenega telesa izostane, kar povzroča znižano koncentracijo progesterona. Zaradi primanjkljaja le-tega sekretorna preobrazba endometrija izostane, ta se začne debeliti in pogosto pride do čezmerne zadebelitve, kar pa vodi v disfunkcijske krvavitve v perimenopavzi (10, 11).

1.4.2 DEFINICIJE POJMOV V ZVEZI Z MENOPAVZO

Mednarodno menopavzno združenje (IMS – International Menopause Society) je leta 1999 odobrilo seznam opredelitev pojmov povezanih z menopavzo (12).

- **Menopavza** je zadnja menstruacija, z njo trajno preneha menstruacija zaradi izgube funkcije jajčnikov. Če se po 12 mesecih ne pojavi menstrualna krvavitev, in to brez patofizioloških vzrokov, imenujemo to zadnjo menstruacijo naravna menopavza.
- **Perimenopavza** je dogovorjeno obdobje pred menopavzo (ko so endokrinološke, biološke in klinične značilnosti bližajoče menopavze že očitne) in prvo leto po menopavzi.
- **Klimakterij** je obdobje, ki ga označuje prehod iz reproduktivnega v ner reproduktivno obdobje. Traja nekoliko dlje časa, saj vključuje tudi perimenopavzo ter obdobje pred njo in po njej.
- **Predmenopavza** je termin, ki se uporablja za obdobje nekaj let pred menopavzo oziroma za celotno reproduktivno obdobje pred menopavzo. Danes pomeni predmenopavza celotno reproduktivno obdobje.
- **Pomenopavza** je obdobje, ki nastane po menopavzi. Delimo jo na zgodnjo pomenopavzo (prvih 2–5 let) in na pozno pomenopavzo (5 let po menopavzi pa do pozne starosti).
- **Prezgodnja menopavza** je opredeljena kot menopavza, ki nastane pred 40. letom starosti.
- **Inducirana (iatrogena) menopavza** je opredeljena kot zadnja menstruacija, ki nastane zaradi odstranitve obeh jajčnikov (z odstranitvijo maternice ali brez) ali kot posledica jatrogenega uničenja funkcije jajčnikov (kemoterapija, obsevanje).

Zgoraj naštete definicije ne opisujejo dovolj jasno staranja jajčnikov, zato se je oblikoval točkovni sistem upada reproduktivne funkcije jajčnikov, z namenom enotnega ocenjevanja endokrinološkega procesa (10).

**ZADNJA MENSTRUACIJA
MENOPAVZA**



Obdobje:	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2
Terminologija:	Rodno obdobje			Prehod v menopavzo		Pomenopvza	
	Rano	Vrh	Pozno	Rano	Kasno	Rana	Kasna
Trajanje obdobja:	Različno			Različno		1 4 leta	do smrti
	Različno			Različno			
Menstruacijski ciklus:	Različno ali redno	Redno	Različno dolg ciklus (odstopanje od normale > 7 dni)	≥ preskočena ciklusa ali intervali amenoreje (≥ 60 dni)		Amen x 12mesec.	Ni
Hormoni:	Normalni FSH		↑FSH	↑FSH		↑FSH	

Slika 4: Točkovni stopenjski sistem v reproduktivnem staranju (9)

1.4.3 POSLEDICE MENOPAVZE

a) Nevrovegetativni simptomi

Najbolj neprijeten nevrovegetativni simptom perimenopavze so vročinski navali. Ti se subjektivno izražajo kot ponavljajoče faze zardevanja, znojenja in občutkov vročine, ki jih spremljajo včasih palpitacije, tesnoba in mraženje (11). V raziskavi o pojavnosti perimenopavznih simptomov pri Slovenkah so ugotovili, da je vročinske navale imelo 50 % žensk. Ostali nevrovegetativni simptomi, ki so jih najpogosteje navajale, so: nervoza (72 %), zaskrbljenost (64 %), znojenje (63 %), nespečnost (60 %), glavoboli (56 %), zmanjšana želja po spolnosti (50 %), potrnost (53 %), tiščanje pri srcu (53 %) in palpitacije (51 %) (13).

Če našteje težave trajajo dlje časa, lahko privedejo do stalne utrujenosti, potrnosti, napadov strahu, motenj razpoloženja, slabše koncentracije in težav s spominom. Če so prisotni še dodatni neugodni dejavniki iz okolja, kot so pomanjkanje podpore in razumevanja v družini in službi, slabo socioekonomsko stanje in predhodne psihične težave, lahko pomanjkanje ženskih spolnih hormonov privede do še večjih psihičnih odstopanj (11).

b) Uroginekološko staranje

Posledica menopavze je tudi uroginekološko staranje. Genitalni trakt in urinarni trakt imata skupno embrionalno osnovo. Oba sistema delujeta in se spreminjata pod vplivom

estrogena. Pomanjkanje le-tega povzroči metabolične in trofične spremembe urogenitalnega trakta (14).

Atrofični vaginitis

Zaradi padca cirkulirajočega estrogena po menopavzi pride do spremembe anatomskih, fizioloških, mikrobioloških in histoloških značilnosti genitalnega trakta (skrajšana in stanjšana vagina, zmanjšana elastičnost, dvig pH in posledično sprememba v bakterijski flori) (14). Nekaj let po menopavzi se zaradi teh sprememb pojavijo simptomi atrofičnega vaginitisa. Znaki so suhost nožnice, ki je neposredno povezana z zmanjšano sekrecijo iz nožnice, pekoče ali žgoče bolečine v nožnici, boleči spolni odnosi (disparevnija). Znaki atrofičnega vaginitisa se lahko poslabšajo s sočasno okužbo z različnimi mikrobi. Okužbe v pomenopavznem obdobju so pogoste, saj je raven estrogena nizka, zato je zmanjšana količina Lactobacilov, kar zviša pH nožnice. Zmanjšana kislost nožnice omogoči razmnoževanje patogenih mikroorganizmov (15).

Mikcijske motnje

Na urinarnem traktu se pomanjkanje estrogena odraža zlasti v spremembah na sečnem mehurju in sečnici, kar skupaj z zmanjšanim tonusom mišic medeničnega dna in s spremenjenim metabolizmom kolagena vodi do nenadzorovanega uhajanja urina (14). Najpogostejši mikcijski problem je t. i. uretralni sindrom: pogosto uriniranje (pogosteje kot na 2 uri) čez dan in/ali ponoči in občutek siljenja na uriniranje. Bolnice imajo stalen občutek pritiska na sramnico, tudi ob praznem sečnem mehurju. Ta sindrom se diferencialno diagnostično loči od vnetja spodnjih sečil z bakteriološkim pregledom urina. Pogosto se sekundarno vnetje atrofične vaginalne sluznice razširi na spodnja sečila in povzroči trdovratne ponavljajoče uroinfekte, ki jih ima od 10 do 13 % žensk v pomenopavzi. Druga najpomembnejša mikcijska motnja je urinska inkontinenca, ki je lahko stresna urinska inkontinenca (uhajanje urina med naporom), urgentna urinska inkontinenca (nenadno uhajanje urina) ter mešana urinska inkontinenca (16).

c) Bolezni srca in ožilja

V menopavzi se tveganje za srčno-žilne bolezni (SŽB) pomembno poveča, kar pripisujemo pomanjkanju estrogena. SŽB so najpomembnejši vzrok obolevnosti in umrljivosti odraslih oseb v razvitem svetu. Nastanejo zaradi aterosklerotičnih sprememb arterijske žilne stene.

Hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ) po menopavzi ima lahko pozitiven ali negativen učinek na srčno-žilni sistem. Pozitiven vpliv HNZ predstavlja ugoden učinek na presnovo lipidov, krvnega sladkorja in inzulina. HNZ ima tudi ugoden neposredni vpliv na arterijsko žilno steno pri zaviranju procesa ateroskleroze. Negativni vpliv je povezan s prehodnim spodbujanjem koagulacije in z neugodnim učinkom na preoblikovanje žilne stene. Ti učinki HNZ so odvisni od odmerka, vrste estrogena in njemu dodanega progestagena ter od načina aplikacije obeh hormonov. Izsledki opazovalnih in randomiziranih kliničnih raziskav o vplivu HNZ na tveganje za srčno-žilne zaplete so različni, saj je bila starost preiskovank zelo različna, zato HNZ ni indicirano za preprečevanje SŽB pri ženskah po menopavzi. Vendar uporaba HNZ za lajšanje menopavznih težav pri mlajših ženskah (starih manj kot 60 let), ki so manj kot 10 let od menopavze, naj ne bi povečala tveganja za SŽB, ampak morda celo zmanjšala (17).

d) Osteoporoza

Pomanjkanje estrogena v perimenopavzi je odločilen dejavnik tveganja za nastanek pomenopavzne osteoporoze. Osteoporoza je sistemska bolezen, ki jo označujeta nizka kostna gostota in spremenjena mikroarhitektura kostnega tkiva. Posledica je povečana kostna lomljivost in dovzetnost za zlome. Osteoporozni zlomi vretenc in kolka so pomemben vzrok invalidnosti in smrti. O osteoporozi govorimo takrat, kadar vsebuje volumska enota kosti manj kostnine kot normalna kost (kadar je mineralna kostna gostota – MKG zmanjšana za več kot 2,5 RSD glede na največjo kostno maso zdravega tridesetletnika). Osteoporozo razdelimo na primarno (juvenilno, idiopatično in involutivno) ter na sekundarno, ta je posledica drugih bolezni ali delovanja toksičnih snovi na kost. Najpogostejša je involutivna osteoporoza, ki jo razdelimo na pomenopavzno osteoporozo ter senilno osteoporozo (18). Največja izguba MKG je v prvih letih po menopavzi, in sicer 5 % na leto, z nekoliko upočasnjeno izgubo MKG v poznejših letih (1–1,5 % na leto). Estrogen je vključen v metabolizem kalcija in kosti, saj so estrogenski receptorji prisotni v osteoblastih in osteoklastih. Estrogen preko receptorjev zmanjšuje kostno premeno in ohranja ravnovesje med izgradnjo in razgradnjo kosti. Prav tako estrogen ohranja zadostno koncentracijo kalcija v krvi, saj zveča absorpcijo kalcija iz gastrointestinalnega trakta, in sicer tako, da poveča občutljivost tankega črevesja na delovanje vitamina D. HNZ ni zdravilo prvega izbora pri preventivi in pri zdravljenju osteoporoze. Uporablja se za zmanjševanje menopavznih težav, kot dodatni učinek pa je preventiva osteoporoze.

Problem NHZ pri preprečevanju osteoporoze je v tem, da je potrebna dosmrtna uporaba, sicer se ob prenehanju po treh ali štirih letih po končanem zdravljenju MKG postavi na izhodiščne vrednosti (19).

1.5 HORMONSKO NADOMESTNO ZDRAVLJENJE

1.5.1 INDIKACIJE IN KONTRAINDIKACIJE

Na podlagi smernic menopavznih združenj IMS in NAMS so indikacije za NHZ naslednje (20, 21):

- nevrovegetativni menopavzni simptomi (vročinski navali, nočno znojenje, nespečnost, palpitacije, slabosti, razdražljivost, nervoza in depresija),
- urogenitalni sindrom (atrofične spremembe urogenitalnega trakta in njihove posledice, kot so suha nožnica, disparevnija, urgentna inkontinenca),
- preventiva in zdravljenje pomenopavzne osteoporoze,
- prezgodnja menopavza.

Kontraindikacije za NHZ so (20, 21):

- rak na dojki,
- od estrogena odvisni rakasti tumorji,
- akutna vaginalna krvavitev,
- predhodni idiopatski ali venski tromboembolizem,
- aktivna ali predhodna arterijska tromboembolijska bolezen,
- neurejena arterijska hipertenzija,
- aktivno obolenje jeter.

1.5.2 ZDRAVLJENJE

Osnovna ideja in načelo NHZ je individualni pristop za vsako posameznico. Trajanje, način uporabe in izbira hormona se prilagajajo vsaki posameznici. Odmerek estrogena se prilagaja tako, da se začne z najmanjšim še učinkovitim, ki se mu po potrebi doda progestagen, odvisno od prisotnosti maternice. Kako dolgo je potrebna uporaba HNZ, ki je namenjeno lažšanju menopavznih simptomov, se ugotovi tako, da se začasno prekine

zdravljenje. O tem je treba razmisliti po dveh ali treh letih. Če se simptomi ne ponovijo, HNZ ni potrebno znova uvesti (22).

V uporabi so različni pripravki HNZ, ki lahko vsebujejo samo estrogene ali samo progestagene ali pa kombinacijo obojih. V nadaljevanju so opisane različne možnosti ter značilnosti zdravljenja.

a) Estrogeni

Zdravljenje izključno z estrogeni poveča tveganje za nastanek karcinoma endometrija, zato se zgolj estrogene predpisuje le histerektomiranim bolnicam (ženske z operativno odstranjeno maternico) (11). Poznamo dva tipa estrogenov, naravni in sintetični (23). V HNZ se uporabljajo le naravni estrogeni, saj le-ti ne inducirajo čezmernega nastajanja jetrnih proteinov (substrat renina), kar povzroča vazodilatacijo in deluje antiagregacijsko (11). Estrogenski signal se prenaša preko dveh estrogenskih receptorjev (ER), ER- α ter ER- β . Po telesu sta različno razporejena. V možganih, kosteh ter dojkah sta zastopana oba ER. V maternici je samo ER- α , v malih možganih, debelem črevesju ter sečnem mehurju pa ER- β . Tako imajo različni estrogenski pripravki različne vplive (23). Po peroralni aplikaciji estrogenov se v jetrih poveča sinteza SHBG, angiotenzinogena, HDL, trigliceridov, zniža pa se sinteza celotnega holesterola ter LDL. Večja koncentracija SHBG povzroči manj razpoložljivega prostega, biološko aktivnega estradiola v krvi. Povečana sinteza angiotenzinogena lahko povzroči povišan krvni tlak. Estrogeni imajo kardiprotektiven učinek, saj ugodno vplivajo na metabolizem maščob, prav tako pa delujejo antioksidativno in tako zavirajo oksidacijo LDL (oksidirani LDL so dejavniki tveganja za aterosklerozo). Estrogeni neposredno ugodno učinkujejo na miokardij, koronarne žile, pretok krvi, koagulacijo in fibrinolizo. Vendar estrogeni tudi zvečajo adhezivnost trombocitov in zmanjšajo dejavnike, ki sicer zavrejo trombozo (antitrombin III) ter tudi zvišajo vrednosti koagulacijskih dejavnikov (fibrinogena, faktorjev VII, IX, X, XII in protrombina). Estrogeni zmanjšajo resorpcijo kosti in hitrost remodelacije kosti (7). Zdravljenje z estrogeni poteka na več načinov: peroralno, transdermalno, v obliki vsadkov, vaginalnih obročev, systemskega gela in nosnih razpršilcev. V Sloveniji sta najpogosteje uporabljeni peroralna ter transdermalna aplikacija, pripravki pa vsebujejo mikronizirani 17 β -estradiol, estradiol valerat ali konjugirani konjski estrogen. Prednost peroralnih pripravkov je v tem, da se metabolizirajo v jetrih, zato ugodno vplivajo na metabolizem maščob, pomanjkljivost pa je v indukciji SHBG. Pri transdermalni uporabi estrogenov ne

pride do prvega prehoda skozi jetra, zato je ta uporaba primerna za ženske z dejavniki tveganja za trombembolijo, tistih, ki imajo probleme z malabsorpcijo, pri ženskah, ki imajo žolčne kamne, in tistih, ki so prebolele katero koli jetrno bolezen (23).

b) Estrogeni za lokalno uporabo

Lokalno zdravljenje z vaginalnimi estrogenskimi zdravili z nizkim odmerkom je najprimernejše za zdravljenje urogenitalnega sindroma. Prednosti lokalnega zdravljenja pred sistemskim so: manjši terapevtski odmerek, večja varnost z manj neželenimi učinki in učinkovanje zdravila zgolj na mestu jemanja. Poznamo različne oblike vaginalnih estrogenskih zdravil: vaginalne kreme, obročki, estrogenski pesarji, vagitoriji in vaginalne tabletko z aplikatorjem. V Sloveniji je možnost predpisovanja lokalnega zdravljenja s 17- β estradiolom (vaginalne tabletko) ali estriolom (globuli, krema) (15). Zdravljenje je dolgotrajno (več let) in se v začetni fazi lahko kombinira s peroralnim nadomeščanjem estrogenov in progestagenov. Šele po doseženem kliničnem učinku se priporoča samo lokalno zdravljenje (11).

c) Progestageni

Zdravljenje s progestagani se uporablja predvsem v predmenopavzi, ko zaradi anovulacij izostane razvoj rumenega telesa. Zato se progestagene dodaja v drugi fazi ciklusa od 10 do 14 dni. Progestageni se lahko uporabljajo tudi kot pomožno zdravilo pri estrogenski terapiji v predmenopavzi in pomenopavzi za preprečevanje endometrijske hiperplazije. Progestagni namreč delujejo kot anti-estrogeni tako, da zmanjšujejo število estrogenskih receptorjev ter aktivnost encima 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaze (ta encim pretvarja estradiol v estron). Posledica tega pa je zmanjšana estrogenska stimulacija endometrija. Za zdravljenje se uporabljajo sintezni progestageni, ker endogeni progesteron zaradi hitrega metabolizma in izločanja iz organizma ni učinkovit. Progestageni se uporabljajo večinoma v oralni obliki, nekateri tudi v oblikih ter v vaginalni ali intrauterini obliki. Progestagene razdelimo v dve skupini: derivate 17 α -hidroksiprogesterona ter derivate 19-nortestosterona (23).

d) Progestageni v kombinaciji z estrogeni

Pri HNZ se estrogenom dodajajo progestageni zaradi zmanjšanja tveganja za nastanek endometrijske hiperplazije in raka. Kombinirani pripravki so lahko eno-, dvo-, ali trofazni. Enofazni pripravki se uporabljajo pri ženskah, ki ne želijo imeti več krvavitev. Takšno zdravljenje imenujemo kontinuirano-kombinirano, pri katerem sta skupaj estrogen in progestagen v eni tableti, cikel zdravljenja pa je dolg 28 dni. Z večfaznimi tabletami poznamo sekvenčno zdravljenja, ki je bodisi kontinuirano ali pa ciklično. Sekvenčno kontinuirano pomeni, da se estrogen jemlje vsak dan 28-dnevnega zdravljenja, progestagen pa je dodan v drugi polovici cikla zdravljenja. Sekvenčno ciklično zdravljenje pomeni, da je cikel zdravljenja dolg 21 dni, nato sledi 7-dnevni premor. Estrogen se jemlje vseh 21 dni, medtem ko je progestagen dodan v drugi polovici cikla zdravljenja (23).

1.6 ANDROGENI IN MENOPAVZA

Spremenjeno hormonsko stanje po menopavzi lahko vpliva na spolno življenje žensk. Upad spolnih hormonov, predvsem estradiola, povzroči spremembe na spolovilih (atrofični vaginitis), zmanjšanje testosterona pa vpliva na zmanjšan libido (spolno poželenje) žensk (24). V raziskavi o pojavnosti perimenopavznih simptomov, ki je potekala v Sloveniji, je kar 55 % anketirank navedlo zmanjšano željo po spolnosti. Od teh naj bi zmanjšanje spolne želje kot blag simptom navedlo 23 %, kot zmeren 25 % in kot hud 7 % anketirank (13). V pomenopavznem obdobju naj bi po oceni različnih raziskovalcev kar 70 do 80 % žensk prenehalo s spolnim življenjem. Vendar pa spolno življenje žensk ni odvisno samo od njihovih fizioloških stanj, ampak tudi od psihosocialnih dejavnikov (duševno zdravje, samopodoba, partnerski odnos, ekonomsko stanje ter okolje, v katerem živi) (24).

Pri ženskah androgeni nastajajo v nadledvični žlezi, ovarijih ter s periferno konverzijo. Pešanje delovanja jajčnikov nima tako drastičnega vpliva na zmanjšanje koncentracije testosterona kot na estradiol. Kljub temu se po menopavzi zmanjša koncentracija testosterona, ker se zmanjša nastanek prekursorjev, iz katerih testosteron nastane v perifernih tkivih. Večina cirkulirajočega testosterona, za razliko od ostalih androgenov, je v krvi močno vezanega na SHBG, zato je le 1 % nevezanega, ki je biološko razpoložljiv. Zato spremembe v koncentraciji SHBG najbolj vplivajo na razporeditev testosterona v krvi (9).

Opredeflitev pomanjkanja androgenov pri ženskah

Teorija vpliva pomanjkanja androgenov na zmanjšano spolno željo žensk v pomenopavzi se je pojavila zato, ker pri estrogenskem nadomestnem zdravljenju ne pride do izboljšanja spolne želje. Pomanjkanje androgenov (Female Androgen Deficiency Syndrome – FADS) je opredelil Princetonski konsenzus. Postavil je tri merila: zmanjšan libido ter slabo počutje, normalno stanje estrogenov (ob HNZ z estrogeni) ter serumske koncentracije androgenov na spodnji četrtini normalne vrednosti. Problem te opredelitve je ohlapna definicija zmanjšanja libida, saj je le-ta odvisen od več dejavnikov in se ga ne more opredeliti le glede na koncentracijo androgenov. Podoben problem se je pojavil tudi pri postavitvi nove diagnoze: motnja spolnega poželenja zaradi premajhne dejavnosti (Hypoactive Sexual Desire Disorder – HSDD). Zadnja je smernice za uporabo androgenov pri ženskah oblikovala skupina Združenja endokrinologov Kanade, ZDA in Avstralije. Ugotovili so, da ni priporočljivo postavljati diagnoze »pomanjkanja androgenov pri ženskah«, saj klinični sindrom še ni opredeljen, prav tako pa tudi niso poznani normativi za testosteron ter prosti testosteron v posameznih obdobjih življenja (25).

2 NAMEN

Hormonsko nadomestno zdravljenje je prva izbira pri lažšanju menopavznih težav. Vendar ima tudi nekatere neželene učinke, poveča se sinteza SHBG, ki lahko vpliva na koncentracijo testosterona.

Namen

V diplomski nalogi želimo oceniti koncentracije gonadotropinov in vpliv jemanja HNZ na koncentracijo testosterona ter ostalih spolnih hormonov pri pomenopavznih ženskah.

Hipoteza

V serumu preiskovank so koncentracije FSH in LH povišane, koncentracije celotnega ter prostega testosterona, estradiola, estrona ter DHEA-S pa se pred in po uvedbi zdravljenja s HNZ spremenijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS ZBIRANJA PREISKOVANK

Na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana je potekala raziskava o povezavi nekaterih genetskih dejavnikov z učinkom hormonskega nadomestnega zdravljenja. Eden od ciljev raziskave je bil, da se pri ženskah v pomenopavznem obdobju natančno ovrednoti vrednosti koncentracij spolnih hormonov ter njihovih razgradnih produktov v krvi in v urinu pred začetkom jemanja HNZ in tri mesece kasneje. Pred začetkom raziskave so vključene preiskovanke izpolnile tudi anketo, ki je vsebovala vprašanja o menstruacijskem ciklusu, hormonskem zdravljenju in razvadah. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko RS.

3.2 OPIS JEMANJA VZORCEV

Preiskovankam so pred začetkom jemanja HNZ izmerili debelino endometrija z ultrazvočnim pregledom in vsaki odvzeli vzorec periferne krvi in jutranjega urina. Po pregledu ter odvzemu vzorcev so preiskovanke naslednji dan začele z jemanjem HNZ. Po 2 do 3 mesecih, ko so še jemale HNZ, so ponovno opravile ultrazvočni pregled endometrija ter drugi odvzem krvi in urina.

Odvzeto periferno vensko kri so centrifugirali in vzorce serumov shranili do začetka analize pri -20°C .

Za izvedbo diplomske naloge smo uporabili le vzorce serumov, in sicer za analizo koncentracij izbranih hormonov.

3.3 OPIS TERAPIJE IN ZDRAVILA

Vse preiskovanke so jemale peroralno 2 mg estradiola v obliki filmsko obložene tablete Estrofem na dan.

Učinkovina v zdravilu Estrofem je sintetični 17β -estradiol, ki je kemično in biološko identičen endogenemu človeškemu estradiolu. Po peroralni uporabi se 17β -estradiol v mikronizirani obliki hitro absorbira iz prebavil. Največjo plazemsko koncentracijo doseže 6 ur po zaužitju. V krvi ga je večino vezanega na SHBG (37 %) ter albumin (61 %), približno 1–2 % pa je nevezanega. 17β -estradiol se presnavlja predvsem v jetrih in črevesju ter tudi v ciljnih organih. Presnova vključuje nastajanje manj aktivnih ali neaktivnih

presnovkov, in sicer estrona, kateholestrogenov ter estrogenskih sulfatov in glukuronidov. Estrogeni se deloma izločijo v žolč, pri čemer se hidrolizirajo in reabsorbirajo (enterohepatično kroženje), v glavnem pa v urin v biološko neaktivni obliki (26).

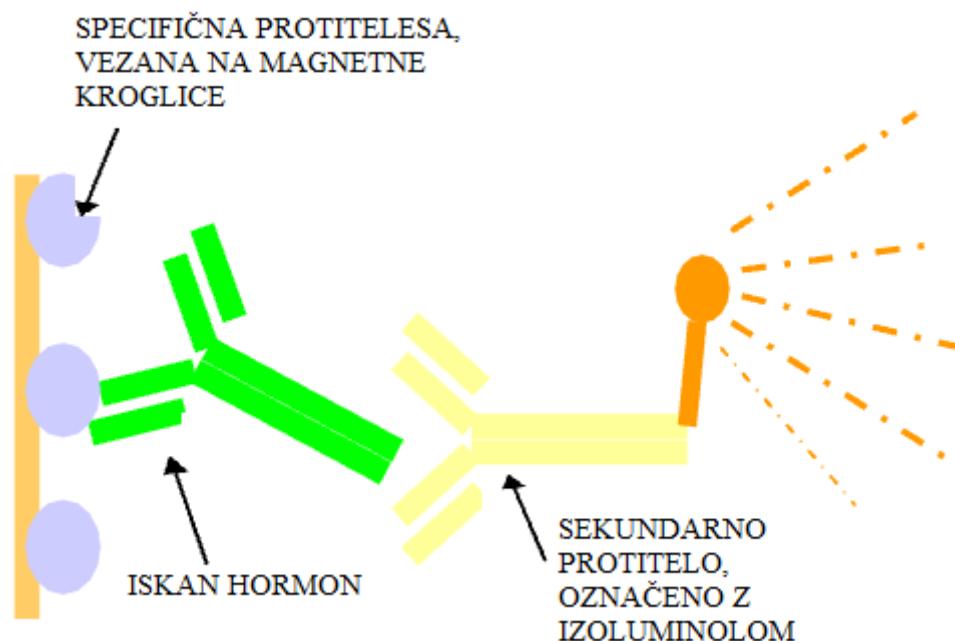
3.4 OPIS KEMILUMINISCENČNE IMUNOLOŠKE METODE

3.4.1 PRINCIP METODE

Serumske koncentracije FSH, LH, celokupnega testosterona, estradiola ter DHEA-S smo izmerili s kemiluminiscenčno imunološko metodo – CLIA (chemiluminescence immunoassay). Vsebnosti FSH in LH v vzorcih smo določili s sendvič kemiluminiscenčno imunološko metodo, vsebnosti ostalih hormonov pa z direktno kompetitivno kemiluminiscenčno imunološko metodo.

a) Princip kemiluminiscenčne imunološke sendvič metode

Pri tem testu uporabljamo kot trdno fazo magnetne kroglice, na katerih so vezana specifična mišja monoklonska protitelesa. Hormona (FSH ter LH), ki ju določujemo v vzorcu, kalibratorju ali kontroli, se vežeta na trdno fazo monoklonskega protitelesa. Njuno vezavo dokažemo s sekundarnim monoklonskim protitelesom, na katerem je konjugiran izoluminolni derivat. Nevezan material se odstrani s spiranjem. Če pride do vezave konjugata na prvi kompleks, se po dodatku reagentov aktivatorjev sproži reakcija kemiluminescence. Sprosti se svetlobni signal, ki ga aparatura izmeri kot relativne luminiscenčne enote (RLU). Te enote so premosorazmerne s koncentracijo analita v vzorcu, kalibratorju ali kontroli.



Slika 5: Shema sendvič kemiluminiscenčne imunološke metode

b) Princip direktne kompetitivne kemiluminiscenčne imunološke metode

Tudi pri tem testu so specifična protitelesa vezana na trden nosilec (magnetni delci). Antigen (celokupni testosteron, estradiol ali DHEA-S), ki je označen z izoluminolnim derivatom, tekmuje z antigenom (celokupni testosteron, estradiol ali DHEA-S) iz vzorca, kalibratorja ali kontrole za vezavo na protitelo. Nevezani material se odstrani s spiranjem. Nato sledi dodatek reagentov aktivatorjev, ki sprožijo kemiluminiscenčno reakcijo. Svetlobni signal izmeri fotopomnoževalec v obliki relativnih luminiscenčnih enot. Izmerjeni signal je obratno sorazmeren koncentraciji antigena (celokupnega testosterona, estradiola ali DHEA-S) v vzorcu, kalibratorju ali kontroli.

3.4.2 OPREMA IN REAGENTI

Pri izvedbi testov smo uporabljali komplet reagentov znamke LIASON. Vsi reagenti za določitev posameznih hormonov so vloženi v posebna stojala – integrale. Posamezni integrali so označeni s črtnimi kodami, da jih lahko aparat prepozna. En komplet vsebuje količine za 100 določitev ter vsebuje:

- suspenzijo magnetnih delčkov, obdanih s specifičnimi protitelesi,
- konjugat – pri direktni kompetitivni metodi so bili uporabljeni hormoni, na katerih je bil konjugiran izoluminolni derivat; pri sendvič metodi pa so bila to mišja monoklonska protitelesa, označena z izoluminolom,

- kalibrator 1: človeški serum z nizko koncentracijo posameznih vrst hormonov,
- kalibrator 2: človeški serum z visoko koncentracijo posameznih vrst hormonov,
- reakcijski pufer,
- topilo.

Ostali potrebni material:

- kontrola za oddano svetlobo LIAISON (319101),
- tekočina za izpiranje LIAISON (319100),
- reagenti aktivatorji LIAISON (319102),
- komplet za čiščenje LIAISON (310990).



Slika 6: Reagenti v integralu in reakcijske posodice

3.4.3 PRIPRAVA REAGENTOV IN VZORCEV

a) Priprava reagentov:

Integrale z reagenti hranimo do roka uporabe zaprte v hladilniku pri temperaturi 2–8 ° C. Pred uporabo smo jih horizontalno nežno in previdno pretresli ter pazili, da ni nastala pena. Nato smo komplet reagentov postavili v analizator. Pred uporabo jih je analizator avtomatsko premešal ter suspendiral magnetne delce.

b) Priprava vzorcev:

- Vzorčni material je bil serum, shranjen ločeno od sedimenta ter do uporabe zamrznjen pod -20°C .
- Pred uporabo smo vzorce dobro premešali s pomočjo mešalnika Vortex.
- Vzorcev, ki so bili mikrobiološko kontaminirani, hemolizirani ali lipemični, nismo uporabljali.

3.4.4 KALIBRACIJA APARATURE

V komplet reagentov spadata tudi dva kalibratorja, za nizko ter visoko merilno območje. Postopek kalibracije poteka avtomatsko. Izvajali smo jo v naslednjih primerih:

- vsakič pred začetkom merjenja,
- kadar je bil uporabljen nov komplet reagentov,
- če so bile izmerjene koncentracije kontrole izven dovoljenih mej.

3.4.5 POTEK ANALIZE

Za izvedbo kemiluminiscenčne imunološke metode smo uporabili aparaturo LIASION, proizvajalca DiaSorin. Pri izvedbi smo sledili navodilom proizvajalca analizatorja. Vsi integrali z reagenti so označeni s črnimi kodami, katere aparat prepozna in mu tako omogočijo prepoznavanje vsebine. Postopek testa v aparaturi je bil sledeč:

- vstavljanje kalibratorja, kontrole ali vzorca,
- dodajanje reakcijskega pufra ter magnetnih delcev, obdanih s specifičnimi protitelesi,
- inkubacija, kateri sledi izpiranje,
- dodajanje konjugata,
- inkubacija, kateri sledi izpiranje,
- dodajanje reagentov aktivatorjev ter merjenje oddane svetlobe.

Vsi vzorci in reagenti so bili odmerjeni avtomatsko. Rezultat izračuna računalniški program samostojno na podlagi umeritvene krivulje.



Slika 7: Analizator proizvajalca LIASION

3.4.6 SPECIFIČNE KARAKTERISTIKE NAPRAVE LIASON

a) Analizna občutljivost

Meja detekcije za FSH je 0,25 IU/L, za LH je 0,2 IU/L, za celokupni testosteron je 0,17 nmol/L, za estradiol je 0,044 nmol/L, za DHEA-S je 0,08 μ mol/L.

b) Analizna specifičnost

Izvedene so bile kontrolne študije s potencialnimi snovmi, ki bi lahko vplivale na rezultate. Dokazali so, da pri sledečih koncentracijah ne vplivajo na rezultat določanja:

- FSH in LH: bilirubin \leq 0,125 g/L, hemoglobin \leq 5 g/L, trigliceridi \leq 12,5 g/L,
- celokupnega testosterona: bilirubin \leq 0,2 g/L, holesterol \leq 5 g/L, trigliceridi \leq 5 g/L,
- estradiola: holesterol \leq 10 g/L, bilirubin \leq 0,1 g/L, trigliceridi \leq 2 g/L,
- DHEA-S: bilirubin \leq 0,2 g/L.

c) Natančnost metode

Za določitev natančnosti metode se je izmerila koncentracija posameznih hormonov v vzorcih, ki so vsebovali različne koncentracije le-teh. Meritve so potekale več dni zapored, isti vzorec je bil analiziran dvakrat v dnevu. Na podlagi zbranih rezultatov se je lahko ocenila ponovljivost, in sicer ponovljivost znotraj ene serije (intra-analizna variacija) ter ponovljivost med serijami (inter-analizna variacija). Dobljeni rezultati meritev koncentracij FSH, LH, celokupnega testosterona, estradiola ter DHEA-S so zbrani v Preglednicah II, III, IV, V ter VI.

Preglednica II: *Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami FSH za določitev ponovljivosti*

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (IU/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (IU/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
7,5	3,0	40	8,6	3,3	15
46,6	3,5	40	45,4	3,2	15
167,8	3,3	40	172,4	4,5	25
316,6	3,8	40	342,0	4,5	17

Preglednica III: *Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami LH za določitev ponovljivosti*

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (IU/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (IU/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
0,82	4,3	40	0,78	6,0	40
2,17	4,0	40	2,19	3,6	42
21,28	1,7	40	21,07	2,2	42
67,54	1,5	40	66,27	3,5	42

Preglednica IV: *Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami celokupnega testosterona za določitev ponovljivosti*

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
1,4	8	80	1,4	10	80
3,1	5	80	3,1	6	80
6,6	3	80	6,6	4	80
17,7	4	80	17,7	5	80
23,9	2	80	23,9	3	80
30,2	2	80	30,2	4	80

Preglednica V: *Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami estradiola za določitev ponovljivosti*

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
0,20	9,1	80	0,20	14,7	80
0,30	4,6	80	0,30	9,5	80
0,55	5,3	80	0,55	7,0	80
1,00	3,5	80	1,00	5,5	80
1,70	9,5	80	1,70	9,0	80
3,03	7,6	80	3,03	10,0	80

Preglednica VI: *Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami DHEA-S za določitev ponovljivost*

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (μmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (μmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
1,22	7,6	20	4,4	15	20
2,42	9,2	20	14,0	13	20
5,13	9,5	20	24,0	8,1	20
11,43	8,1	20			
21,25	6,8	20			

d) Točnost metode

Točnost metode je bila določena s primerjavo izmerjene vrednosti s pričakovano vrednostjo. Dobljeni rezultati meritev koncentracij FSH, LH, celokupnega testosterona, estradiola ter DHEA-S so zbrani v Preglednicah VII, VIII, IX, X ter XI.

Preglednica VII: *Rezultati meritev koncentracij FSH za določitev točnosti*

IZMERJENA VREDNOST (IU/L)	PRIČAKOVANA VREDNOST (IU/L)	TOČNOST (%)
10,0	9,8	103
13,4	14,6	92
23,6	24,2	97
33,0	33,8	98
45,0	43,4	104
53,5	53,0	101

Preglednica VIII: *Rezultati meritev koncentracij LH za določitev točnosti*

IZMERJENA VREDNOST (IU/L)	PRIČAKOVANA VREDNOST (IU/L)	TOČNOST (%)
15,96	16,58	96
27,99	28,29	99
52,53	51,69	102
78,05	75,09	104
99,10	98,49	101
124,36	121,89	102

Preglednica IX: *Rezultati meritev koncentracij celokupnega testosterona za določitev točnosti*

IZMERJENA VREDNOST (nmol/L)	PRIČAKOVANA VREDNOST (nmol/L)	TOČNOST (%)
14,6	18,4	79
15,6	18,0	87
20,8	21,2	98
20,8	22,2	93
21,9	22,9	96

Preglednica X: *Rezultati meritev koncentracij estradiola za določitev točnosti*

IZMERJENA VREDNOST (nmol/L)	PRIČAKOVANA VREDNOST (nmol/L)	TOČNOST (%)
1,03	1,16	88
1,05	1,19	89
1,06	1,17	91
1,29	0,96	134
1,54	1,37	112
1,71	1,26	136

Preglednica XI: *Rezultati meritev koncentracij DHEA-S za določitev točnosti*

IZMERJENA VREDNOST (μmol/L)	PRIČAKOVANA VREDNOST (μmol/L)	TOČNOST (%)
2,55	2,63	97
5,73	5,92	97
6,98	6,38	109
8,96	9,66	93
10,23	9,82	104
12,84	13,11	98

Na podlagi zgornjih rezultatov je kemiluminescenčna imunološka metoda po vseh lastnostih primerna za določevanje hormonov v serumu.

3.5 OPIS RADIOIMUNOLOŠKE METODE

3.5.1 PRINCIP METODE

Serumske koncentracije prostega testosterona in estrona smo izmerili z radioimunološko metodo – RIA (radioimmune assay).

Radioimunološka metoda temelji na tekmovanju antigenov, ki jih določujemo v vzorcu, z antigeni, ki so radioaktivno označeni (v našem primeru z izotopom joda – 125), za vezavo na določeno količino specifičnih protiteles. Čim večja je koncentracija antigenov v vzorcu, več se jih lahko veže s protitelesi, zato se na protitelesa veže manj označenih antigenov in jih več ostane prostih v raztopini. Z merjenjem količine prostega označenega antigena v raztopini s števcem gama lahko določimo koncentracijo neoznačenega antigena. Čim več radioaktivnega označenega antigena se veže s protitelesi, tem manjša je količina antigena v preiskovanem vzorcu.

3.5.2 REAGENTI

a) Pri izvedbi testa za določevanje prostega testosterona smo uporabljali komplet reagentov KIT. V tem paketu se nahajajo naslednji reagenti:

- Prevljučene epruvete – notranja površina epruvet iz polipropilena je prevlčena s protitelesi (pridobljenimi iz kuncev) proti prostemu testosteronu.
- Označen antigen – radioaktivno označen prosti testosteron (označen z izotopom joda – 125).
- Standardi za prosti testosteron – šest vial, označenih od A do F z različnimi koncentracijami prostega testosterona. Standard A vsebuje 0 pmol/L, standard F pa 173 pmol/L prostega testosterona.
- Kontrolni serum, ki vsebuje prosti testosteron ter tudi več kot 25 drugih komponent.

b) V paketu KIT za določevanje estrona se nahajajo naslednji reagenti:

- Standardi za estron – sedem vial, označenih od A do G z različnimi koncentracijami estrona. Standard A vsebuje 0 nmol/L, standard G pa 0,185 nmol/L estrona.
- Označen antigen – radioaktivno označni estron (označen z izotopom joda – 125).

- Antiserum – vsebuje afinitetna poliklonska protitelesa proti estronu, ki so bila pridobljena iz kuncev.
- Obarjalni reagent – sekundarni antiserum (vsebuje kozji antikunčji antiserum). Služi za ločitev vezanega ter nevezanega antigena.
- Kontrolni serum, ki vsebuje dve viali; eno z nizko koncentracijo ter eno z visoko koncentracijo estrona.

c) Ostali potrebni material:

- gama števec,
- mešalec Vortex,
- navadne epruvete,
- centrifuga.

3.5.3 POTEK ANALIZE

Pred izvedbo smo vse reagente in vzorce dali na sobno temperaturo. Ves postopek smo izvedli v dveh paralelkah.

a) Postopek določevanja prostega testosterona je bil sledeč:

1. Pripravili smo si navadne epruvete, ki smo jih označili kot T epruvete ter NSB epruvete. Prav tako smo si pripravili prevlečene epruvete, ki smo jih potrebovali za standard, kontrolo ter vzorec.
2. V označene epruvete smo odpipetirali 50 μ L standarda, kontrole ter vzorca. V NSB epruveto smo dodali 50 μ L standarda A, ki je vseboval 0 pmol/L prostega testosterona.
3. V vse epruvete smo dodali 1 ml označenega prostega testosterona.
4. Vse epruvete, razen T epruvete, smo prekrili in jih inkubirali 4 ure pri temperaturi 37°C.
5. Nato smo previdno odpipetirali vso tekočino iz vseh epruvet, razen iz T epruvete. Pri tem smo morali biti zelo pozorni, da smo odstranili vso tekočino, saj smo s tem vplivali na natančnost metode.
6. V vseh epruvetah smo v števcu gama izmerili v eni minuti količino prostega označenega antigena.

b) Postopek določevanja estrona je bil naslednji:

1. Pripravili smo si epruvete za standard, kontrolo in vzorec ter epruvete, ki smo jih označili kot T epruvete in NSB epruvete.
2. V označene epruvete smo odpipetirali 50 μL standarda, kontrole ter vzorca. V NSB epruveto smo dali 150 μL standarda A, ki je vseboval 0 nmol/L estrona.
3. V vsako epruveto smo dodali 100 μL označenega estrona.
4. V vse epruvete, razen NSB in T epruvete, smo dodali 100 μL antiseruma.
5. Nežno smo epruvete premešali na Vortex mešalniku.
6. Vse epruvete smo prekrili in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi.
7. V vse epruvete, razen v T epruveto, smo dodali 1 mL obarjalnega reagenta ter smo takoj premešali.
8. Epruvete smo inkubirali pri sobni temperaturi 15 minut.
9. Nato smo vse epruvete, razen T epruvete, centrifugirali 20–30 minut.
10. Previdno smo odpipetirali vso tekočino iz vseh epruvet, razen iz T epruvete.
11. V vseh epruvetah smo v števcu gama izmerili v eni minuti količino prostega označenega antigena.

Na podlagi izmerjenih vrednosti smo narisali umeritveno krivuljo za prosti testosteron in estron. Vrednost v NSB epruveti nam je služila kot slepi vzorec, T epruveta pa nam je podala totalno število označenega prostega testosterona. Umeritveno krivuljo smo napravili tako, da smo na y os nanašali odstotek vezanega označenega antigena, na x os pa znano koncentracijo neoznačenega antigena (standard). Iz umeritvene premice smo lahko nato določili koncentracijo prostega testosterona ter estrona v vzorcu.

3.5.4 KONTROLA KAKOVOSTI

a) Analizna občutljivost

Meja detekcije za prosti testosteron je 0,52 pmol/L, za estron pa 0,0044 nmol/L.

b) Natančnost metode

Za ocenitev natančnosti metode so v preglednicah podani rezultati meritev vzorcev z različnimi plazemskimi koncentracijami prostega testosterona (Preglednica XII) in estrona (Preglednica XIII). Za prosti testosteron so podani podatki zgolj za ocenitev ponovljivosti znotraj serij.

Preglednica XII: Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami prostega testosterona za določitev ponovljivosti

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (pmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
4,2	18,3	160
30,9	8,5	160
69,3	8,0	160

Preglednica XIII: Rezultati meritev vzorcev z različnimi koncentracijami estrona za določitev ponovljivosti

INTRA-ANALIZNA VARIACIJA			INTER-ANALIZNA VARIACIJA		
POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV	POVPREČNA VREDNOST (nmol/L)	KOEFICIENT VARIACIJE (%)	ŠTEVILO DOLOČITEV
0,38	5,6	10	0,33	11,1	8
1,83	9,4	10	1,65	10,2	8
3,47	4,4	10	3,37	6,0	8

c) Točnost metode

Točnost metode je bila določena s primerjavo izmerjene vrednosti s pričakovano. Podatki za določitev točnosti metode so podani le za estron v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati meritev koncentracij estrona za določitev točnosti

VZOREC	VREDNOST ESTRONA (nmol/L)	DODANA VREDNOST (nmol/L)	PRIČAKOVNA VREDNOST (nmol/L)	IZMERJENA VREDNOST (nmol/L)	TOČNOST (%)
1	0,19	0,17	0,36	0,42	116
		0,53	0,72	0,81	112
2	0,94	0,17	1,12	1,03	92
		0,53	1,47	1,75	119
3	1,57	0,17	1,74	1,76	101
		0,53	2,09	2,28	109

Na podlagi zgornjih rezultatov je radioimunološka metoda po vseh lastnostih primerna za določevanje prostega testosterona ter estrona v serumu.

4 REZULTATI

4.1 OVREDNOTENJE CELOTNE SKUPINE

V raziskavo je bilo vključenih 20 pomenopavznih žensk, vendar jih je do konca raziskave sodelovalo le 17. Povprečna starost 17 preiskovank je bila 54,7 let, najnižja starost je bila 47 let, najvišja pa 66 let.

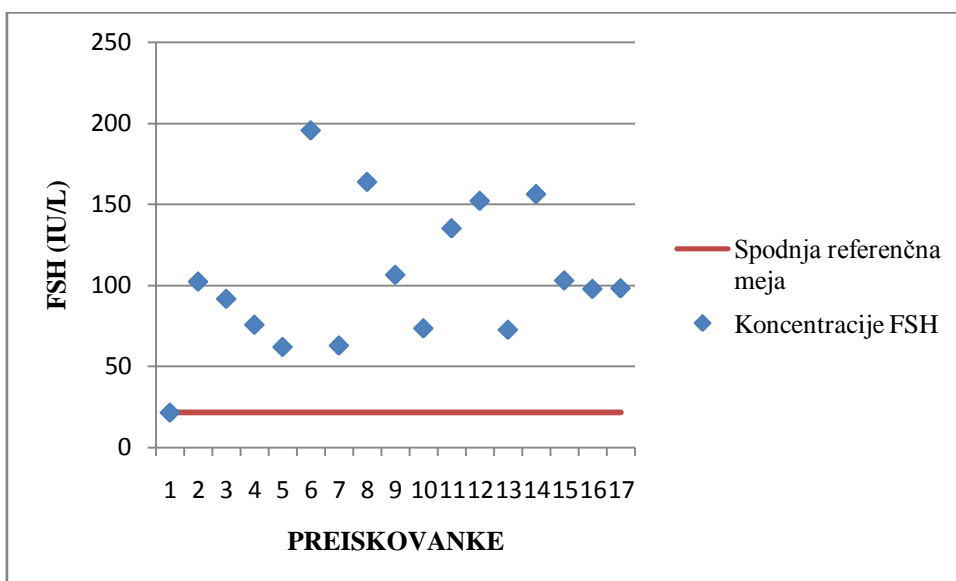
4.2 OCENITEV POMENOPAVZNEGA STATUSA

Za ocenitev pomenopavznega statusa preiskovank smo določili koncentraciji FSH ter LH, prav tako pa tudi koncentracijo estradiola, ter jih primerjali z referenčnim vrednostmi teh hormonov za pomenopavzno obdobje (Preglednica XV). Rezultati so prikazani tudi grafično (Graf 1, 2 in 3).

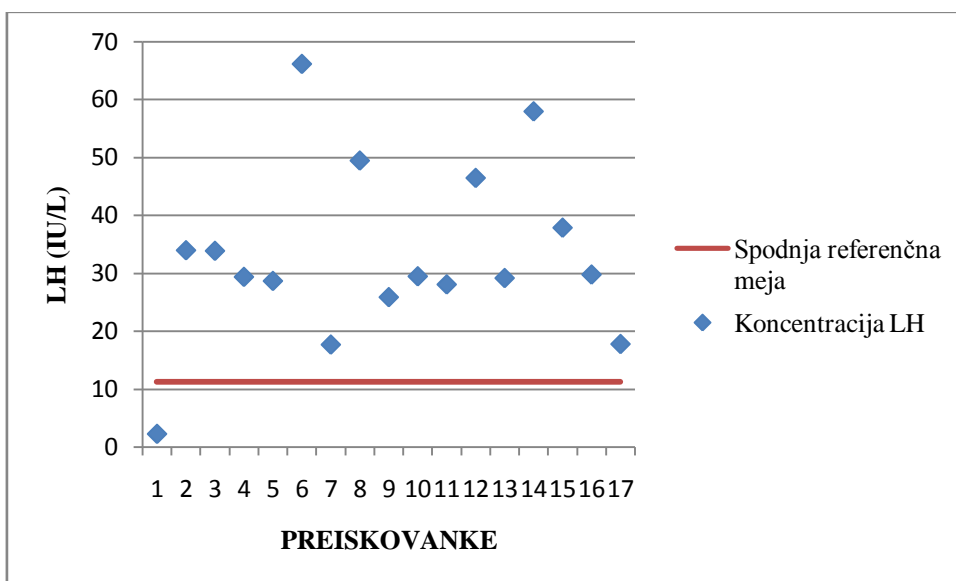
Preglednica XV: *Rezultati meritev koncentracij FSH, LH ter estradiola pri preiskovankah pred terapijo ter referenčne vrednosti teh hormonov za pomenopavzno obdobje*

VZOREC	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	ESTRADIOL (nmol/L)
1	21,5	2,27	0,044
2	102,3	34,0	0,078
3	91,7	33,9	0,044
4	75,7	29,4	0,047
5	62,0	28,7	0,189
6	195,6	66,2	0,044
7	62,9	17,7	0,057
8	163,8	49,5	0,046
9	106,5	25,9	0,044
10	73,5	29,5	0,046
11	135,2	28,1	0,044
12	152,1	46,5	0,172
13	72,6	29,2	0,053
14	156,3	58,0	0,129
15	103,0	37,9	0,057
16	97,8	29,8	0,153
17	98,2	17,8	0,048
REFEREČNE VREDNOSTI ZA POMENOPAVZNO OBDOBJE	> 21,7	> 11,3	< 0,11

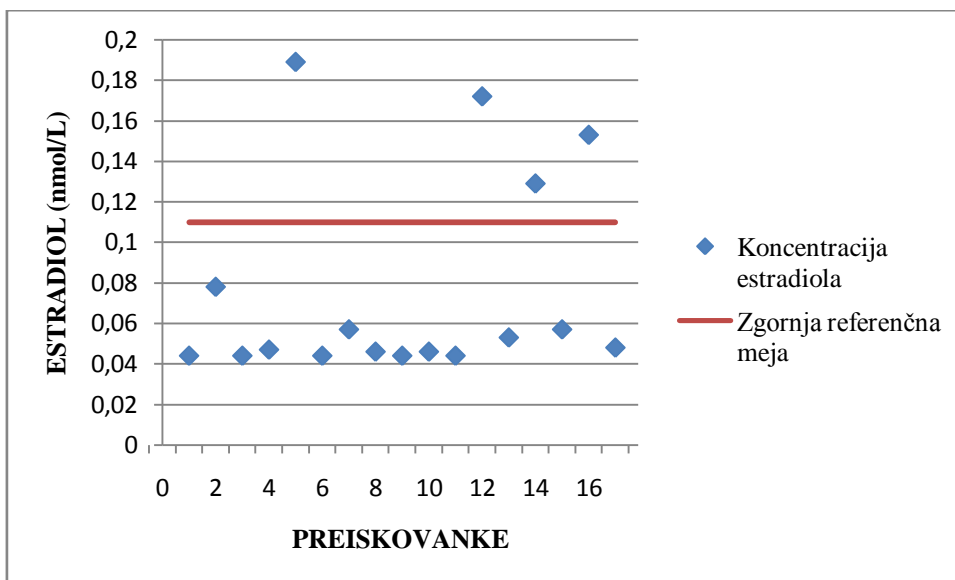
Graf 1: *Koncentracije FSH pri preiskovankah*



Graf 2: *Koncentracije LH pri preiskovankah*



Graf 3: Koncentracije estradiola pri preiskovankah



Med 17 preiskovankami je imelo 16 povišan FSH. Ena preiskovanka je imela vrednost FSH na meji, ki je opredeljena za pomenopavzno obdobje laboratorija, in sicer 21,5 IU/L. Le-ta preiskovanka tudi ni imela povišane koncentracije LH. Štiri preiskovanke so imele estradiol nad zgornjo referenčno mejo, vendar so od teh imele vse povišan FSH.

4.3 OCENITEV SPREMEMB SERUMSKIH KONCENTRACIJ SPOLNIH HORMONOV PO HNZ

Preglednica XVI: *Vrednosti koncentracij hormonov pred terapijo in po njej*

VZOREC	PRED TERAPIJO					PO TERAPIJI				
	T-C (nmol/L)	T-P (pmol/L)	E2 (nmol//L)	ESTRON (nmol/L)	DHEA-S (μ mol/L)	T-C (nmol/L)	T-P (pmol/L)	E2 (nmol/L)	ESTRON (nmol/L)	DHEA-S (μ mol/L)
1	1,51	0,7	0,044	0,080	38,0	0,27	0,2	0,064	0,492	17,0
2	1,96	0,8	0,078	0,105	31,3	2,44	0,9	0,087	0,992	33,0
3	3,16	2,3	0,044	0,107	36,9	2,46	0,9	0,261	3,743	22,0
4	2,87	3,4	0,047	0,181	56,9	2,06	2,4	0,131	0,423	54,7
5	6,44	5,5	0,189	0,331	127,7	2,50	3,7	0,393	1,872	83,5
6	1,39	0,9	0,044	0,072	6,9	0,39	0,4	0,433	3,163	5,9
7	4,45	5,7	0,057	0,132	42,2	2,85	0,8	0,280	1,729	34,4
8	2,19	1,5	0,046	0,076	46,4	2,42	0,6	0,294	3,266	34,8
9	1,89	1,9	0,044	0,070	41,0	1,18	0,6	0,044	0,056	37,4
10	1,82	2,8	0,046	0,078	48,8	1,92	1,3	0,271	3,372	45,4
11	2,06	2,2	0,044	0,079	37,6	1,51	0,9	0,240	1,540	25,9
12	1,78	1,6	0,172	0,083	15,8	2,43	1,4	0,120	0,112	12,8
13	1,50	0,8	0,053	0,083	21,6	1,05	0,5	0,488	4,066	19,2
14	1,85	1,3	0,129	0,059	33,7	1,11	0,4	0,293	1,418	42,2
15	1,13	0,8	0,057	0,103	39,7	1,44	0,4	0,044	premalo	34,2
16	1,36	1,1	0,153	0,085	37,7	3,41	2,4	0,079	0,134	48,8
17	1,44	1,6	0,048	0,091	15,7	1,87	0,9	0,433	3,886	12,5

Legenda: T-C: celokupni testosteron, T-P: prosti testosteron, E2: estradiol

Preverjanje porazdelitve rezultatov

Najprej smo s Kolmogorov-Smirnov testom ugotavljali normalnost porazdelitve zbranih podatkov o koncentracijah posameznih hormonov. To smo naredili s pomočjo statističnega programa MedCalc. Porazdeljevanje je bilo skoraj za vse rezultate, razen v dveh primerih, normalno, kajti p-vrednost je bila $> 0,05$ (Preglednica XVII). Podatki o koncentracijah estradiola ter estrona pri preiskovankah pred uvedbo terapije se niso porazdeljevali normalno, zato smo se odločili, da bomo pri nadaljnji statistični obdelavi podatkov uporabili neparametrične teste.

Preglednica XVII: *p-vrednosti pri Kolmogorov-Smirnov testu za meritve koncentracij hormonov pred terapijo in po njej*

	PRED TERAPIJO	PO TERAPIJI
št. preiskovank	17	17
TESTOSTERON – CELOKUPNI	0,089	0,731
TESTOSTERON – PROSTI	0,432	0,090
ESTRADIOL	0,021	0,699
ESTRON	0,046	0,631
DHEA-S	0,211	0,964

Ocenitev sprememb koncentracij hormonov po terapiji

Za oceno sprememb koncentracij hormonov po terapiji smo uporabili Wilcoxonov test predznačnih rangov, ki smo ga naredili s pomočjo statističnega programa MedCalc. Sprememba je bila statistično značilna, če je bila p-vrednost < 0,05 (Preglednica XVIII).

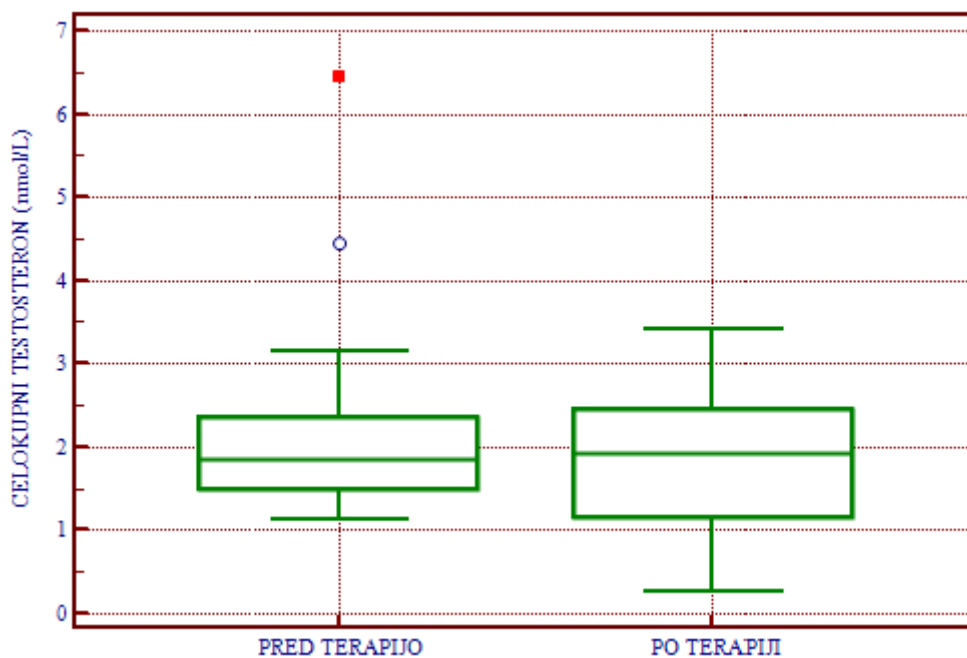
Preglednica XVIII: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačnih rangov za meritve koncentracij hormonov pred terapijo in po njej

	PRED TERAPIJO	PO TERAPIJI
TESTOSTERON-CELOKUPNI		
povprečna vrednost	2,28 (nmol/L)	1,84 (nmol/L)
p	0,089	
TESTOSTERON-PROSTI		
povprečna vrednost	2,05 (pmol/L)	1,10 (pmol/L)
p	0,001	
ESTRADIOL		
povprečna vrednost	0,07 (nmol/L)	0,23 (nmol/L)
p	0,002	
ESTRON		
povprečna vrednost	0,11 (nmol/L)	1,89 (nmol/L)
p	0,000	
DHEA-S		
povprečna vrednost	39,88 (μmol/L)	33,16 (μmol/L)
p	0,013	

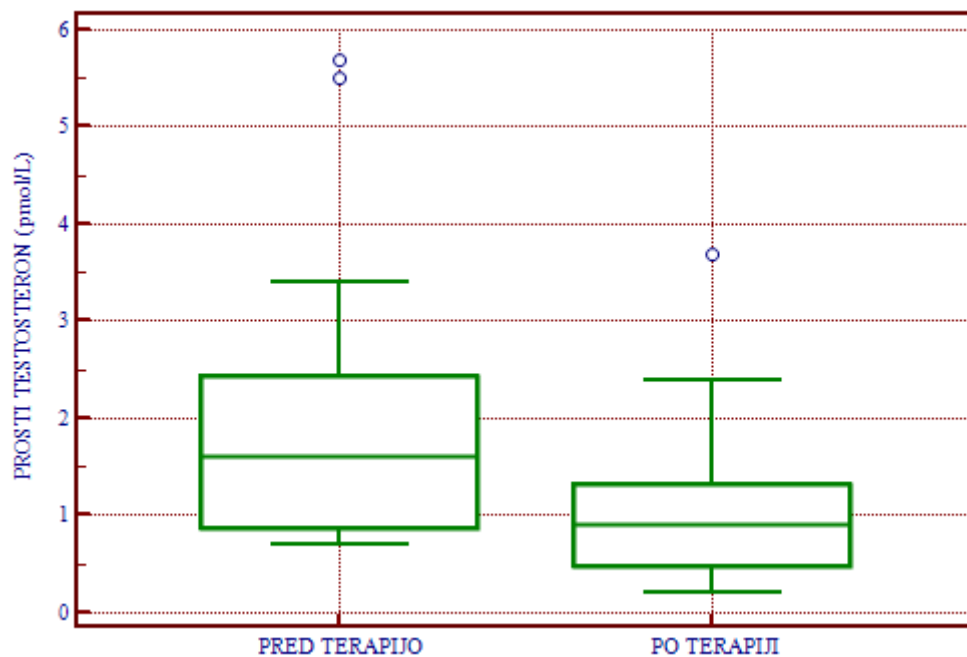
Serumska koncentracija celotnega testosterona se pred zdravljenjem in po njemu statistično značilno ne razlikuje. Serumska koncentracija prostega testosterona se je po terapiji statistično značilno zmanjšala. Serumska koncentracija estradiola in estrona se je po zdravljenju statistično značilno povečala, serumska koncentracija DHEA-S pa se je statistično značilno zmanjšala.

V Grafih 4–7 so prikazane vrednosti koncentracij posameznih hormonov pri preiskovankah pred terapijo in po njej. Grafična primerjava je predstavljena z diagramom tipa zabojev z ročaji (osrednji kvadrat označuje povprečno vrednost, zabojev predstavlja povprečje ± SD, ročaji pa 1,96-kratno vrednost maksimuma oziroma minimuma).

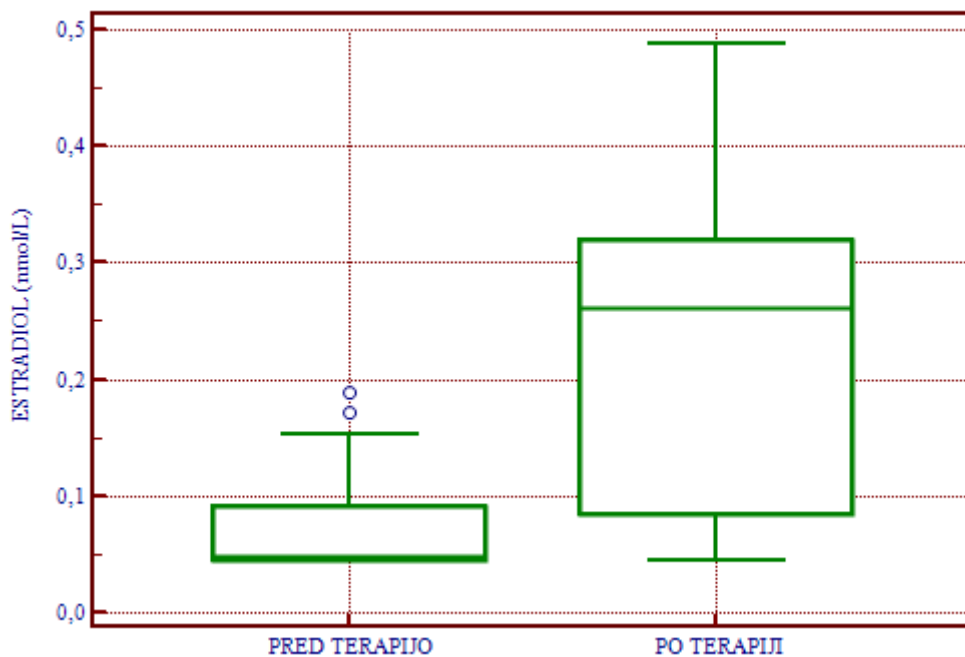
Graf 4: Razporeditev koncentracij celokupnega testosterona pri pacientkah pred zdravljenjem in po njemu



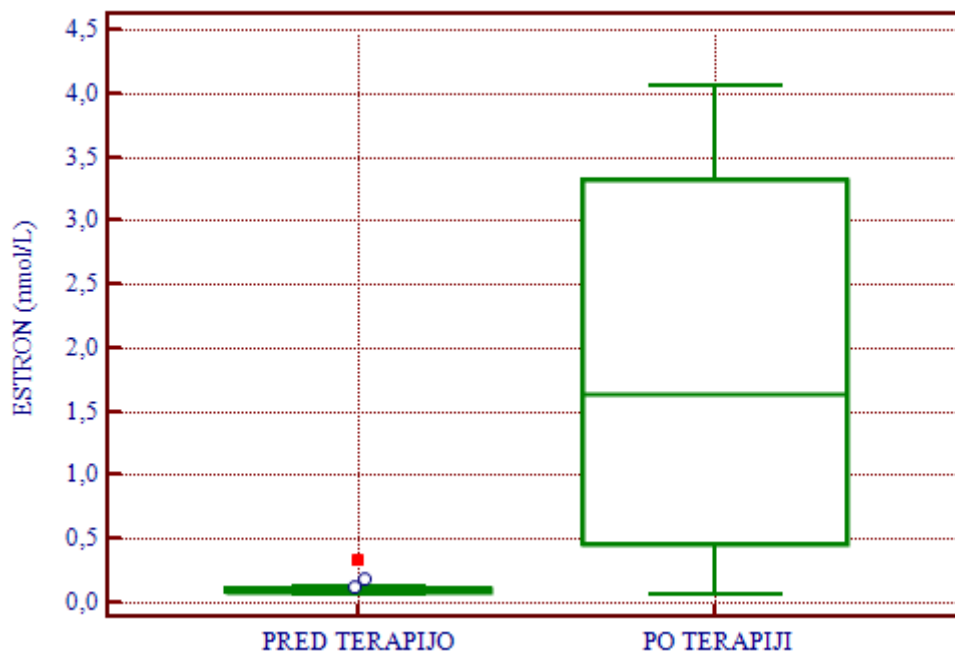
Graf 5: Razporeditev koncentracij prostega testosterona pri pacientkah pred zdravljenjem in po njemu



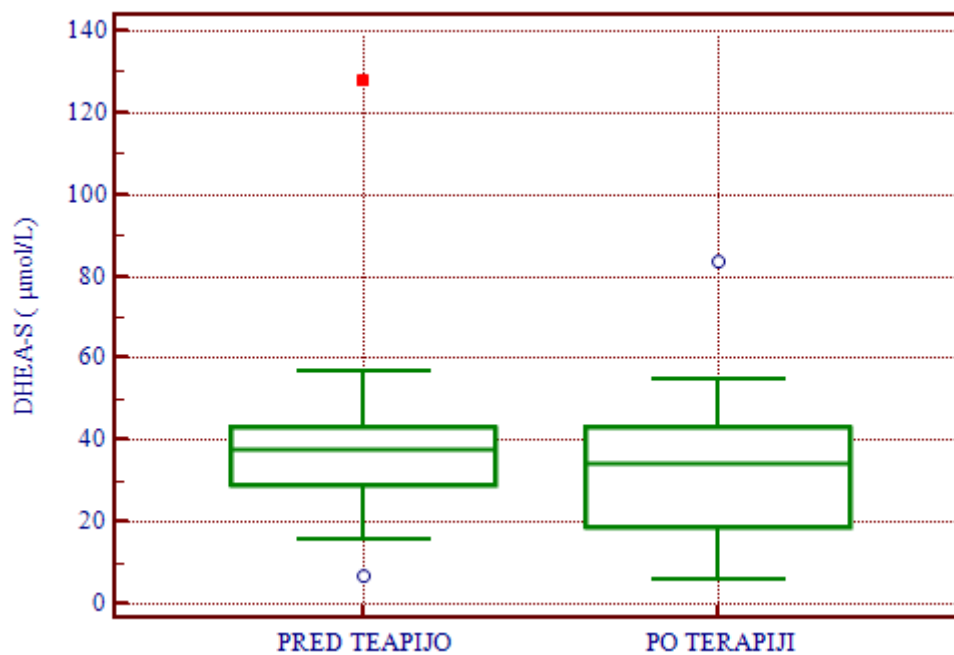
Graf 6: Razporeditev koncentracij estradiola pri pacientkah pred zdravljenjem in po njemu



Graf 7: Razporeditev koncentracij estrona pri pacientkah pred zdravljenjem in po njemu



Graf 8: Razporeditev koncentracij DHEA-S pri pacientkah pred zdravljenjem in po njemu



5 RAZPRAVA

OCENITEV POMENOPAVZNEGA OBDOBJA

Pomenopavzni status preiskovank smo ocenili z njihovimi vrednostmi koncentracij gonadotropnih hormonov (FSH in LH) ter estradiola, saj je značilno, da po menopavzi začne naraščati koncentracija FSH ter LH, koncentracija estradiola pa drastično pade. Te spremembe so bile ovrednotene v mnogih študijah. V naši raziskavi je bil pri vseh preiskovankah, razen eni, FSH močno povišan. Ta preiskovanka je imela FSH na meji, ki določa pomenopavzno obdobje. Edina tudi ni imela povišanega LH, kar lahko razložimo s tem, da koncentracija LH začne naraščati kasneje kot FSH (pri tej pa je ravno začel naraščati FSH). Pri štirih preiskovankah estradiol ni bil znižan, vendar je bil FSH povišan, kar pomeni, da so bile preiskovanke v pomenopavzi.

OCENITEV SPREMEMB KONCENTRACIJ HORMONOV PO HNZ

Glavni namen naše diplomske naloge je bil oceniti vpliv jemanja HNZ na koncentracijo testosterona ter ostalih spolnih hormonov pri pomenopavznih ženskah. Ocenjevali smo spremembe koncentracij celotnega ter prostega testosterona, estradiola, estrona ter DHEA-S. Najbolj nas je zanimal vpliv HNZ na spremembo v koncentraciji testosterona, saj ima ta sprememba vpliv na spolno življenje žensk, ki je zelo pomemben dejavnik kvalitete življenja, ter v primerjavi z drugimi vplivi HNZ ni tako poudarjen.

Koncentracija celotnega testosterona se pri preiskovankah po terapiji, v primerjavi s stanjem pred terapijo, ni statistično značilno razlikovala ($p=0,089$). Povprečna koncentracija celotnega testosterona pred terapijo je bila 2,28 nmol/L, po njej pa 1,84 nmol/L. HNZ ne vpliva na zmanjšanje celokupnega testosterona, vpliva pa na različno porazdelitev testosterona v krvi. Zviša se delež testosterona, vezanega na SHBG, ter zniža delež prostega testosterona. Od vseh merjenih hormonov HNZ nima vpliva le na koncentracijo celokupnega testosterona. Do enakega rezultata so prišli tudi v nekaterih drugih raziskavah (9, 27, 28).

Koncentracija prostega testosterona se je po zdravljenju statistično značilno zmanjšala ($p=0,001$). Povprečna vrednost pri preiskovankah je bila 2,05 pmol/L pred terapijo, po njej pa 1,100 pmol/L. Na padec koncentracije prostega testosterona torej vpliva HNZ. Vse naše preiskovanke so prejemale enako terapijo, in sicer estrogensko nadomestno zdravljenje. Po peroralni aplikaciji estrogeni prehajajo neposredno v jetrni krvni obtok, zato začetna visoka koncentracija estrogenov povzroči spremembe v jetrni presnovi. To se kaže v različnih spremembah, ena izmed njih je tudi povečana sinteza SHBG (vezavni globulini za spolne hormone). Testosteron se zaradi svoje lipidotopnosti v krvi veže na SHBG (80 %), na albumin (19 %), 1 % pa je nevezanega. Le nevezan testosteron je biološko aktiven. Glavni dejavnik, ki določa raven prosto krožečega testosterona, pa je serumska koncentracija SHBG. Torej peroralno jemanje estrogenov poveča jetrno nastajanje SHBG, to poveča odstotek vezanega testosterona in s tem zmanjšanje prostega biološko razpoložljivega testosterona. Ta ugotovitev je bila dokazana tudi v različnih študijah. V teh študijah, za razliko od naše, so tudi potrdili statistično značilno povečanje koncentracije SHBG po estrogenskem nadomestnem zdravljenju. Prav tako so potrdili, da v kontrolni skupini preiskovank, ki ni prejemale HNZ, ni prišlo do spremembe v koncentraciji SHBG (9, 27). Kako zelo se poveča koncentracija SHBG glede na dozo peroralno dodanega estrogena, je bilo prav tako ovrednoteno. Manjše doze estrogena niso imele vpliva na povečanje koncentracije SHBG, večje pa (9). Vpliv na vrednosti SHBG je odvisen tudi od načina aplikacije HNZ, in sicer pri transdermalni aplikaciji ne pride do tako očitne indukcije v sintezi SHBG (28).

Pri analizi koncentracije estradiola smo ugotovili, da se je ta po terapiji statistično značilno povečala ($p=0,002$). Povprečna vrednost estradiola pred terapijo je bila 0,07 nmol/l, po njej pa je narasla na 0,23 nmol/L. To je bil pričakovan rezultat, saj so preiskovanke 3 mesece jemale 2 mg sinteznega 17β -estradiola na dan, ta pa je kemično in biološko identičen endogenemu estradiolu. Vendar koncentracija estradiola glede na vnos ne naraste tako zelo, kajti pri peroralni aplikaciji se estradiol metabolizira pri prvem prehodu skozi jetra.

Prav tako kot pri analizi estradiola, smo tudi po analizi rezultatov koncentracij estrona ugotovili, da se je koncentracija estrona po terapiji statistično značilno povečala ($p=0,000$). Povprečna vrednost estrona pred terapijo je bila 0,11 nmol/L, po njej pa 1,89 nmol/L. Če primerjamo povečanje koncentracije estradiola ter estrona po HNZ, ugotovimo, da se je

koncentracija estrona občutno bolj povečala. To je posledica, da se peroralno apliciran estradiol v jetrih pretvori v estron, zato je raven estrona v krvi višja od ravni estradiola.

Ugotovili smo tudi, da se je pri pacientkah po terapiji statistično značilno zmanjšala koncentracija DHEA-S. Povprečna vrednost DHEA-S pred terapijo je bila 39,88 $\mu\text{mol/L}$, po njej pa 31,16 $\mu\text{mol/L}$. Na zmanjšanje koncentracije DHEA-S vpliva peroralno dodani estradiol. Estradiol naj bi zaviralno vplival na biosintezo androgenov v nadledvični žlezi, preko inhibicije 17-hidrolaze/17-20 liaze encimskega sistema. Rezultati študij o vplivu HNZ na koncentracijo DHEA-S so različni. V eni izmed njih so dokazali, da na zmanjšanje koncentracije DHEA-S vplivajo le višje doze dodanega estradiola (9), v drugi študiji niso zaznali statistično značilne spremembe v koncentraciji DHEA-S po zdravljenju (27).

6 ZAKLJUČEK

Ženska preživi tretjino svojega življenja v pomenopavznem obdobju. Spremembe, ki jih prinaša upad funkcije jajčnikov in s tem drastičen padec spolnega hormona estradiola, lahko pomembno vplivajo na kakovost življenja. Če so težave, kot so npr. vročinski navali, znojenje, suhost nožnice ali pogosto uriniranje, prisotne ter zelo izrazite, jih lahko uspešno lajšamo s hormonskim nadomestnim zdravljenjem, ki pa ima tudi nekatere neželene učinke. Predvsem peroralno HNZ povzroči porast SHBG, kar ima za posledico zmanjšanje koncentracije prostega testosterona, le-ta pa lahko vpliva na upad libida ženske.

V raziskavi smo ugotovili, da je po terapiji s HNZ koncentracija:

- **celotnega testosterona ostala nespremenjena,**
- **prostega testosterona zmanjšana,**
- **estradiola ter estrona povečana,**
- **DHEA-S zmanjšana.**

Potrdili smo, da ima HNZ vpliv na spremembo koncentracije testosterona, in sicer prostega testosterona, ki ima vpliv na libido žensk. Prav tako se je po HNZ povečala koncentracija estrogenov, kar vpliva na izboljšanje pomenopavznih simptomov.

Pomembno je, da se pred zdravljenjem bolnice seznanijo z učinkom HNZ na spolnost, z različnimi oblikami jemanja HNZ in ustreznostjo odmerkov, hkrati pa se jim ponudi tudi obisk pri drugih strokovnjakih, saj libido ni odvisen zgolj od koncentracije testosterona, temveč nanj vplivajo tudi drugi dejavniki.

7 LITERATURA

1. Marjanovič Umek L, Zupančič M. Razvojna psihologija. 1. izdaja., Založba Rokus d.o.o., Ljubljana 2004: 10-12, 132-139, 143-145.
2. Berne R, Levy M. Principles of Physiology. 4. izdaja., Mosby, St. Louis 2006: 699-706, 724-737.
3. Rupnik M, Bresjanac M. Patofiziologija s temelji fiziologije. 3. izdaja., Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2002: 161-162.
4. Rang H.P, Dale M.M. Rang and Dale's Pharmacology. 6. izdaja., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia 2007: 445-451.
5. Wikipedija. Slika: Menstrual Cycle. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:MenstrualCycle-sl.png>. Dostopano: 06-2010.
6. Kristan K, Lanišnik Rižner T. 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze – obetajoče farmakološke tarče. Farm Vestn 2005; 56: 259-268.
7. Pinter B. Sploni hormoni in njihovi biološki učinki. Med Razgl 2001; 40: 415-421.
8. Gardner G, Shoback D. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 8. izdaja., New York 2004: 537-542, 501-516.
9. James S. Estrogen replacement therapy: effects on the endogenous androgen milieu. Fertility and Sterility 2002; 77 (4): 77-82.
10. Meden-Vrtovec H, Franić D. Izbrana poglavja s področja klimakterija. Arkadija, Ljubljana 2007: 12-16.
11. Meden-Vrtovec H. Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji. Klinični center, SPS Ginekološka klinika 2002: 99-112.
12. International Menopause Society. Menopause Terminology. http://www.imsociety.org/menopause_terminology.php. Dostopano: 06-2010.
13. Pinter B, Meden-Vrtovec H, Maček M et al. Menopavza v Sloveniji: Značilnosti žensk in pojavnost perimenopavznih simptomov. Zdrav Vestn 2003; 72: II-9-12.
14. Lukanović A. Hormonsko zdravljenje v uroginekologiji. Zdrav Vestn 2009; 78: I-157-60.
15. Vrabič-Dežman L. Atrofični Vaginitis. Zdrav Vestn 2009; 78: I-105-8.
16. Lukanović A. Lokalno hormonsko zdravljenje pri mikcijskih motnjah v pomenopavzi. Zdrav Vestn 2008; 77: III-59-64.

17. Žegura B, Gužič-Salobir B. Hormonsko nadomestno zdravljenje po menopavzi in srčno-žilne bolezni: Dejstva in dileme. Zdrav Vestn 2009; 78: I-165-8.
18. Demšar A. Zlomi zaradi osteoporoze. Služba za raziskovalno delo in izobraževanje Splošne bolnišnice Celje, 1999: 15-20.
19. Franić D. Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. Zdrav Vestn 2009; 78: I-143-50.
20. IMS Updated Recommendations on postmenopausal therapy. Climacteric 2007; 10: 181-194.
21. Position Statement Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 2010; 17 (2): 242-255.
22. Franić D. Nadomestno hormonsko zdravljenje v pomenopavi – kje smo danes?. Zdrav Vestn 2007; 76: 101-108.
23. Franić D. Hormonske možnosti zdravljenja v perimenopavzi in kasneje. Zdrav Vestn 2008; 77: III-9-15.
24. Zihrel S. Spolnost po menopavzi. Zdrav Vestn 2008; 77: III-69-71.
25. Meden-Vrtovec H. Nadomestno zdravljenje z androgeni v pomenopavzi. Zdrav Vestn 2008; 77: III-17-20.
26. Baza podatkov o zdravilih. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Estrofem. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-006780.pdf&dir=smpc>. Dostopano: 06-2010.
27. Ali I, James T, Meston N et al. Age and hormone replacement therapy as factors influencing androgen levels in the postmenopausal female. Clin Chem Lab Med 2009; 47 (2): 202-207.
28. Kraemer G, Kraemer R, Ogden B et al. Variability of serum estrogens among postmenopausal women treated with the same transdermal estrogen therapy and the effect on androgens and sex hormone binding globulin. Fertility and Sterility 2003; 79 (3): 534-542.