

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANJA VEINDORFER

**PRIMERJAVA REZULTATOV DOLOČANJA  
PROGESTERONA V POLNI KRVI IN PLAZMI**

-

**COMPARISON OF THE RESULTS OF  
DETERMINING PROGESTERONE IN FULL BLOOD  
AND IN PLASMA**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratoriju za analitiko hormonov Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Kliničnem centru pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., višjemu svetniku, za strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, prijateljem in vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge in mi bili v oporo v času študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

## Kazalo vsebine

POVZETEK.....	5
SUMMARY.....	6
UVOD.....	8
1. ENDOKRINI SISTEM.....	8
1.1. Splošno o fiziologiji endokrinega sistema in hormonov.....	8
1.2. Delitev hormonov.....	9
1.3. Mehanizem delovanja hormonov.....	9
1.4. Sinteza in sekrecija hormonov.....	10
1.5. Kontrola izločanja hormonov.....	10
1.6. Prenos hormonov.....	11
1.7. Uravnavanje tvorbe hormonov.....	11
1.8. Metabolizem hormonov.....	12
2. STEROIDNI HORMONI.....	12
3. SPOLNE ŽLEZE – GONADE.....	17
3.1. Jajčnika ali ovarija.....	17
3.1.1. Dozorevanje ovarijskih foliklov.....	18
3.1.2. Folikularna tekočina.....	19
3.1.3. Ovarijski steroidni hormoni.....	20
3.1.3.1. ESTROGENI.....	20
3.1.3.2. PROGESTINI.....	21
3.1.3.3. ANDROGENI.....	21
3.1.4. Uravnavanje delovanja ovarijev.....	22
3.1.4.1. MENSTRUACIJSKI CIKLUS.....	22
4. ENDOKRINE BOLEZNI.....	24
4.1. Bolezni ovarija.....	24
5. PROGESTINI.....	25
5.1. Progesteron.....	25
5.2. Mehanizem delovanja.....	26
5.3. Biosinteza.....	27
5.5. Določanje progesterona.....	29
5.6. Učinki progesterona ob porodu.....	29
5.7. Laktacija.....	29
5.8. Merjenje progesterona.....	30
6. TESTIRANJE OB PACIENTU (Point of care testing - POCT).....	31
6.1. Prednosti testiranja ob pacientu.....	32
6.2. Slabosti testiranja ob pacientu.....	33
7. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV.....	35
7.1. Radioimunske tehnike.....	35
7.2. Encimskoimunske tehnike (eia).....	35
7.3. Imunofluorescenčne tehnike.....	35
7.4. Kromatografija (HPLC).....	35
NAMEN DELA.....	36
METODE IN MATERIALI.....	37
1. DEFINICIJA SKUPINE.....	37
2.1. Princip analizatorja Pathfast.....	37

2.2. Uporaba analizatorja Pathfast.....	38
2.3. Prednosti analizatorja Pathfast.....	38
2.4. Delovanje analizatorja Pathfast.....	38
2.5. Tehnične specifikacije analizatorja Pathfast.....	39
2.6. Določanje progesterona z analizatorjem Pathfast.....	40
REZULTATI.....	41
1. KONCENTRACIJA PROGESTERONA V PLAZMI IN POLNI KRVI.....	41
Tabela III: Koncentracija progesterona, izmerjena na analizatorju Pathfast v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi.....	41
1.1. Korelacija in regresija.....	45
2. PONOVLJIVOST, LINEARNOST REDČENJA IN PRIDOBITEK DODATKA.....	46
2.2. Ponovljivost v seriji za progesteron .....	46
2.3. Ponovljivost izven serije za progesteron .....	47
2.4. Linearnost redčenja.....	49
2.5. Pridobitek dodatka.....	51
RAZPRAVA.....	54
SKLEP.....	57
LITERATURA.....	58

## POVZETEK

Ravnovesje hormonov je ključnega pomena za delovanje našega organizma. Kadar pride do motenj v ravnovesju hormonov, lahko pride do številnih bolezni in težav. Progesteron je ključni hormon v življenju žensk. Hormon progesteron izločajo jajčniki, skorja nadledvične žleze in rumeno telesce. V organizmu nastaja progesteron iz predhodnika steroidnega hormona pregnenolona. V obdobju ženske plodnosti je glavna funkcija progesterona, da pripravi maternico na nosečnost in da podpira razvoj zarodka. Vsak mesec se nivo progesterona dvigne v pričakovanju nosečnosti in tako stimulira odebelitev sluznice. Če do oploditve ne pride, nivo progesterona močno pade in se začne menstruacija. Pomanjkanje progesterona preprečuje zanositev.

V diplomski nalogi smo primerjali rezultate progesterona, dobljene na analizatorju Pathfast, in sicer med plazmo in polno krvjo. Analizator Pathfast je imunološki analizator, ki deluje na podlagi kemiluniscenčne tehnologije s patentirano tehnologijo „Magtration“.

Za pravilno in zanesljivo primerjavo rezultatov smo vzorce analizirali na istem analizatorju, saj smo želeli ugotoviti, ali je določitev progesterona v polni krvi boljša kot v plazmi in obratno.

Za primerjavo rezultatov smo vzeli 67 vzorcev naključnih preiskovancev. Analizo smo opravili v polni krvi in plazmi.

Za ugotovitev povezanosti obeh metod (polna kri / plazma) smo uporabili linearno regresijo, da smo ugotovili povezanost rezultatov. Za oceno moči povezave smo izračunali Pearsovo korelacijski koeficient, ki nam je nakazal močno koleracijo. Določanje progesterona v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi na analizatorju Pathfast daje visoko primerljive rezultate.

Izračunali smo še ponovljivost v seriji in izven serije, linearnost in pridobitek dodatka. Ponovljivost v seriji pri vseh kontrolnih vzorcih je bila dobra, medtem ko je bila ponovljivost izven serije nekoliko slabša. Izračunali smo tudi linearnost redčenja.

Rezultati kažejo, da za analizo progesterona lahko uporabimo tako heparizirano plazmo kot heparizirano polno kri. Na oddelkih, kjer nimamo centrifuge, lahko določamo progesteron iz polne krvi; rezultati so točni, analize pa so pripravljene v krajšem času.

## SUMMARY

Hormones balance is crucial for the functioning of our organism. When there is a disturbance in the hormones balance, then many diseases and problems can occur. Progesterone is a key hormone in women's lives. Ovaries produce progesterone hormone. In the body progesterone is produced from the precursor of steroid hormone pregnenolone. During the period of female fertility is the main function of progesterone to prepare the uterus to for pregnancy and support fetal development. Each month, the level of progesterone rises in anticipation of pregnancy, so it stimulates the thickening of the mucosa. If fertilization does not occur, progesterone levels fall sharply and menstruation begins. The lack of progesterone prevents pregnancy.

In this thesis, we compared the results obtained by the analyzer Pathfast, between plasma and full blood. Analyzer Pathfast is the immunological analyzer that works on the basis of chemiluminescent technology with patented "Magtration" technology.

For proper and reliable comparison of the results, we analyzed the samples on the same analyzer, because we wanted to determine whether the determination of progesterone in whole blood is better than in plasma, and vice versa.

For the comparison of the results, we took 67 samples of subjects at random. The analysis per subject was conducted in whole blood and plasma. In order to establish connection between the two methods (whole blood / plasma), we used linear regression, to find the correlation of results. To assess the connection power, we calculated the Pears correlation coefficient which indicated a strong corelation. Determination of progesterone in plasma and full blood in analyzer Pathfast, give highly comparable results.

We also calculated the repeatability in and out of the series, linearity and the profit of the supplement. Repeatability in the series with all the control samples was positive, while the repeatability is slightly poorer outside the series. We calculated the linearity of dilution as well.

The results show that for the analysis we can use both plasma as well as whole blood. In the sections where we do not have a centrifuge, the progesterone can be determined from the full blood; the results are accurate and the analysis are ready in less time.

## SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

**ACHT:** adrenokortikotropni hormon

**LH:** luteinizirajoči hormon

**FSH:** folikle stimulirajoči hormon

**DHEA:** dehidroepiandrosteron

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroksisteroid

**DHT:** dihidrotestosteron

**hCG oz.  $\beta$ -HCH:** humani horionski gonadotropin

**AMP:** adenozinmonofosfat

**POCT:** testiranje ob pacientu

**CTN 1:** srčni troponin 1

**CK-MB:** MB izoencim kreatinin kinaze

**hs-CRP:** C-reaktivni protein visoke občutljivosti

**D-dimer:** je topni produkt razgradnje fibrinskega strdka s plaznimon

# UVOD

## 1. ENDOKRINI SISTEM

### 1.1. Splošno o fiziologiji endokrinega sistema in hormonov

**Endokrini sistem** je nadzorni sistem žlez z notranjim izločanjem (endokrinih žlez), ki izločajo kemijske prenašalce, hormone. Ti krožijo po telesu v krvnožilnem sistemu in tako vplivajo na delovanje oddaljenih organov (1).

Beseda endokrini izhaja iz grških besed ENDON, ki pomeni znotraj, in CRINO, ki pomeni izstopiti. Žleze z notranjim izločanjem so organi ali skupine celic, katerih osnovna funkcija je ustvarjanje in izločanje specialne in biološko aktivne snovi v notranjost organizma. Te žleze nimajo izhodnih kanalov, s čimer se razlikujejo od eksokrinih žlez.

Produkti endokrinih žlez so **hormoni**, ki so dobili ime iz grške besede HORMAO, kar pomeni dražilen oziroma spodbujevalen. Z besedo hormon označujemo kemične snovi, ki jih tvorijo določene endokrine celice in se sproščajo v krvni obtok. Po krvi potujejo do oddaljenih celic, kjer sprožijo za določeni hormon značilen biokemični učinek.

Osnovne značilnosti hormonov so:

- **visoka biološka aktivnost** - izraža se v njihovi veliki aktivnosti z nizkimi koncentracijami,
- **specifičnost** - hormoni povzročijo specifične odgovore organov in tkiv,
- **vpliv na daljavo** - prek krvi potujejo do oddaljenih celic in tam povzročijo učinek.

Hormoni krožijo po krvi v dveh oblikah, in sicer vezani, v glavnem v neaktivni in v aktivni obliki. Ta lastnost dveh oblik kroženja hormonov je pomembna, da se organizem ubrani presežene koncentracije aktivne oblike hormona, neaktivna oblika hormona služi organizmu kot rezerva.

Hormoni delujejo na oddaljena tkiva zaradi prisotnosti struktur v celicah, ki jih imenujemo receptorji. To pomeni, da hormoni delujejo le prek receptorjev (2).



## 1.2. Delitev hormonov

Glede na mesto nastanka in način delovanja delimo hormone v štiri skupine:

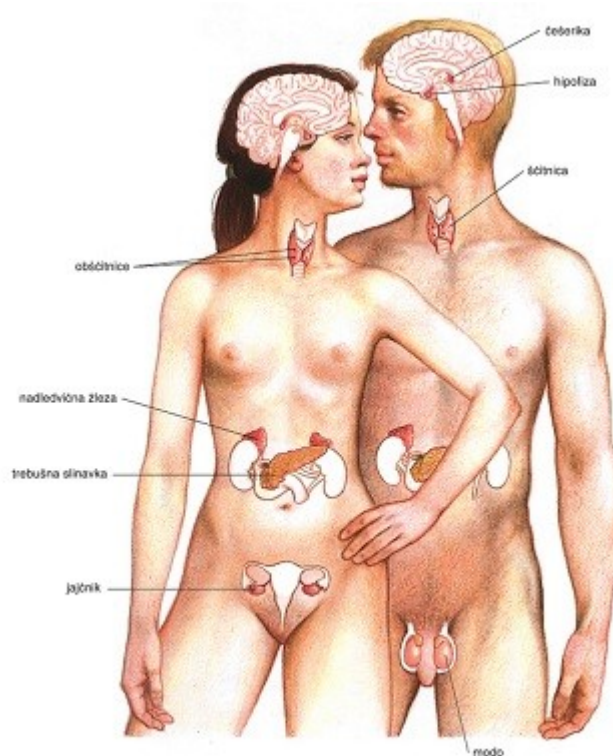
1. **nevrosekrecijski hormoni**,
2. **žlezni hormoni**,
3. **izvenžlezni hormoni**,
4. **mediatorji**.

Po kemijski zgradbi hormone delimo na:

1. **steroidne hormone** (aldosteron, kortizol, estradiol, progesteron, testosteron, vitamin D ...),
2. **aminokislinske hormone in amine** (adrenalin, noradrenalin, tiroksin, trijodtironin),
3. **peptidne hormone** (adrenokortikotropni hormon, angiotenzin, holecistokinin, eritropoetin, gastrin, insulin, somatostatin, oksitocin, parathormon, antidiuretični hormon, prolaktin ...),
4. **proteinske hormone** (folikle stimulirajoči hormon, luteotropni hormon, humani horionski gonadotropin, tireotropin ...)

## 1.3. Mehanizem delovanja hormonov

Hormoni delujejo bodisi na celični površini bodisi v sami celici. Mnogo hormonov se veže na specifične receptorje na celični površini (G proteine), s čimer povzročijo aktivacijo t. i. sekundarnega prenašalca. Preostali hormoni, posebej steroidi, stopajo v celice, kjer se vežejo s citoplazemskimi receptorji v komplekse, ki nato prehajajo v celična jedra. V jedru aktivirajo DNA. Končna reakcija je sinteza proteinov.



Slika 1: Endokrini sistem človeka

#### 1.4. Sinteza in sekrecija hormonov

Hormoni nastajajo na dva načina. Peptidni hormoni se tvorijo tako, da geni odgovorijo sekundarnemu glasniku (mRNA) in ustvarijo proteinski prohormon, ki se potem še preoblikuje in v končni obliki kot aktivni hormon deluje na ciljno celico.

Steroidni hormoni nastajajo iz holesterola. Za pretvorbo od holesterola do aktivnega hormona je potrebna vrsta encimov.

#### 1.5. Kontrola izločanja hormonov

Osnovni kontrolni mehanizem delovanja hormonov je t. i. povratna zveza ali zanka. Poznamo redko pozitivno (+) in veliko bolj pogosto negativno (-). Primer povratne zanke je kontrola izločanja hormonov na osi hipotalamus-hipofiza-ščitnica (3).

## 1.6. Prenos hormonov

Hormoni potujejo od mesta izločanja do ciljne celice po krvi, limfi ali medcelični tekočini. Peptidni hormoni so večinoma topni v vodi in potujejo nevezani. Steroidni in ščitnični hormoni potujejo v plazmi, vezani na posebne beljakovine ali pa prosti. Prostih, nevezanih steroidov in ščitničnih hormonov je malo in so vedno v ravnotežju z vezano frakcijo. Prosti hormon + vezalna beljakovina  $\leftrightarrow$  hormon – vezalna beljakovina. Samo prosti hormon je aktiven. Vezani hormoni so zaloga hormonov; lahko se takoj sprostijo in delujejo na ustreznih mestih. Razmerje med količino vezanega in prostega hormona v plazmi je odvisno od:

- koncentracije hormona,
- koncentracije vezalne beljakovine,
- afinitete hormona do vezalne beljakovine.

Sprememba količine vezalne beljakovine ne vpliva na hormonsko stanje. Pri večji količini vezalne beljakovine je delež prostega hormona manjši. Ker samo prosti hormon sodeluje pri uravnavanju izločanja hormonov, nizke vrednosti prostega hormona spodbudijo izločanje večjih količin nadrejenih regulacijskih hormonov. Zato se poveča izločanje in sproščanje hormonov ter doseže primerno raven prostega aktivnega hormona.

## 1.7. Uravnavanje tvorbe hormonov

Tvorba vseh hormonov je pod vplivom določenih regulacijskih mehanizmov. Posebnost endokrinega sistema je, da hormoni sami ali s svojimi metaboličnimi učinki v povratnih zvezah uravnavajo lastne regulacijske mehanizme.

Mehanizem povratne zveze predstavlja kontrolni sistem izločanja hormonov. Endokrine žleze izločajo hormone le ob ustreznih dražljajih, ki so nujni za vzdrževanje homeostaze. Uravnavanje homeostaze je omogočeno prek kontrolnega mehanizma negativne povratne zveze. Negativna povratna zveza uravnava izločanje hormonov in preprečuje hiperaktivnost in hipoaktivnost endokrinih žlez.

## 1.8. Metabolizem hormonov

Koncentracija hormona v plazmi je odvisna od hitrosti njegovega izločanja in metabolizma.

$$PH = \frac{SR}{MCR}$$

Enačba: 1

PH = koncentracija hormona v plazmi,

SR = hitrost izločanja hormona,

MCR = hitrost metabolnega klirensa hormona.

Hormoni se razgrajujejo v celicah, kjer delujejo, ali v ledvicah in jetrih. Samo manjše količine hormonov se izločajo z urinom ali žolčem brez predhodne metabolične pretvorbe. Sprememba hitrosti metaboličnega klirensa ali izločanja hormona ne spremeni njegove plazemske koncentracije, ker v obeh primerih takoj ukrepajo mehanizmi uravnavanja hormonov in popravijo "napako". Pri hujših boleznih jeter ali ledvic so procesi razgradnje hormonov počasnejši, plazemske koncentracije hormona pa višje. Te takoj zavrejo izločanje regulacijskega tropnega hormona, hitrost izločanja se zmanjša in plazemska koncentracija hormona se zopet ustali na normali (4).

## 2. STEROIDNI HORMONI

Predstavljajo pet pomembnih skupin:

- 1) progesteroni (21C)
- 2) glukokortikoidi (21C)
- 3) mineralokortikoidi (21C)
- 4) androgeni (19C)
- 5) estrogeni (15C)

Vsi vsebujejo osnovno strukturo holesterola, razlikujejo se v lokaciji polarnih skupin. Biokemija sinteze steroidnih hormonov je presenetljiva, kajti izhodna spojina za en tip steroidnega hormona ima pogosto sama svojo biološko aktivnost (5).

Nadledvična žleza izloča steroidne hormone (skorja) in kateholamine (sredica). Skorja izloča glukokortikoide, ki prvenstveno uravnavajo metabolizem ogljikovih hidratov, mineralokortikoide, ki uravnavajo ekstracelularno ravnotežje natrija in kalija, in androgene. Steroidogeneza v skorji nadledvične žleze se razlikuje od steroidogeneze v ovarijih in testisih. Ker v gonadah ni encimov 21-alfa hidroksilaze in 11-beta hidroksilaze, se v njih ne tvorijo glukokortikoidi in mineralokortikoidi. Celice endokrinih tkiv, kjer poteka steroidogeneza, so morfološko zaznamovane s številnimi maščobnimi kapljicami, v katerih je holesterol, in s številnimi mitohondriji ter gladkim endoplazmatskim retikulumom.

Proces steroidogeneze je mnogo bolj zapleten od tvorbe polipeptidnih ali aaminskih hormonov. Tako je npr. za tvorbo estradiola iz holesterola potrebno kar 9 encimov, torej 9 ustreznih genov. Zato se steroidni hormoni tudi ne tvorijo v malignih ali drugih celicah zunaj specifičnih endokrinih organov. Mesto tvorbe steroidnih hormonov celici so citoplazma, endoplazmatski retikulum in mitohondriji. Steroidni hormoni se v celici ne kopičijo. Hitrost izločanja steroidnih hormonov je torej enaka hitrosti sinteze.

Holesterol je običajni predhodnik vseh steroidnih hormonov. Za sintezo se lahko uporabi holesterol iz plazme, in sicer iz LDL frakcije lipoproteinov ali pa nastane prek mevalonata, skvalena in lanosterola iz acetata. Konverzija holesterola v pregnenolon je prva in odločujoča stopnja v sintezi vseh steroidnih hormonov. To stopnjo v skorji nadledvične žleze regulirata adrenokortikotropni hormon (ACTH) in angiotenzin II, v testisu luteinizirajoči hormon (LH) ter v ovariju foliklestimulirajoči hormon (FSH) in LH. Vse te konverzije se dogajajo pod vplivom citokrom P450 encima P450<sub>scc</sub> (side chain cleavage). Ta encim povzroči hidroksilacijo na mestu 20 in 22 ter cepitev holesterolove verige na mestu C 20-22. Zmanjšanje aktivnosti P450<sub>scc</sub> povzroči zmanjšano sintezo vseh steroidnih hormonov. Iz pregnenolona oziroma progesterona lahko po 17 $\alpha$ -hidroksilaciji nastane 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon oz. 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron. V naslednji fazi pride do cepitve vezi C 17, 20 (17, 20 liaza) z nastankom DHEA iz pregnenolona in androstendiona iz progesterona. Encima 17 $\alpha$ -hidroksilaza in 17, 20 liaza predstavljata P450<sub>c17</sub>. Njihovo razmerje je različno v nadledvični žlezi in testisu in od tod različna sinteza encimov.

P450<sub>c21</sub>, ki je strukturno soroden P450<sub>c17</sub>, povzroči hidroksilacijo na metu C21 z nastankom dezoksikortikosterona oziroma 11-dezoksikortizola. Konverzija pregnenolona v

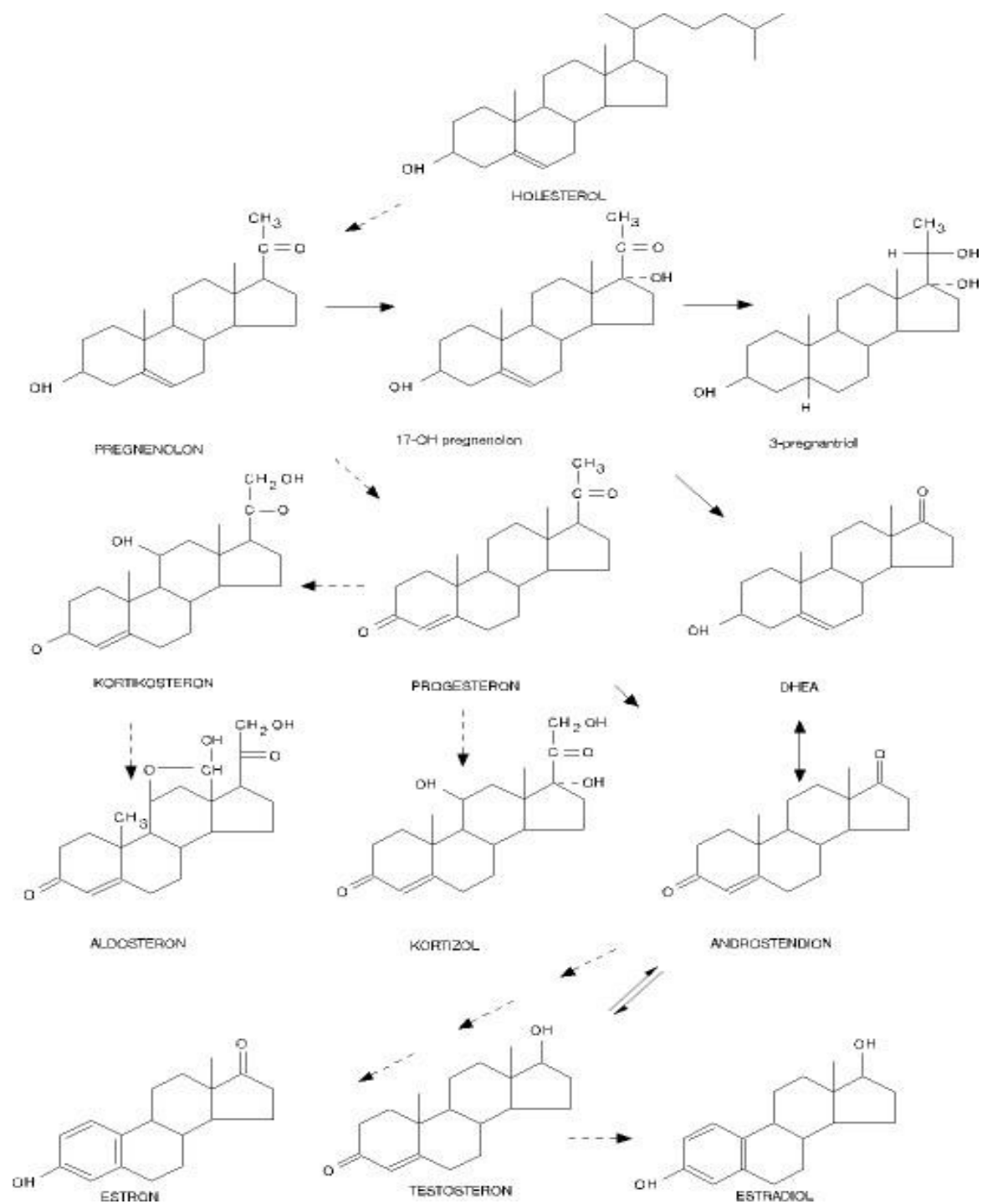
androstendion prek 17-hidroksi-pregnenolona in DHEA zahteva oksidacijo  $3\beta$ -hidroksilne skupine v keto skupino, čemur sledi premik dvojne vezi z mesta C5-6 na C4-5. Obe pretvorbi potekata pod vplivom encima  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze ( $3\beta$ -HSD). Zmanjšana aktivnost  $3\beta$ -HSD vodi do zmanjšane sinteze kortizola in aldosterona ter povečane sinteze DHEA, kar vodi do virilizacije eksternih genitalij pri ženskem zarodku in do znižane produkcije testosterona, kar povzroči ginekomastijo v puberteti.

Konverzija androstendiona do testosterona poteka pod vplivom 17-ketosteroid reduktaze, ki jo prav tako imenujemo 17-oksireduktaza ali  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza ( $17\beta$ -HSD). Tako kot  $3\beta$  je tudi  $17\beta$ -HSD necitokromski encim lociran v endoplazmatičnem retikulumu. Pomanjkanje tega encima je redko, in sicer kot pojav eksternih ženskih spolnih organov pri moškem, oziroma z virilizacijo v puberteti z ali brez ginekomastije.

Testosteron je biološko najučinkovitejši androgen, ki primarno deluje na mišice, hipofizne gonadotrope in Wolffianovo izvodilo. Pod vplivom  $5\alpha$  reduktaze iz testosterona nastaja prav tako biološko aktiven androgen DHT, ki primarno deluje lokalno na kožo ob spolovilih in lasne folikle. Pomanjkanje  $5\alpha$  reduktaze je redko avtosomno recesivno obolenje, ki pri moških povzroči izredno povečanje zunanjih spolnih organov. DHEA-S je drugi najpomembnejši steroid, ki nastaja v skorji nadledvične žleze odraslega človeka. Sulfati steroidov nastanejo pod vplivom citozolskega encima sulfotransferaze (6).

**Tabela: I: Opis steroidnih hormonov**

<b>STEROIDNI HORMONI</b>		
<b>RAZRED</b>	<b>SPOJINA</b>	<b>OSNOVNA BIOLOŠKA VLOGA</b>
glukokortikoidi	kortizol	spodbuja glukoneogenezo, zavira vnetni odziv
mineralokortikoidi	aldosteron	uravnava ravnovesje kationa
progesteron		uravnava spremembe, ki so potrebne za vzdrževanje nosečnosti
androgeni	testosteron	odgovoren za razvoj in vzdrževanje moških spolnih znakov
estrogeni	estradiol	odgovoren za razvoj in vzdrževanje ženskih spolnih znakov



Slika 2: Biosinteza androgenov (polna črta predstavlja enostopenjsko konverzijo, prekinjena črta večstopenjsko pretvorbo)



### 3. SPOLNE ŽLEZE – GONADE

#### 1. moda – testisa

- semenčice (spermiji),
- testosteron.

#### 2. jajčnika ali ovarija

- jajčeca,
- estrogen, **progesteron.**

#### 3.1. Jajčnika ali ovarija

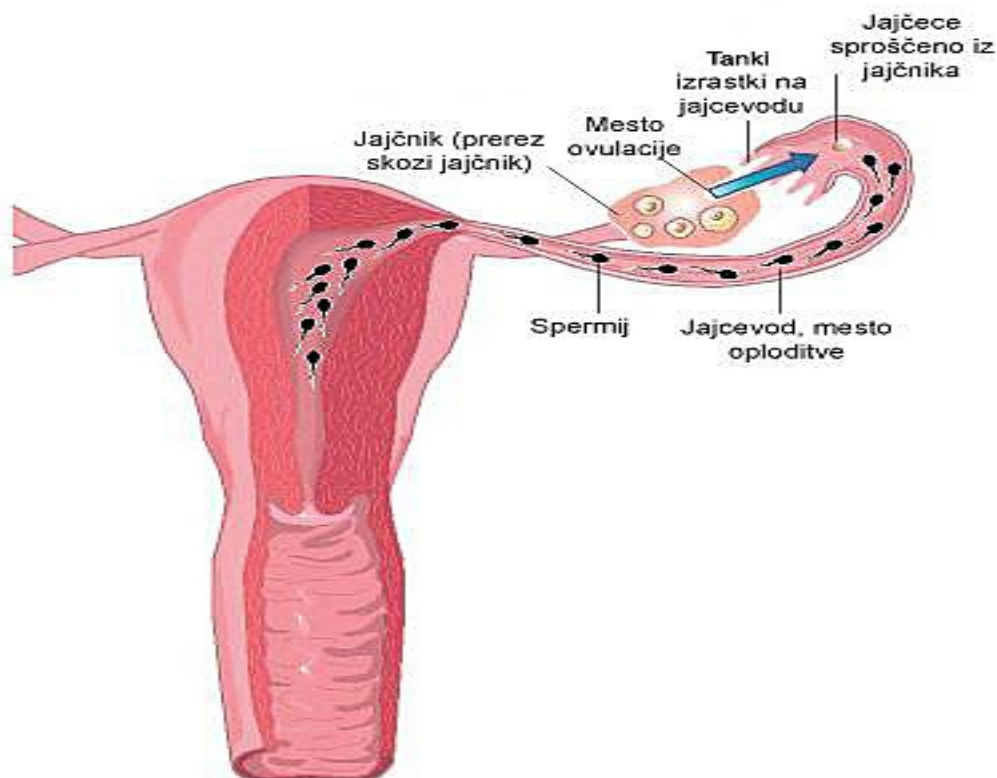
Ovarij je žleza, kjer se razvijejo spolne celice (oociti) ter se proizvajajo nesteroidni in steroidni hormoni, ki omogočajo reprodukcijo in imajo hkrati vrsto metabolnih učinkov na tkiva zunaj genitalnega trakta. Pri spolno zreli ženski ima ovarij mandljevo obliko (dolžine 4 cm, širine 2 cm, debeline 1 cm). Leži v *fovei ovarii* na zadnji strani široke vezi (ligamentum laterale), na katero je pritrjen z mezoovarijem: na uterus je fiksiran z uteroovarijskim ligamentom (ligamentum ovarii proprium) in povezan s tubarnim delom ob ampuli s peritonealno gubo (ligamentum suspensorium ovarii). Površina je pokrita z enoslojnim kubičnim epitelijem in vezno ovojnico (tunica albuginea), pod katero sta dva anatomsko in funkcionalno različna dela: skorja ovarija (substantia corticalis) in sredica ovarija (substantia medullaris).

**Kortikalni del ovarija** je prežet s čvrstim vezivnim tkivom (stroma), v katerem so folikli v različnih razvojnih fazah. Folikli so v tesnem organskem in funkcionalnem stiku s stromalnimi strukturami.

**Medularni del ovarija** (cona vasculosa) je področje rahlega vezivnega tkiva z mišičnimi vlakni, žilami in živci. V medularnem delu ovarija so tudi rete ovarii, ostanki primarnih spolnih trakov (analogno rete testis), in hilusne celice, ki so funkcionalno in morfološko podobne Leydigovim celicam testisa. Včasih so prisotni še rudimentarni ostanki Wolffovih vodov. Ovarij inervira simpatično in parasimpatično živčevje. Ker se embrionalna gonada razvije v predelu toraksa, izvira simpatična inervacija ovarija iz spodnjega torakalnega predela (verjetno Th 9-11). Živčno nitje poteka prek pleksusa celiakusa in ovarijskega

pleksusa in vstopi v ovarijski hilus skupaj z žilami. Parasimpatična inervacija ovarija, ki je bolj pičla, pa je vagalnega porekla. Simpatično in parasimpatično nitje teče vzdolž foliklov v vseh stopnjah razvoja. Kontraksije gladkih mišic lahko vplivajo na sosednje kolagenske strukture in tako pomagajo pri ovulaciji folikla.

V fetalnem živčevju se formirajo primordijalni folikli, ki predstavljajo v predpubertetnem obdobju edino folikularno ovarijsko strukturo. Ob rojstvu vsebuje ovarij približno 1,200.000 foliklov, postopna atrezija pa zmanjša to število na 400.000 v puberteti (7).



Slika 3: Prerez jajčnika

### ***3.1.1. Dozorevanje ovarijskih foliklov***

Začetek ovarijskih ciklusov je povezan s povečano hipotalamično-hipofizno aktivnostjo v puberteti. V tem času se zveča tudi občutljivost primordijalnih foliklov za gonadotropine. Folikel, ki reagira na gonadotropinsko spodbudo, vsebuje oocit, ki je bolj voluminozen in ima citoplazmo bogato z nutritivnimi rezervami (aminokislina, glikogen, fosfolipidi), ter vezikularno jedro z jasno kromatinsko strukturo. Primordijalni folikel dozoreva, folikularne

celice se množe in oblikujejo plast kubičnih in poligonalnih celic – celice granulose. V perifolikularni ovojnici se oblikujeta dve plasti: na zunanji strani teka eksterna, ki je zgoščeno vezivno tkivo s koncentričnimi vlakni v več plasteh, na notranji strani pa teka interna, ki je od celic granulose ločena s tanko membrano. Teko interno tvorijo poligonalne celice z velikimi jedri in s citoplazmo, bogato z lipidi, holesterolnimi estri, fosfolipidi in askorbinsko kislino. Teka interna je bogato vaskularizirana, v njej se tvorijo estrogeni, progesteron in androgeni. V ciklusu dozoreva hkrati več foliklov, običajno pa dozori le eden, drugi preidejo v atrezijo ali cistično degeneracijo.

Selekcija med folikli se dogaja na osnovi sposobnosti posameznih foliklov za sintezo in izločanje velikih količin estradiola, ki povzroči padec FSH v zgodnji folikularni fazi. Tako zmanjšana količina FSH ni zadostna, da bi zagotovila njegovo ustrezno koncentracijo v foliklih, ki so se šele začeli razvijati. Zato tvorba estrogenov v takih foliklih nazaduje in folikli preidejo v atrezijo. Zrel ali Graffov folikel je cistična tvorba, vidna s prostim očesom, velikosti 8 do 15 mm. Sestavlja ga folikularna votlina ali antrum, ki vsebuje folikularno tekočino blede rumene barve, bogato z beljakovinami in mukopolisaharidi. Oocit ne leži sredinsko, temveč na polu folikla, obdan s celicami granulose, ki tvorijo kumulus ooforus. Primarni oocit v kumulusu vsebuje diploidno število kromosomov. Deli se redukcijsko in tako nastane oocit II. reda (sekundarni oocit), ki vsebuje haploidno število kromosomov (23). Pri tem se preostali del kromosomske mase izloči kot prvo polarno telesce. Takoj zatem nastane druga meiotična (ekvacijska) delitev; temu sledi nastanek zrele jajčne celice z izločenim polarnim telescem, ki je inkludirano do oploditve.

### ***3.1.2. Folikularna tekočina***

Folikularno tekočino sestavljajo transudat plazme in sekrecijski izločki folikla celic. V transudatu plazme so proteini, elektroliti in steroidi, ki so sintetizirani v celicah zunaj folikla (stroma). Folikularna tekočina vsebuje tudi proteine, ki kažejo lokalne inhibicijske učinke (inhibitor luteinizacije, inhibitor maturacije oocitov) in inhibicijsko snov, folikulostatin – ovarijski inhibin, ki zavira izločanje FSH. Te proteine verjetno izločajo celice granulose. Rastoči folikel sintetizira veliko količino steroidov, saj so koncentracije nekaterih 40- do 100 000-krat večje kot v periferni krvi. Glavni steroidi v folikularni tekočini so estrogeni, progesteron in androgeni (8).

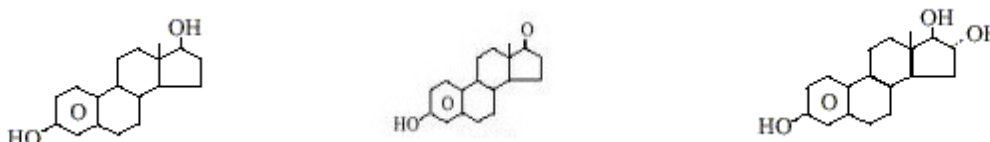
### 3.1.3. Ovarijski steroidni hormoni

Ovarij je zveza treh endokrinih tkiv: strome, foliklov in rumenega telesca. Vse tri enote imajo sposobnost sinteze in sproščanja steroidnih hormonov, ki so spojine z enotno ciklopentanoperhidrofenantrensko strukturo. Ovarijski steroidni hormoni so estrogeni, progestini in androgeni. Prekursor za biosintezo progestinov, androgenov in estrogenov je holesterol. Holesterol je prisoten v celici v citoplazmatskih lipidnih kapljicah kot esterificirani derivat.

Prva stopnja v biosintezi progestinov, androgenov in estrogenov je pregnenolon: sintetizira se v mitohondrijih iz holesterola pod vplivom encimov: 20-alfa-hidroksilaze, 22-hidroksilaze in 20, 11 desmolaze, ki razcepi stransko verigo holesterolne molekule.

#### 3.1.3.1. ESTROGENI

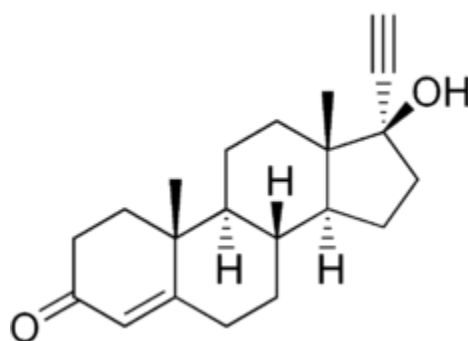
Primarni sekrecijski produkt ovarija je 17-beta-estradiol. Drugi ovarijski estrogeni so derivati androstendiona in testosterona. Konverzijo androgenov v estrogene katalizirajo encimi aromataze, ki so prisotni v granulozah in teka celicah: v ovarijski stromi teh encimov ni. Estrogeni učinkujejo na uterus tako, da stimulirajo proliferacijo in vaskularizacijo endometrija, stromalnih celic in miometrija, zvečajo občutljivost za oksitocin, zvišujejo spontano električno aktivnost uterusa, pospešujejo produkcijo cervikalne sluzi, ki je pod vplivom estrogenov alkalna in tekoča in pospešuje prodiranje spermijev. V vagini pod vplivom estrogeno proliferira in kornificira epitelji, odlaga se glikogen, ki ga nato laktobacili razgrajujejo v kisle produkte. V tubah estrogeni izzovejo proliferacijo mukoze, spodbujajo izločanje in povečajo motiliteto mišičja in cilij, kar omogoči potovanje ovuma v uterus. V dojkah spodbujajo rast laktifernih vodov. Delujejo tudi na oddaljena tkiva. Tako zavirajo izločanje lojnic, povečajo osteoblastično aktivnost, zadržujejo sol in vodo, povečajo moč mišic in kosti v puberteti, povečujejo število progesteronskih receptorjev v uterusu.



Slika 4: 17β-estradiol, estron in estradiol

### 3.1.3.2. *PROGESTINI*

Glavni progestin, ki se sintetizira v ovariju, je progesteron. Velike količine progesterona se tvorijo v rumenem telescu. Progesteron deluje v endometriju, ki je že spremenjen pod primarnim vplivom estrogenov. V endometriju spodbudi sekrecijske spremembe in pripravi uterus za sprejem zarodka, tako da zniža občutljivost uterusa za oksitocin, spontano električno aktivnost uterusa in izločanje cervikalne sluzi, ki postane manj vlečljiva in zadržuje prodiranje spermijev. V vagini spodbuja dozorevanje in proliferacijo epitelija, pH vaginalne sluzi naraste (4 do 5). V tubah se sluznica spremeni in je pripravljena za prehranjevanje oplojenega jajčeca. V dojkah pod vplivom progesterona proliferirajo lobuli in poveča se alveolno tkivo. Progesteron zviša bazalno temperaturo neposredno ali prek etioholanolona, ki deluje na termoregulacijski center v hipotalamusu. Izločanje soli in vode v urin se poveča, ker deluje kot antagonist aldosterona. Sprošča gladko mišičje uretrov in ven (povečana količina krvi v venskem obtoku) ter gladko mišičje v arteriolah (zmanjša periferni upor), kar je posebej pomembno v nosečnosti.



Slika 5: Progestin

### 3.1.3.3. *ANDROGENI*

Ovarij je pomemben izvor androgenov. V ovariju se tvorijo DHEA, androstendion, testosteron in androstandiol. Vse tri endokrine enote ovarija lahko sintetizirajo androgene. Glavno mesto produkcije androgenov pa so celice strome in teke. Biološko šibkejši androgeni (DHEA, androstendion, testosteron) se pretvarjajo v biološko močnejše androgene DHT, androstandiol v maščobnem tkivu, koži, mišičju. Ženska spolna poraščenost je odvisna od šibkih androgenov, ki jih izloča skorja nadledvične žleze. Androgeni so pomembni za libido in kot anabolni hormoni (9).

### ***3.1.4. Uravnavanje delovanja ovarijev***

Za uravnavanje delovanja ovarijev sta najpomembnejša FSH in LH, njuno ciklično sproščanje in zatem ciklično izločanje spolnih steroidov, kar se kaže v cikličnem dozorevanju foliklov in menstruacijskem ciklusu.

Pri uravnavanju ovarijske funkcije sodelujejo hipotalamus, hipofiza in ekstrahipotalamične strukture.

#### ***3.1.4.1. MENSTRUACIJSKI CIKLUS***

V normalnem menstruacijskem ciklusu uravnavajo estrogeni in **progesteron** izločanje gonadotropinov prek pozitivne in negativne povratne zveze. Menstruacijski ciklus traja povprečno 28 dni. Začetek menstruacijskega ciklusa je prvi dan krvavitve, pri 28-dnevem ciklusu ovulacija nastopi 14. dan. V zadnjih dneh menstruacijskega ciklusa je izločanje FSH in LH nizko, ker ju zavira visoka koncentracija estrogenov in **progesterona** v plazmi. Ko pride v zadnjih dveh dneh menstruacijskega ciklusa (26. do 28. dne) do lize rumenega telesca, koncentracija estrogenov in **progesterona** hitro pade, hkrati pa se dvigne koncentracija gonadotropinov, in sicer FSH bolj izrazito kot LH.

Pod vplivom FSH se začne razvoj 10 do 15 primordialnih foliklov (26. ali 27. dne ciklusa). Razvoj enega samega vodilnega folikla in propad drugih 9 do 14 je odvisen od naslednjih faktorjev: 1. v določeni fazi razvoja, ko folikel sam izloča zadostno količino estrogenov, postane neodvisen od gonadotropinske stimulacije, 2. zvišana koncentracija estrogena iz tako razvitega folikla zavre prek negativne povratne zveze sproščanje FSH, zato drugi, manj zreli folikli, ki so še odvisni od spodbujanja z gonadotropini, propadejo. Tako se razvije en sam zrel Graafov folikel. V tem času počasi narašča tudi izločanje LH. Estrogen (v glavnem 17-beta-estradiol) se tvori v razvijajočem se foliklu v celicah teke in granulose. V najbolj zgodnji fazi razvoja folikla odgovorijo celice teke, ki imajo receptorje za LH, na zelo nizke koncentracije LH v plazmi in tvorijo androgene – predvsem androstendion. Androgeni se aromatizirajo v strogene v celicah granulose. V tem zgodnjem obdobju razvoja folikla so celice granulose odvisne od FSH. Celice granulose imajo namreč v tem obdobju številne receptorje za FSH in samo malo receptorjev za LH. Proces aromatizacije androgenov v estrogene se tudi sam vzdržuje, ker estrogeni skupno s FSH potencirajo

aromatizacije v celicah granulose. Tako pride pod vplivom FSH in estrogenov do hitre proliferacije celice granulose, še večje sinteze estrogenov in do zvišanja koncentracije estrogenov v krvi. Ta proces tvorbe estrogenov v enoti celic teke in granulose narašča do 12. dneva ciklusa, ko količina estrogenov v krvi doseže preovulacijski vrh. Ves ta čas počasi narašča tudi koncentracija LH v krvi. Od 8. dne ciklusa se število FSH receptorjev na celicah granulose manjša in celice granulose postanejo neobčutljive za FSH. Sočasno pa se poveča število receptorjev LH na celicah granulose in doseže maksimum v času ovulacije, ki sledi dvigu LH v 13. dnevu ciklusa. Časovna opredelitev odločilnega dviga LH je odvisna od signala, ki ga odda ovarij. Neposredno pred ovulacijo namreč LH spodbuja celice granulose in celice teke vodilnega folikla, da izločijo **progesteron**. Koncentracija **progesterona** v krvi se malenkostno dvigne, kar je dovolj, da ob visoki koncentraciji estrogenov v krvi spodbudi enkratno sprostitvev LH-RH, čemur sledi ovulacijski vrh LH in FSH.

Visoke koncentracije LH in viške koncentracije FSH so v krvi prisotne samo nekaj ur, kar vendarle zadošča, da se sklene dozorevanje vodilnega folikla in pride do ovulacije v 6 do 18 urah. Po ovulaciji pride do luteinizacije celic teke in granulose. Luteinizacija je možna, ker odpadejo lokalni inhibicijski faktorji, ki so bili prisotni v folikularni tekočini pred ovulacijo, in zaradi delovanja LH na te celice. Pod vplivom LH luteinizirane celice v rumenen telescu tvorijo estrogene, **progesteron** in prostaglandin F<sub>2</sub>. Visoke koncentracije estrogenov in **progesterona** zavirajo sintezo in sproščanje gonadotropinov (14. do 20. dan ciklusa). Rumeno telesce je popolnoma zrelo 21. dan ciklusa in nato vztraja do 26. dne ciklusa, ko se začne luteoliza. Če je prišlo do oploditve, hCG prepreči luteolizo (10).

## **4. ENDOKRINE BOLEZNI**

Endokrine bolezni ali bolezni endokrinih žlez lahko široko razdelimo na bolezni zmanjšane ali povečane produkcije hormonov in pa bolezni, povezane z razvojem masnih lezij.

### **4.1. Bolezni ovarijske**

Nezadostno delovanje ovarijske je lahko posledica odsotnosti strukturnih ali funkcionalnih elementov ali pa gre za nezadostno ali nepravilno stimulacijo.

Turnerjev sindrom je najpogostejša oblika gonadne disgeneze. Zanj je značilen kariotip 45,X. Bolnice imajo že v mladosti zaostalo rast, pogosto so tudi duševno prizadete.

Sindrom policističnih ovarijske zajema oligomenorejo, debelost, čezmerno poraščenost, neplodnost in obojestransko povečane, policistične jajčnike.

Hirsutizem opredelimo kot čezmerno poraščenost žensk na mestih, kjer so običajno poraščeni moški. Ta, za androgene občutljiva področja so lasni folikli na obrazu, trebuhu, prsih in še na nekaterih delih telesa (11, 12, 13).



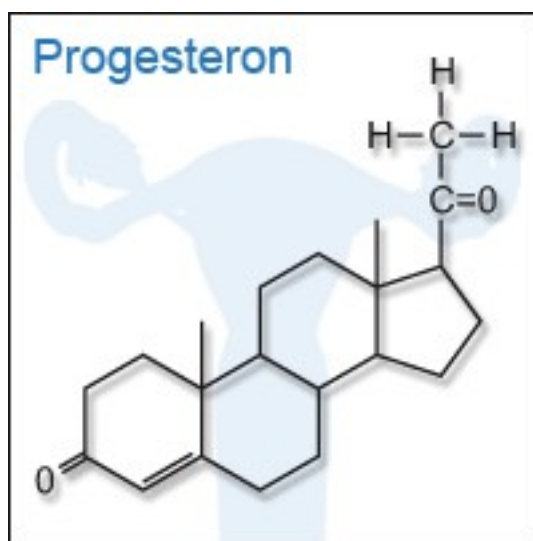
## 5. PROGESTINI

Progestini ali progestin hormoni so vsi hormoni in drugi dejavniki, ki pomagajo pri poteku in vzdrževanju nosečnosti. Glavni progestin v človeškem telesu je **PROGESTERON**, ki je bil prvič izoliran leta 1934.

### 5.1. Progesteron

FORMULA:  $C_{21}H_{30}O_2$

MOLEKULSKA MASA: 314,46



Slika 6: Progesteron

Najpomembnejši progestin je progesteron. Progesteron nastane iz holesterola, je steroidni hormon, ki se nahaja tako pri ženskah kot tudi moških. Pri ženski, ki ni noseča, progesteron izloča rumeno telesce, in sicer v velikih količinah v drugi polovici ovarijskega cikla. V prvi polovici ovarijskega cikla ga izločajo jajčniki in skorja nadledvične žleze. V času nosečnosti ga izloča posteljica. Pri ženskah v rodni dobi je primarna dejavnost progesterona priprava in vzdrževanje endometrija za implantacijo oplojenih jajčec.

Progesteron in njegov metabolit  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron sta naravna progestina.  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron je neaktiven. Progesteron je znan tudi kot P4 (pregn-4-en-3,20-dion), je steroidni hormon, ki sodeluje pri menstrualnem ciklusu, podpira nosečnost. Spada v skupino hormonov in je glavni naravni človeški progestogen. Tako kot drugi steroidi je

progesteron sestavljen iz štirih med seboj povezanih cikličnih ogljikovodikov. Progesteron vsebuje ketonsko in kisikovo funkcionalno skupino in dve metilni skupini. Je hidrofoben.

Progesteron se sintetizira v vseh steroidnih tkivih (jajčniki, testisi, nadledvična žleza, korteks, posteljica) iz holesterola. Progesteron izločajo luteinske celice v lutealni fazi pod nadzorom LH. Ustrezna sekrecija progesterona v lutealni fazi zahteva predhodna dejanja v folikularni fazi FSH-ja in estrogena na proliferacijo in indukcijo LH receptorjev v celicah granulose. V posteljici se progesteron sintetizira iz holesterola, pridobljenega od matere v 6. do 7. tednu nosečnosti, da vzdržuje nosečnost.

Progesteron se v veliki meri veže na beljakovine v serumu (>90%). Razpolovna doba progesterona je zelo kratka (~ 5 min). Presnova in inaktivacija progesterona poteka v jetrih, njegovi presnovki se izločijo z urinom.

Progesteron ima še druge učinke, je močan spodbujevalec dihalnega trakta. Progesteron ima termogenetični učinek, tako telesna temperatura naraste za približno 0,5° C ob ovulaciji in traja do konca ciklusa.

## **5.2. Mehanizem delovanja**

Glavni mehanizem delovanja je genomski. Zaradi svoje lipofilne narave ima progesteron dostop do vseh celic. Njegovi učinki so posredovani na ciljne celice, to so celice, ki imajo receptor za progesteron. Glavna vloga progesterona je priprava maternice, da podpira in vzdržuje nosečnost. Ima pa učinke na centralni živčni sistem in presnovo. V mnogih sistemih progesteron nasprotuje proliferativnemu učinku estrogena.

Progesteron je v bistvu steroid, ki se v jajčniku večinoma sintetizira iz holesterola v kri ter v manjši meri iz acetyl-koencima A. Potem se te molekule vežejo v steroid. Progesteron se v krvi veže na albumin, majhne količine pa se specifično vežejo na globuline. Skoraj ves progesteron se razgradi v jetrih v druge steroide, ki nimajo progesteronskega učinka. Glavni končni produkt razgradnje progesterona je pregnandiol. Okrog 10 % izvirnega progesterona se izloča v takšni obliki z urinom.

V obliki, kot se nahaja v organizmu, progesteron predstavlja največji procent progestagena. Najpomembnejša sta izomera alfa in beta 20-hidroksiprogesteron.

### 5.3. Biosinteza

Progesteron je, tako kot ostali steroidni hormoni, sintetiziran iz pregnenolona, ki izhaja iz holesterola.

Holesterol sledi naslednjim spremembam:

- 1.) na holesterolu najprej poteka **dvojna oksidacija** in nastane 20,22-dihidroksiholesterol,
- 2.) nato dodatna **oksidacija** omogoči, da pride do izgube stranske verige s pomočjo citokroma P450<sub>scc</sub> in nastane pregnenolon,
- 3.) pretvorba pregnenolona v progesteron poteka v dveh korakih, in sicer prvič se **3-hidroksilna skupina oksidira do keto skupine**, in drugič pride do **premika dvojne vezi od 5-6 na 4-5**.

Tako se sinteza progesterona konča.

### 5.4. Učinki progesterona

Najpomembnejša funkcija progesterona je vpliv na sekrecijske spremembe v endometriju. Progesteron vpliva tudi na sekrecijske spremembe v sluznici jajcevoda. Progesteron pomaga pri pripravi maternične sluznice (endometrija) tako, da prejme jajčece, če postane oplojeno s spermo. Če jajčece ni oplojeno, pade raven progesterona, kar vodi v menstrualno krvavitev. Sekret iz sekrecijskih sprememb v sluznici jajcevoda pa je pomemben za prehrano oplojenega jajčeca, ki se deli pri prehodu skozi jajcevod, preden se ugnezdi. Progesteron vpliva na razvoj režnjičev in alveolov dojke. Dojke se povečujejo zaradi tvorbe sekreta v alveolih in režnjičih ter zaradi povečanega zadrževanja tekočine v podkožnem tkivu. Progesteron v zelo veliki količini povečuje reabsorpcijo natrija, klora in vode iz distalnih ledvičnih tubulov. Vzrok je v kompeticiji med progesteronom in aldosteronom. Progesteron ima majhen katabolni učinek na beljakovine, podobno kot je učinek glukokortikoidov.

S ciklično tvorbo progesterona v jajčnikih je povezan endometrijski cikel, ki poteka v naslednjih stopnjah:

- proliferacija endometrija,
- sekrecijske spremembe endometrija,
- luščenje endometrija, ki se imenuje menstruacija.

Progesteron je prav tako bistven za normalno in uspešno nosečnost. V začetku nosečnosti rumeno telo izloča progesteron, vendar v veliko manjših količinah, kot ga pozneje izloča placenta. Bistveni vplivi progesterona na normalno nosečnost so:

- povzroči razvoj decidualnih celic v endometriju, ki so pomembne za prehranjevanje embrija,
- zmanjša kontraktilnost maternice nosečnice in prepreči, da bi maternični krči vodili v spontani splav,
- prispeva k razvoju konceptusa pred vsaditvijo,
- progesteron, ki se izloča z nosečnostjo, pomaga estrogenu pripraviti prsi za dojenje.

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.

Progesteron stimulira respiratorni center in lahko olajša bolečine. Povečuje izločanje vode in soli, lahko pa tudi zadržuje sol in vodo. Progesteron ima tudi blag katabolični (razgradni) učinek na beljakovine v telesu (14).

Pri moških se v kri dnevno izloči od 0,5 do 0,75 mg progesterona. Pri ženskah se ga izloči 10 do 15 krat več, odvisno od tega, ali je začetek, sredina ali konec folikularne faze. 50 do 100 krat več se ga izloči v sredini lutealne faze menstruacijskega ciklusa (30-40 mg v 24 urah iz celic rumenega telesca). 60 mg v 24 urah pa se ga izloči iz placente v drugi polovici nosečnosti.

Pri deklicah do pubertete oziroma do nastanka prvega rumenega telesca je progesteron v neznatnih koncentracijah, prav tako pri menopavzi.

Pri ženskah po menopavzi pride do znatnega zmanjšanja izločanja progesterona. Ker je progesteron povezan tudi s spolnostjo, lahko pride do zmanjšanja spolnega delovanja, torej do manj spolnih želja. Manj progesterona najdemo tudi v razvitih državah, kjer je velika prisotnost stresa in tesnobe. Progesteron pri moških še ni popolnoma raziskan (15).

### **5.5. Določanje progesterona**

Hormon progesteron določamo za ugotavljanje vzrokov neplodnosti, da bi sledili ovulaciji, pri ugotavljanju zunajmaternične nosečnosti, pri spremljanju normalne nosečnosti in pri ugotavljanju vzroka za nenormalno krvavitev iz maternice.

Raven progesterona se spreminja glede na menstrualni cikel, torej lahko naredimo več (serijskih) meritev, s pomočjo katerih prepoznavamo in odpravljamo nekatere vzroke neplodnosti. S progesteronom je mogoče meriti, ali ima ženska ovulacijo, kdaj bo prišlo do ovulacije in za spremljanje uspešnosti sprožitve ovulacije.

V zgodnji nosečnosti je potrebno meritev progesterona uporabljati skupaj z humanim horionskim gonadotropnim hormonom (hCG).

### **5.6. Učinki progesterona ob porodu**

Progesteron inhibira sposobnost krčenja maternice med nosečnostjo tako, da preprečuje iztis fetusa. Estrogeni nasprotno povečajo stopnjo sposobnosti krčenja, delno zato, ker ti hormoni povečujejo število presledkovnih stikov med celicami maternične mišice, in delno zaradi nejasnih dejavnikov. Progesteron se velik del časa nosečnosti izloča progresivno v večjih količinah, vendar od sedmega meseca naprej izločanje estrogena še naprej narašča, medtem ko izločanje progesterona ostaja konstantno ali pa celo malo upade.

### **5.7. Laktacija**

Progesteron povzroča skupaj z drugimi hormoni, posebej z estrogenom, dodaten razvoj lobulov. Zaradi tega delovanja rastejo tudi alveolarna tkiva in njihove celice pridobijo sposobno sekrecijo mleka. Progesteron in estrogen inhibirata sekrecijo mleka. (16)

## 5.8. Merjenje progesterona

Testi določanja progesterona se izvajajo v kliničnem okolju, večinoma v serumu, lahko pa tudi v slini.

Normalna raven progesterona se razlikuje glede na to, v katerem obdobju cikla se opravi meritev. Raven progesterona v krvi začne naraščati na sredini menstrualnega cikla, naprej narašča 6 do 10 dni, če ne pride do oploditve, začne padati. Raven progesterona narašča, če je prišlo do oploditve.

**Tabela II: Referentne vrednosti za progesteron**

MOŠKI	0,7 – 4,3 $\mu\text{mol/L}$
ŽENSKE V FOLIKULARNI FAZI	0,6 – 4,7 $\mu\text{mol/L}$
ŽENSKE V LUTEALNI FAZI	5,3 – 86 $\mu\text{mol/L}$
ŽENSKE V MENOPAVZI	0,3 – 2,5 $\mu\text{mol/L}$
1. TRIMESTER NOSEČNOSTI	23 – 137 $\mu\text{mol/L}$
2. TRIMESTER NOSEČNOSTI	67 – 343 $\mu\text{mol/L}$
3. TRIMESTER NOSEČNOSTI	170 – 933 $\mu\text{mol/L}$

Vzroki povišane koncentracije progesterona so lahko:

- nekatere ciste na jajčnikih,
- molarna nosečnost (fetalna smrt),
- redka oblika raka na jajčnikih,
- preveliko izločanje progesterona iz nadledvične žleze,
- prirojena hiperplazija nadledvične žleze,
- nosečnost.

Vzroki znižane koncentracije progesterona so lahko:

- zmanjšana funkcija jajčnikov,
- pomanjkanje menstruacije (amenoreja),
- insuficienca rumenega telesca,
- membranozne dismenoreje (17).

## 6. TESTIRANJE OB PACIENTU (Point of care testing - POCT)

Napredek v razvoju tehnologije mikrotehnik in njegova uporaba v prenosnih aparatih sta omogočila, da se je laboratorijsko testiranje preselilo bliže k bolniku. Analiza ob bolniku, imenovana POCT, poznana tudi kot analiza ob postelji, je bila uvedena z namenom, da hitreje dobimo rezultat analize krvnega vzorca, kot bi ga dobili iz laboratorija. Hitri laboratorijski test je zato definiran kot analiza, ki je opravljena zunaj laboratorija, običajno v bližini preiskovanca ali kar ob preiskovancu, rezultat testa pa lahko vodi do sprememb v zdravstveni oskrbi bolnika. Tako je leta 2005 mednarodna organizacija za standardizacijo ISO definirala teste ob preiskovancu.

Prednost je predvsem **hitrejše pridobivanje rezultatov** v primerjavi s centralnim laboratorijem, kar olajša odločanje in **omogoča takojšen začetek zdravljenja**. Širjenje POCT sistemov sta omogočila avtomatizacija instrumentov ter razvoj mikročipov in elektrod za merjenje ustreznih analitov. Dodatno so olajšali delo s POCT sistemi vgrajeni računalniki, stabilni reagenti v ustrezni obliki in v embalaži za enkratno uporabo.

Kot vsaka laboratorijska preiskava imajo tudi testi POCT svoje prednosti, pomanjkljivosti in omejitve.

Neprecenljiva prednost teh testov pred klasičnimi laboratorijskimi je v tem, da je za analizo potrebna majhna količina diagnostičnega vzorca in je rezultat hitro dostopen. Diagnostičnega vzorca ni potrebno prinesiti v laboratorij, zato so zmanjšani vplivi pred analizo, kar je pomembno predvsem pri nestabilnih analitih.

Glavne zaželene lastnosti za POCT instrument so:

- hitri rezultati,
- možnost prenosa instrumenta z reagentnimi kartušami za enkratno uporabo,
- možnost direktne analize vzorca polne krvi ali plazme,
- enostavni delovni postopki, ki ne zahtevajo laboratorijsko izurjenega osebja,
- prilagodljiv seznam operacij testa,
- kvantitativni rezultati z zadostno točnostjo in natančnostjo (v primerjavi s centralnim laboratorijem),
- vgrajena kalibracija in kontrola kakovosti,
- možnost shranjevanja reagentov pri sobni temperaturi,

- možnost shranjevanje na trdi disk in možnost prenašanja podatkov,
- nizka cena instrumenta in servis z izmenjavo delov.

Potreba po hitrih analitičnih rezultatih pri obravnavi kritično bolnih je velika. Hitra analiza in poročanje rezultatov zmanjša hospitalizacijo in laboratorijske stroške.

## **6.1. Prednosti testiranja ob pacientu**

Testiranje ob pacientu postaja vse bolj priljubljena oblika testiranja, saj ponuja kar nekaj prednosti pred klasičnimi laboratorijskimi analizami. Te prednosti so:

- prenosljivost,
- hitri rezultati,
- majhni volumni vzorca,
- vzorce ni potrebno predhodno predelati,
- enostavnost uporabe.

Testiranje se izvede navadno na majhnih, prenosnih ročnih napravah, ki jih z lahkoto prenašamo z oddelka na druge lokacije. Za razliko od klasičnega testiranja se lahko POCT izvaja v bolnišnicah (npr. ob pacientovi postelji, v pacientovi kopalnici ...), zdravstvenih domovih, tudi doma pri pacientu.

Čas analize pri POCT je kratek - do nekaj minut, kar dovoljuje izdajo rezultatov, ko je pacient še na pregledu. To zmanjša čas potreben za postavitve diagnoze in izvajanje ustrezne terapije. Kadar je usmerjanje pacienta odvisno od laboratorijskih izvidov, lahko laboratorijsko testiranje predstavlja ozko grlo. Podaljšajo se čakalni časi in poslabšajo se izvidi zdravljenja. Skrajša se tudi čas, ki ga zdravnik porabi za diagnozo.

Majhni volumni vzorca so še posebej dobrodošli pri pacientih s problemi strjevanja krvi, novorojenčkih in drugih bolnikih, pri katerih bi bil odvzem standardnih volumnov problematičen. POCT ponavadi deluje na nespremenjenih vzorcih, kar zmanjša količino potrebnega vzorca in čas do analize.

Naprave, na katerih se izvajajo testi ob preiskovancu, so enostavne za uporabo. Kar pomeni, da lahko teste izvaja nelaboratorijsko osebje, teste lahko izvajajo tudi sami preiskovanci, doma. Veliko takšnih naprav vsebuje posebna varovala, ki preprečujejo izdajanje rezultata, če je med postopkom prišlo do kakršne koli napake.



S priročnimi inštrumenti lahko ob preiskovancu določijo: glukozo, hemoglobin, nekatera zdravila, PCR, holesterol, označevalce za obolenje srca, koagulacijske teste, osnovne analize urina ...

## **6.2. Slabosti testiranja ob pacientu**

Pomanjkljiva stran testov POCT so slaba ponovljivost, pravilnost in linearnost ter velika neenotnost med analiznimi postopki, slaba zanesljivost rezultata, problem osebjem, neprimerna in prepogosta uporaba, neskladnost s predpisi in cena.

Upravljanje kakovosti POCT predstavlja izziv zaradi številnih naprav in načinov izvedbe testiranja. Večja ko je priljubljenost takih naprav, bolj problematična postaja kakovost rezultatov.

Problem predstavljajo zavajajoči podatki. Razlike v populaciji pacientov pogosto vodijo do razlik med rezultati POCT in rezultati klasičnega testiranja. Nekateri metaboliti, zdravila, endogene snovi in drugi faktorji lahko vplivajo na rezultate. Razumeti moramo tudi razlike v koncentracijah analitov v polni krvi in serumu oziroma plazmi. V situacijah, ko se rezultati klasičnega testiranja ne ujemajo s rezultati POCT, osebje velikokrat ne ve, kateremu rezultatu zaupati. Lahko se ponovi ali en test ali oba. V tem primeru POCT ne predstavlja pridobitve, ampak še dodatno podaljša čas in poveča ceno testiranja.

Z uporabo POCT testiranja se je analiza krvnega vzorca prenesla v roke ljudem, ki nimajo ustreznih znanj in izkušenj v laboratorijski analitiki. Zato teste ob preiskovancu uvrščamo med dopolnilne teste in ne med teste, ki bi zamenjali analizo vzorca v kliničnem laboratoriju.

Pomembno pri uvajanju POCT je ustrezno izobraževanje osebjem, ki bo izvajalo analizo. Samo z ustreznim programom zagotavljanja kakovosti, ki vključuje standardne operacijske postopke, kontrolo kakovosti in laboratorijski nadzor (zunanja ocena kakovosti) lahko zagotovimo ustrezne in zanesljive rezultate. Zaradi zahtev po pravilnem rezultatu in zaradi potencialnih posledic nepravilnega rezultata je zelo pomembno, da se zanesljivost rezultatov prenese iz kliničnih laboratorijev na teste POCT.

Testi POCT imajo tudi določene omejitve, na katere mora opozoriti proizvajalec inštrumentov, uporabnik pa jih mora upoštevati pri analizi. Izvajalec mora vedeti, kako lahko nekateri metaboliti, zdravila, endogene snovi in drugi fiziološki faktorji vplivajo na

rezultat. V laboratoriju najpogosteje analiziramo krvni vzorec, ki je bil odvzet na tešče, s testi POCT pa se lahko analizira kaplja krvi kadarkoli; to mora izvajalec upoštevati pri interpretaciji rezultatov.

Namen vsakega analiznega postopka, ne glede na to, kje se izvaja in kdo z njim upravlja, je, da dobimo prave rezultate. Laboratorijsko testiranje ob preiskovancu postaja pomembno dopnilo pri postavljanju diagnoze in izbiri ustrezne terapije. Vendar testi POCT še ne morejo v vseh primerih zamenjati tradicionalne laboratorijske analize (18, 19, 20).

## **7. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV**

Zaradi zelo majhnih koncentracij hormonov v serumu, plazmi, seču in slini, ki se gibljejo od mikromolarnih pa do pikomolarnih, potrebujemo tudi zelo občutljive laboratorijske tehnike. Rutinske metode, ki so se razvile na tem področju, temeljijo na reakciji antigena in protitelesa.

### **7.1. Radioimunske tehnike**

Radioimunski test (radioimmunoassay – RIA) je eden najbolj vsestranskih in najbolj občutljivih testov za merjenje antigenov in haptenov. Pri tem testu uporabljamo radioaktivno zaznamovane (navadno z  $^{125}\text{J}$ ) antigene, protitelesa ali haptene. RIA v tekoči fazi temelji na tekmovanju med zaznamovanim in nezaznamovanim antigenom za omejeno količino močno afinitetnih protiteles.

### **7.2. Encimskoimunske tehnike (eia)**

Osnova encimskoimunskih tehnik je pritrditev različnih encimov na protitelesa ali antigene tako, da se reaktivnost encimov in protiteles ne spremeni. Rezultate ugotovimo s prostim očesom ali s spektrofotometrom.

### **7.3. Imunofluorescenčne tehnike**

Imunofluorescenca je izredno občutljiva tehnika za opredeljevanje s protitelesi vezanih molekul v celicah in tkivih. Primarno sodijo tehnike imunofluorescence med histokemijske in citokemijske tehnike za določanje antigenov in njihove lokacije v celicah in tkivih. Fluorescenca je sposobnost snovi, da absorbira svetlobo ene in oddaja svetlobo druge valovne dolžine.

### **7.4. Kromatografija (HPLC)**

Kromatografske tehnike temeljijo na različni porazdelitvi sestavin zmesi med dvema fazama. Do ločevanja pride zaradi majhnih razlik med lastnostmi sestavin v zmesi. HPLC je ena izmed najbolj uporabljanih analiznih tehnik, ki temelji na ločevanju in detekciji komponent v tekoči fazi (21).

## **NAMEN DELA**

Namen diplomske naloge je primerjati rezultate koncentracij progesterona v polni krvi in v plazmi. Na analizatorju Pathfast bomo določali koncentracijo progesterona v polni krvi in v plazmi in izračunali ujemanje obeh metod. Poleg tega bomo izračunali še ponovljivost v seriji in izven serije, linearnost in pridobitev dodatka. Dobljene rezultate bomo statistično ovrednotili in podali priporočilo glede tega, ali je določitev v polni krvi uporabnejša od klasične določitve v plazmi.

# METODE IN MATERIALI

## 1. DEFINICIJA SKUPINE

Preiskovana skupina je zajemala 67 naključno izbranih oseb, ki smo jim izmerili količino progesterona v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi.

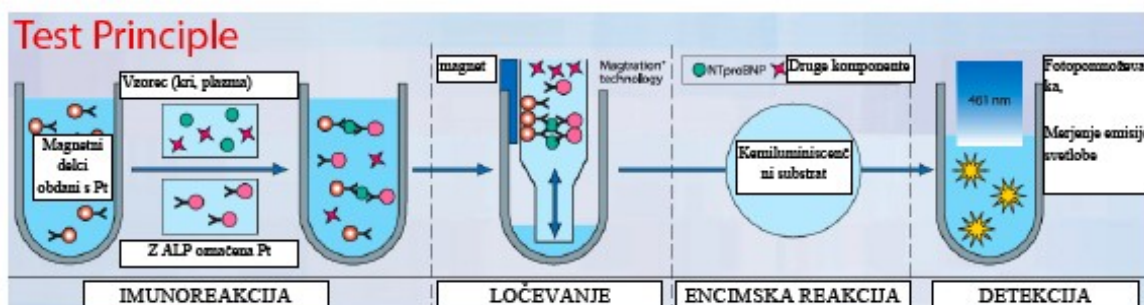
## 2. METODA IN ANALIZATOR



Slika 7: Analizator Pathfast

### 2.1. Princip analizatorja Pathfast

Je avtomatski imunološki analizator, ki združuje postopno kemiluminiscenčno tehnologijo s patentirano tehnologijo „Magrations“. Majhne koncentracije analita analizira z visoko točnostjo in natančnostjo. Analizator zagotavlja optimalno občutljivost. Vzorci, ki jih analizira, so lahko polna kri, plazma ali serum, ki jih samodejno identificira in obdeluje.



Slika 8: Princip testa

Instrument izkorišča t. i. Magtration tehnologijo za ločevanje vezane in nevezane frakcije med posameznimi koraki analize. Pri tem se vzorcu dodajajo magnetni delci prevlečeni s protitelesi. Protitelesa se vežejo s ALP in tvori se „sendvič“ imunokompleks, tako z encimsko označenimi protitelesi, kot z magnetnimi delci prevlečenimi s protitelesi. Po odstranitvi nevezanih protiteles označenih z encimom se imuno kompleksu doda kemiluminiscenčni substrat. Po kratki inkubaciji instrument izmeri luminiscenco encimske reakcije. Intenziteta izmerjene luminiscence je povezana s koncentracijo analita, ki ga določamo (progestgerona).

## **2.2. Uporaba analizatorja Pathfast**

Analizator Pathfast je kompaktne oblike in majhne teže, zaradi česar je idealen sistem za analizo v laboratorijih, bolnišnicah. Uporaben je zaradi določanja hitrih kvantitativnih rezultatov na samem mestu oskrbe. Zagotavlja hitro, diferencialno diagnozo in je enostaven za uporabo. Zaradi izjemne natančnosti je ta analizator zelo ustrezen v kardiologiji, intenzivni negi in urgenci. Omogoča pregled šestih vzorcev v samo nekaj minutah, mrežje pa omogoča neposreden prenos podatkov v centralni laboratorij in dostop do rezultatov iz katerega koli računalnika.

## **2.3. Prednosti analizatorja Pathfast**

Njegove prednosti so:

- omogoča laboratorijsko testiranje ob preiskovancu (POCT),
- za vzorec se lahko uporablja polna kri, kar prihrani čas pridobitve rezultatov, saj vzorca ni potrebno centrifugirati,
- kvantitativno merjenje šestih vzorcev vzporedno.

## **2.4. Delovanje analizatorja Pathfast**

Delo z analizatorjem je zelo enostavno, poteka v treh korakih:

1. Vzorec in reagente vstavimo v kartuše,
2. vložek s kartušami vstavimo v analizator,
3. pritisnemo gumb za zagon analizatorja.

Ima šest vzporednih kanalov, kar omogoča šest kvantitativnih analiz hkrati. Do rezultatov pridemo zelo hitro, že po 17 minutah za določanje enega analita ali po 26 minutah za šest analitov. Ravnanje z analizatorjem je zelo enostavno. V analizator vložimo 6 vzorcev in 6 reagentov hkrati. Vsi testi so združljivi in se lahko delajo hkrati. Vsak reagentni vložek je opredeljen z reagentno črtno kodo. Analizator deluje avtomatsko, zato laboratorijsko osebje ne potrebuje posebne sposobnosti ali potrdila za delo z analizatorjem.



Slika 9: Notranjost analizatorja Pathfast

## 2.5. Tehnične specifikacije analizatorja Pathfast

- za testiranje potrebujemo **100 µl vzorca** (polna kri, plazma, serum),
- princip meritve: analiza poteka s pomočjo encima, kemiluminiscenčne tehnologije in Magtration® tehnologije,
- temperatura meritve: **37,5 °C**,
- valovna dolžina: **300 – 650 nm**,
- zmožnost: analizira do **6 vzorcev**

Z njim določamo:

- srčne markerje: CTN I, mioglobin, CK-MB, hs-CRP,
- hormone: β-HCG, estradiol, LH, progesteron,
- koagulacijo, D-dimer.

Analizator Pathfast ® določa koncentracijo HCG, LH, estradiola, progesterona, FSH in prolaktina iz enega samega vzorca bolnika, bodisi iz polne krvi, seruma ali plazme. Vzoredna analiza zagotovi rezultate v nekaj minutah, kar omogoči hitro terapevtsko odločitev.

## **2.6. Določanje progesterona z analizatorjem Pathfast**

Je in vitro diagnostični test, kjer merimo progesteron v polni krvi, plazmi in serumu.

Po priporočilih proizvajalca so:

- meja določljivosti je **0,2 – 40 µg/L**
- koeficient variacije v serumu v odstotkih za progesteron: **za nizke vrednosti koncentracije progesterona je 8,6 %, za srednje vrednosti koncentracije progesterona je 6,1 % in za visoke vrednosti progesterona je 7,2 %**
- Korelacija:  **$y = 0,981x + 0,321$ , Pearsonov korelacijski koeficinet = 0,989, število vzorcev = 73 (23, 24, 25).**



## REZULTATI

### 1. KONCENTRACIJA PROGESTERONA V PLAZMI IN POLNI KRVI

Tabela III: Koncentracija progesterona, izmerjena na analizatorju Pathfast v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi.

1. PATHFAST – progesteron (µg/L)		
zap. številka vzorca	heparizirana plazma	heparizirana polna kri
1	3.22	3.03
2	8.9	8.29
3	16.5	15.1
4	23.8	22.3
5	30.8	30.8
6	36.8	37.9
7	5.44	5.82
8	3.79	4.14
9	28.7	28.9
10	19.8	19.3
11	12.2	12.2
12	7.05	7.53
13	0.94	0.96
14	6.71	7.12
15	12.6	12
16	22	23
17	34	33.5
18	37.1	34
19	3.29	3.4
20	1.51	1.65
21	0.873	0.986
22	5.83	6.51
23	9.73	10.5
24	19.6	19.8
25	26.3	28.8
26	27.6	28.8

27	2.88	2.86
28	1.84	1.98
29	23.1	22.3
30	14.4	13.8
31	8.26	9.26
32	4.31	4.47
33	0.77	0.91
34	5.72	5.82
35	10.9	10.8
36	18.4	17.8
37	30.9	31.8
38	30.6	29.9
39	3.16	3.17
40	1.47	1.71
41	1.36	1.24
42	6.12	6.37
43	10.2	10.7
44	17	19.3
45	23.8	23
46	23.8	24
47	3.87	3.92
48	1.84	2.12
49	20	21.8
50	12.6	14.9
51	8.45	8.96
52	4.55	5.09
53	21.9	21.8
54	15.9	14.6
55	8.95	9.17
56	4.93	5.05
57	20	18.4
58	13.8	14
59	7.64	7.5
60	4.14	4.47
61	0.718	0.624
62	0.829	0.702
63	0.510	0.445

64	0.805	0.781
65	0.522	0.461
66	25.2	24.2
67	29	29.5

### Izračuni:

Naredili smo seštevek statističnih spremenljivk oziroma znakov. Najprej smo izračunali vsoto vseh spremenljivk, ki smo jih upoštevali pri opazovanju za plazmo, nato še za polno kri.

$$\Sigma_{\text{plazma}} = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_{67},$$

$$\Sigma_{\text{plazma}} = 3,22 + 8,90 + 16,5 + \dots + 29,0 = \mathbf{850,224}; \text{ vsota vseh meritev v plazmi}$$

$$\Sigma_{\text{polna kri}} = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_{67}$$

$$\Sigma_{\text{polna kri}} = 3,03 + 8,29 + 15,1 + \dots + 29,5 = \mathbf{856,014}; \text{ vsota vseh meritev v polni krvi}$$

.....

Iz vsote statističnih spremenljivk za polno kri in plazmo izračunamo povprečno vrednost. Povprečna vrednost je najpomembnejši statistični parameter. Povprečna vrednost je definirana kot kvocient med vsoto vseh meritev in številom meritev.

$$X_{\text{plazma}} = \Sigma_{\text{plazma}} / n$$

$$X_{\text{plazma}} = 850,225 / 67 = \mathbf{12,69}; \text{ povprečna vrednost meritev v plazmi}$$

$$X_{\text{polna kri}} = 856,014 / 67 = \mathbf{12,78}; \text{ povprečna vrednost meritev v polni krvi}$$

.....

Standardna deviacija ali odklon je statistični kazalec, največkrat uporabljen za merjenje statistične razpršenosti enot. Z njim je moč izmeriti, kako razpršene so vrednosti. Standardni odklon je definiran kot kvadratni koren variance.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$X_{\text{polna kri}} = \Sigma_{\text{polna kri}} / n$$

$S_{\text{plazma}} = 10,61$  ; standardna deviacija za plazmo

$S_{\text{polna kri}} = 10,56$  ; standardna deviacija za polno kri

.....

Koeficient variacije je statistični kazalec, ki prikazuje razpršitev statističnih enot okoli aritmetične sredine njihove statistične populacije. Definiran je kot razmerje med standardnim odklonom in aritmetično sredino.

$$KV\% = S / X * 100$$

$KV\%_{\text{plazma}} = 10,61 / 12,69 * 100 = 83,65 \%$  ; koeficient variiranja za plazmo

$KV\%_{\text{polna kri}} = 10,56 / 12,78 * 100 = 82,55 \%$  ; koeficient variiranja za polno kri

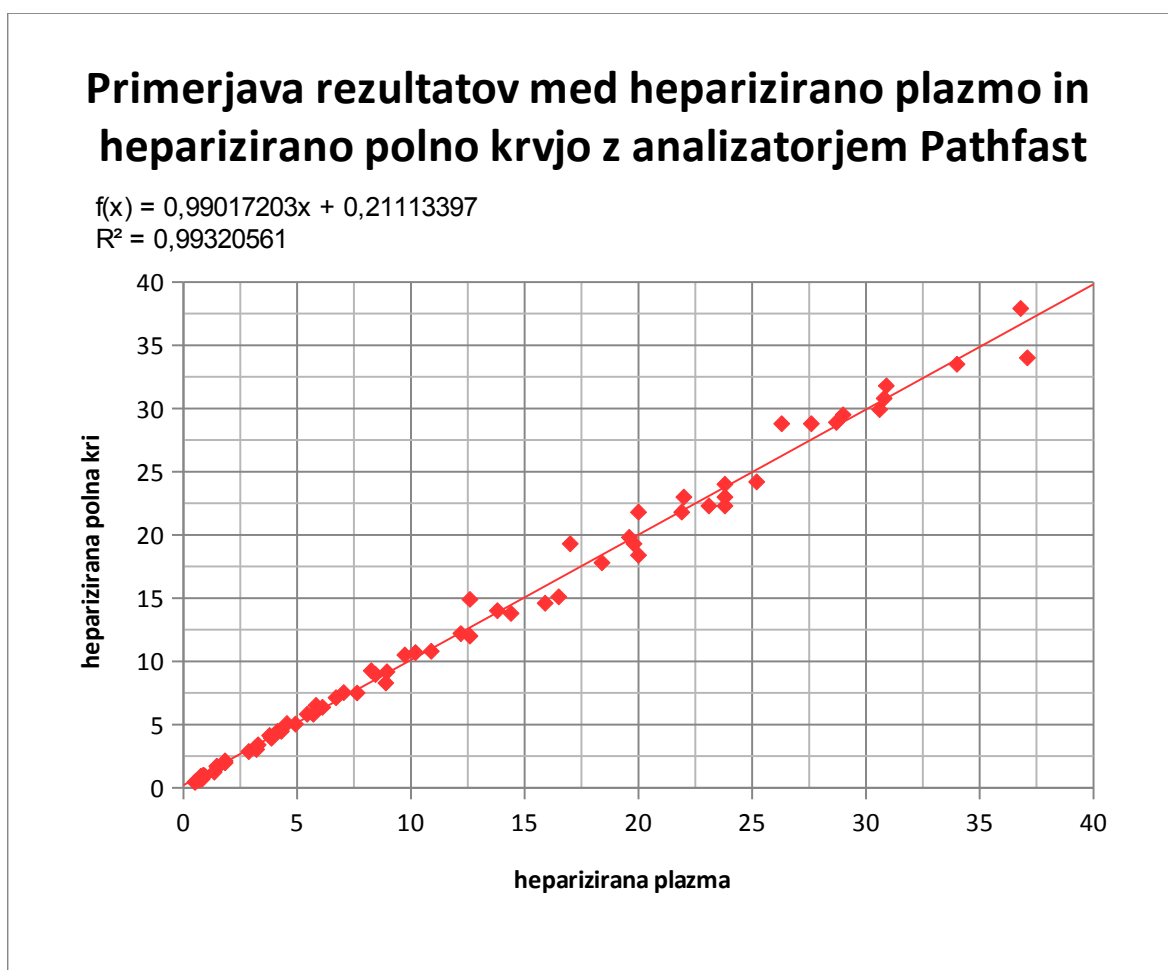
.....

Korelacija ali korelacijski koeficient je številka mera, ki predstavlja moč linearne povezanosti dveh spremenljivk.

$$r = ((\Sigma xy - (\Sigma x * \Sigma y/n)) / (((\sqrt{((\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2/n)) * ((\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2/n)))))$$

**$r = 0,996$**  ; korelacija rezultatov med meritvami vzorcev na analizatorju Pathfast v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi

**Graf 1: Primerjava rezultatov med plazmo in polno krvjo na analizatorju Pathfast**



### 1.1. Korelacija in regresija

Povezavo izmerjenih koncentracij med merjenjem progesterona v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi prikazuje zgornji graf (Graf 1). Iz grafa je razviden model linearne regresije. Za oceno moči povezave smo uporabili Pearsonov korelacijski koeficient, ki je 0,996. Ta nam nakazuje močno korelacijo. Določanje progesterona v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi na analizatorju Pathfast daje visoko primerljive rezultate.

Enačba regresijske premice je:  $y = 0,9902x + 0,2111$

Iz naklona regresijske premice ( $0,9902 < 1$ ) je razvidno, da so rezultati merjenja progesterona na analizatorju Pathfast v plazmi primerljivo enaki, kot so merjeni v polni krvi.

## 2. PONOVLJIVOST, LINEARNOST REDČENJA IN PRIDOBITEK DODATKA

### 2.2. Ponovljivost v seriji za progesteron

Ponovljivost znotraj serije nam pove, kako se sipajo rezultati analiz istega kontrolnega vzorca v seriji.

**Tabela IV: Ponovljivost v seriji za progesteron v plazmi in polni krvi ( $\mu\text{g/L}$ )**

Vzorec	Plazma 1	Plazma 2	Plazma 3	Polna kri 1	Polna kri 2	Polna kri 3
1	7.9	18.9	29.9	11	23	33.2
2	7.96	19.2	27.7	9.73	20.2	27.3
3	8.12	18.3	29.4	9.2	22.6	33.7
4	8.4	17.6	27.6	8.82	20.4	29
5	7.51	17.3	25.5	8.81	20.4	28.5
6	8.33	18.1	27.2	8.95	19.3	30.6
7	7.8	20.1	26.7	9.97	21.9	26.7
8	8.09	17.9	25.8	9.09	18.3	29.3
9	7.78	18.9	30	10	20.4	29.7
10	7.78	17.2	27.3	9.71	18.2	26.7
11	7.72	18.9	25.8	9.61	18.3	31.4
12	7.88	19.6	29.6	9.04	21.2	31.5
13	7.49	19.1	27.8	9.1	23.3	32.2
14	7.42	19.1	27.5	9.02	19.4	30
15	7.73	17.9	30	11.1	20.4	31.3
16	7.49	19	28.3	8.55	19.8	27.5
17	7.86	18.5	27.9	9.53	20.1	29.9
18	8.06	17.9	28.4	9.24	20.8	29.3
19	8.18	19.4	28.2	8.59	21.3	32.5
20	8.12	17.5	29.2	9.31	20.7	27.07.11

Vzorec	Plazma 1	Plazma 2	Plazma 3	Polna kri 1	Polna kri 2	Polna kri 3
MIN	7.42	17.2	25.5	8.55	18.2	26.7
MAX	8.4	20.1	30	11.1	23.8	33.7
MEAN	7.88	18.5	28	9.42	20.5	29.9
SD	0.28	0.82	1.4	0.7	1.53	2.13
CV %	3.6	4.4	5	7.4	7.5	7.1
N	20	20	20	20	20	20

Za vsak vzorec posebej smo iz rezultatov za progesteron izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV) v seriji. Izmerjene vrednosti progesterona so podane v tabeli IV.

Priporočene vrednosti proizvajalca so:

Koeficient variacije za nizke vrednosti progesterona: 8,6%

Koeficient variacije za srednje vrednosti progesterona: 6,1%

Koeficient variacije za visoke vrednosti progesterona: 7,2%

Za ponovljivost v seriji v plazmi smo analizirali 3 kontrolne vzorce, nizke, srednje in visoke vrednosti. Koeficienti variacije pri kontrolnih vzorcih so bili 3,6%, 4,4% in 5,0%, kar pomeni, da je ponovljivost rezultatov v seriji zelo dobra, saj ne presega priporočil proizvajalca.

Za ponovljivost v seriji v polni krvi smo prav tako analizirali 3 kontrolne vzorce. Koeficienti variacije pri kontrolnih vzorcih je 7,4 %, 7,5 % in 7,1 %, kar pomeni, da je ponovljivost rezultatov v seriji dobra, saj ne presega priporočil proizvajalca.

Iz tega sklepamo, da je ponovljivost v seriji v vseh primerih zelo dobra.

### 2.3. Ponovljivost izven serije za progesteron

Tri kontrolne vzorce nizke, srednje in visoke vrednosti smo na analizatorju Pathfast določali štirikrat dnevno v obdobju 20 dni.

V **tabeli V** so prikazane posamezne meritve za vsak dan posebej. Razlike med dnevnimi meritvami so prikazane v desni polovici spodnje tabele.

Ponovljivost izven serije opisuje, kako se sipajo rezultati analiz istega kontrolnega vzorca

v različnih serijah.

Koeficient variacije v odstotkih v plazmi (priporočila proizvajalca): za nizke vrednosti progesterona 8,6%, za srednje vrednosti 6,1% in za visoke vrednosti 7,2%.

**Tabela V: Ponovljivost izven serije za progesteron**

dan	koncentracija progesterona v µg/L						dnevna nihanja konc. progest. glede na dnevno povpr vrednost		
	QC1		QC2		QC3		QC1	QC2	QC3
1	4,61	4,77	15,2	16,5	27,3	29	+-2,1%	+-4,8%	+- 3,2%
	4,42	4,57	15,5	16	30,1	29,9			
2	5,15	4,79	16	17,7	30,1	30,8	+-3,1%	+-3,1	+-0,74%
	4,79	4,56	16,9	17,3	30,4	30,2			
3	4,74	4,37	18	15,5	31,9	31,2	+-2,5%	+-6,8%	+-5,2%
	4,68	4,58	17,1	15,1	28,5	28,3			
4	4,3	4,57	15,3	14,6	28,3	26,7	+-3,2%	+-2,9%	+-6,6%
	4,49	4,8	16,2	15,5	28,3	33			
5	5,14	4,7	15,6	15,9	26,5	27,4	+-5,4%	+-3,8%	+-2,2%
	5,49	5,44	16,8	17,2	27,8	28,5			
6	4,5	5,02	17,6	16,9	25	25	+-6,4%	+-1,9%	+-4,5%
	5,66	5,14	17,6	18,2	28,6	26,1			
7	4,8	4,58	16,9	16,3	27,2	26,9	+-5,5%	+-2,2%	+-2,5%
	4,37	5,2	17,3	16,4	25,3	26,9			
8	4,83	5,31	15,8	16,7	26,5	27,1	+-2,9%	+-4,1%	+-3,4%
	5,01	5,13	18,2	16,5	28,9	28,5			
9	5,58	4,8	16,2	15,7	24,6	25,8	+-5,6%	+-1,3%	+-3,0%
	4,7	4,79	16,2	16,3	27,4	25,6			
10	5,26	5,23	18,5	17,9	31,3	29,2	+-1,0%	+-4,7%	+-2,6%
	5,18	5,1	15,8	17,4	29	29,4			
11	5,38	4,8	19	16,1	30,4	30	+-5,1%	+-6,3%	+-4,7%
	4,62	4,68	16,6	18,1	28,1	26,9			
12	5,18	5,19	16,4	16,5	31,1	26,9	+-0,5%	+-2,8%	+-6,8%
	5,11	5,16	17,9	16,9	32,9	32,7			
13	5,22	5,29	18	19,4	29,9	32,1	+-3,3%	+-3,7%	+-6,9%
	5,78	5,38	18,4	17,1	25,2	29			
14	5,79	6	16,5	17	27,2	28,6	+-2,5%	+-4%	+-10,7%
	5,72	5,49	16,9	18,7	38	30,6			
15	6,44	6,53	17,1	19,2	30	33,1	+-8,1%	+-3,4%	+-4,4%
	5,55	5,48	18,2	18,6	30,3	28,2			
16	5,67	4,62	18,6	18,1	28,7	24,1	+-7,4%	+-7,9%	+-3,6%
	5,54	5,55	14,6	16,9	30,4	31,3			
17	5,25	5,68	17	17,1	31,2	28,2	+-4,5%	+-3,4%	+-4,6%
	5,73	5,18	18,5	18	32,9	31,7			
18	5,34	5,4	17,2	18,6	29,9	30	+-2,5%	+-2,5%	+-4,8%
	5,4	5,77	18,2	18,3	31,5	34,5			
19	5,14	4,89	17,7	19,2	31,3	31,8	+-4,0%	+-2,8%	+-4,3%
	5,25	4,69	18,1	17,7	34,9	30,3			
20	5,64	5,14	18	18,6	32	33,9	+-5,8%	+-1,4%	+-4,7%
	5,55	4,83	17,8	17,9	34,8	30,6			



**Tabela V: Ponovljivost izven serije za progesteron**

( $\mu\text{g/L}$ )	QC 1	QC 2	QC 3
MIN	4.3	14.6	24.1
MAX	6.53	19.4	38
MEAN	5.13	17.1	29.4
SD	0.47	1.14	2.69
CV %	9.2	6.7	9.2
N	40	40	40

Koeficienti variacije so pri vseh kontrolnih vzorcih malenkost višji, kot je priporočilo proizvajalca. Razlike od priporočenih vrednosti so od 7 do 28 %. To pomeni, da je ponovljivost izven serije nekoliko slabša, kot priporoča proizvajalec. Slabši rezultat gre verjetno na račun moje neizkušenosti pri delu na aparatu.

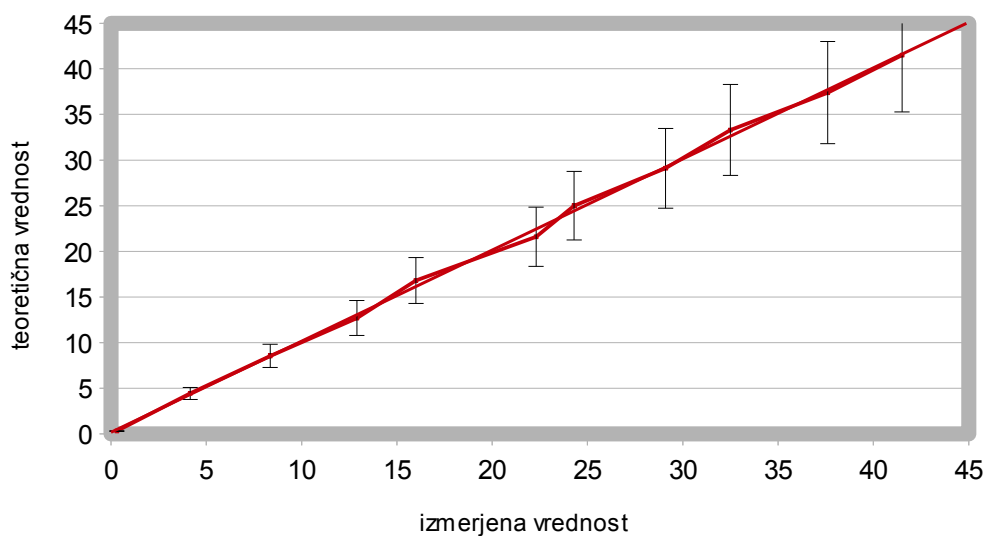
## 2.4. Linearnost redčenja

**Tabela VI: Linearnost redčenja**

Plazma							
redčenje		Progesteron- izmerjena vrednost ( $\mu\text{g/mL}$ )				Teoretična vrednost ( $\mu\text{g/mL}$ )	Izkoristek (%)
Nizka	visoka	N1	N2	N3	MEAN		
0	1	41.1	40.7	42.7	41.5	41.5	100
0.1	0.9	38.2	39.2	35.5	37.6	37.4	101
0.2	0.8	30.9	33.6	33.1	32.5	33.3	97.8
0.3	0.7	31.5	28.1	27.7	29.1	29.1	99.8
0.4	0.6	24.3	23.9	24.6	24.3	25	97
0.5	0.5	23.3	22.4	21.2	22.3	21.6	103
0.6	0.4	17	15.7	15.4	16	16.8	95.5
0.7	0.3	13.1	13	12.7	12.9	12.7	102
0.8	0.2	8.69	8.28	8.08	8.35	8.55	97.7
0.9	0.1	4.23	4.09	4.15	4.16	4.43	93.8
1	0	0.32	0.33	0.29	0.31	0.31	/

$$f(x) = 0,9989954013x + 0,1727342011$$
$$R^2 = 0,9988226811$$

## Linearnost redčenja



**Graf 2: Prikazuje linearnost redčenja**

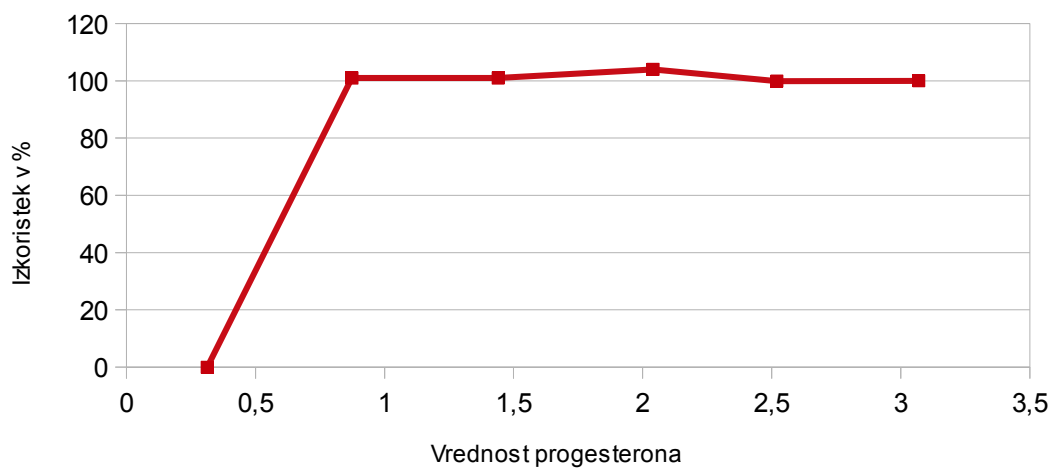
Razredčitev smo izvedli tako, da smo vzeli vzorce z nizko in visoko koncentracijo progesterona. Razredčenim vzorcem, smo izmerili koncentracijo progesterona v treh paralelkah ter izračunali povprečje. Izračunali smo razliko do teoretične vrednosti. V grafu smo pokazali, da je linearnost redčenja dobra, saj odstopanje ni večje od 15 %.

## 2.5. Pridobitek dodatka

Tabela VII: Pridobitek dodatka (plazma 1)

Plazma 1							
Redčenje		Progesteron- izmerjena vrednost (µg/L)				Teoretična vrednost (µg/L)	Izkoristek %
Nizko	Visoko	N 1	N 2	N 3	MEAN		
0.0	1.0	3.130	2.930	3.150	3.070	3.070	100
0.2	0.8	2.600	2.420	2.530	2.520	2.520	100
0.4	0.6	2.060	2.140	1.910	2.040	1.970	104
0.6	0.4	1.390	1.470	1.450	1.440	1.420	101
0.8	0.2	0.855	0.932	0.831	0.873	0.865	101
1.0	0.0	0.321	0.329	0.290	0.313	0.313	/

Pridobitek dodatka (plazma 1)

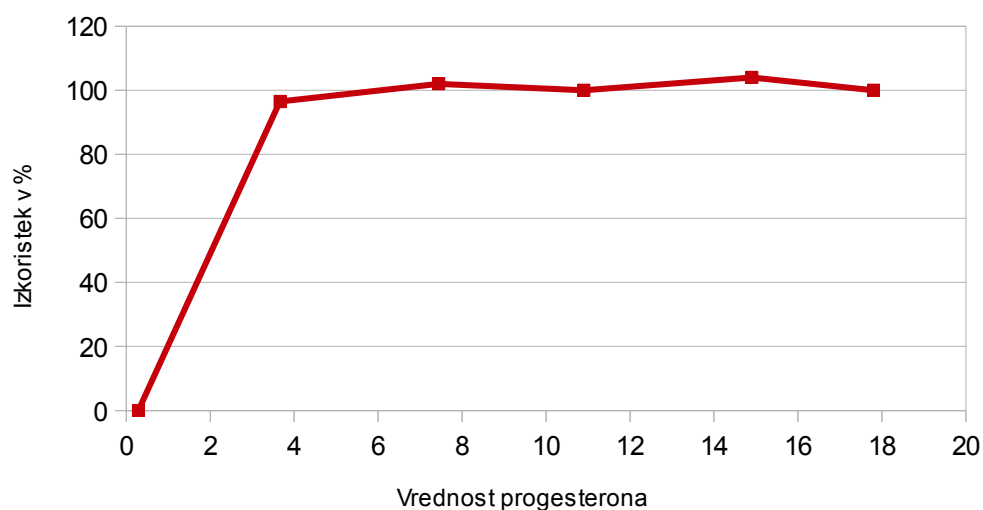


Graf 3: Prikazuje pridobitek dodatka, kjer imamo nizko vrednost progesterona, ki ga redčimo

**Tabela VIII: Pridobitek dodatka (plazma 2)**

Plazma 2							
Redčenje		Progesteron–izmerjena vrednost (µg/L)				Teoretična vrednost (µg/L)	Izkoristek %
Nizko	Visoko	N 1	N 2	N 3	MEAN		
0.0	1.0	17.0	18.1	18.4	17.8	17.8	100
0.2	0.8	13.7	16.2	14.7	14.9	14.3	104
0.4	0.6	10.4	11.7	10.5	10.9	10.8	100
0.6	0.4	7.40	7.47	7.44	7.44	7.31	102
0.8	0.2	3.99	3.53	3.47	3.66	3.80	96.5
1.0	0.0	0.396	0.184	0.285	0.288	0.288	/

**Pridobitek dodatka (plazma 2)**

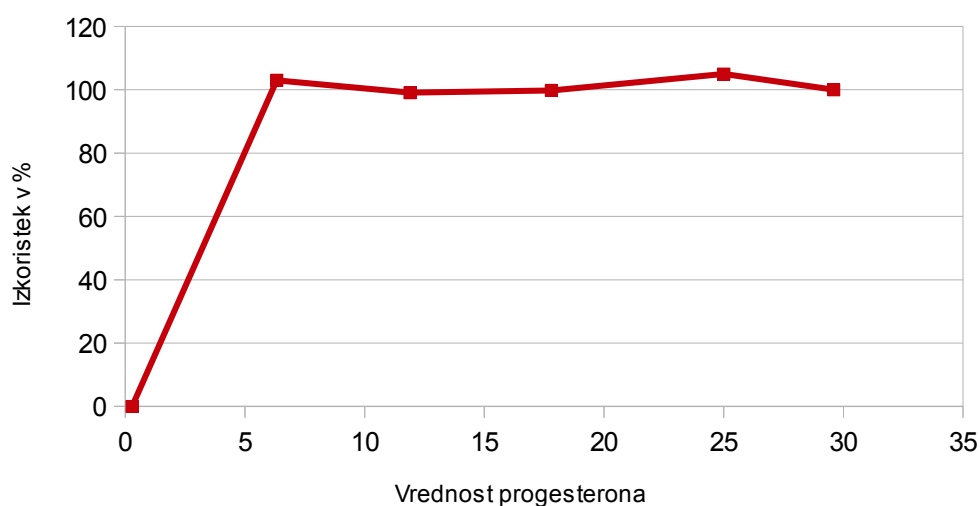


**Graf 4: Prikazuje pridobitek dodatka, kjer imamo srednje vrednosti progesterona, ki ga redčimo**

**Tabela IX: Pridobitek dodatka (plazma 3)**

Plazma 3							
Redčenje		Progesteron–izmerjena vrednost (µg/L)				Teoretična vrednost (µg/L)	Izkoristek %
Nizko	Visoko	N 1	N 2	N 3	MEAN		
0.0	1.0	30.9	28.4	29.5	29.6	29.6	100
0.2	0.8	25.6	24.0	25.3	25	23.7	105
0.4	0.6	17.6	18.0	17.9	17.8	17.9	99.8
0.6	0.4	11.7	11.7	12.3	11.9	12.0	99.1
0.8	0.2	6.76	6.21	6.02	6.33	6.15	103
1.0	0.0	0.396	0.184	0.285	0.288	0.288	/

**Pridobitek dodatka (plazma 3)**



**Graf 5: Prikazuje pridobitek dodatka, kjer imamo visoke vrednosti progesterona, ki ga redčimo**

Za izračun pridobitka dodatka smo vzeli tri vzorce plazme. Prvi vzorec je imel nizke, drugi srednje in tretji visoke vrednosti progesterona. Vsako meritev smo ponovili trikrat in izračunali povprečje. Izmerjene vrednosti smo primerjali s teoretičnimi vrednosti in izračunali izkoristek v procentih. Test pridobitka dodatka je pokazal ujemanje rezultatov po dodatku progesterona v območju  $\pm 5\%$ .

## RAZPRAVA

Najpomembnejši progestin je progesteron. Pri ženski, ki ni noseča, progesteron izloča rumeno telesce v velikih količinah v prvi polovici ovarijskega cikla. V drugi polovici ovarijskega cikla ga izločajo jajčniki in skorja nadledvične žleze. Progesteron je v bistvu steorid, ki se v jajčniku večinoma sintetizira iz holesterola v kri.

Progesteron uravna menstruacijski cikel in ima pomembno vlogo pri vzdrževanju nosečnosti.

Hormon progesteron določamo za ugotavljanje vzrokov neplodnosti, da bi sledili ovulaciji, pri ugotavljanju zunajmaternične nosečnosti, pri spremljanju normalne nosečnosti in pri ugotavljanju vzroka za nenormalno krvavitev iz maternice.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti oziroma primerjati rezultate določanja progesterona v polni krvi in v plazmi ter ugotoviti, kateri vzorec je primernejši za določanje progesterona, saj je temeljna naloga vsakega laboratorija izvajanje analiz, ki dajejo hitre, točne in zanesljive rezultate.

Testiranje ob pacientu (POCT) se vse pogosteje uporablja v laboratorijskem testiranju za določanje progesterona, saj omogoča hitro pridobitev rezultatov in s tem hitro prilagajanje zdravljenja in terapije.

Mi smo za analizo izbrali avtomatski imunološki analizator, ki združuje postopno kemiluminiscenčno tehnologijo s patentirano tehnologijo „Magtration“. POCT majhne koncentracije analita analizira z visoko točnostjo in natančnostjo. Analizator zagotavlja optimalno občutljivost.

Na analizatorju Pathfast smo določali koncentracijo progesterona v polni krvi in v plazmi ter izračunali ujemanje obeh metod. Najprej smo določili linearnost. Iz grafa (Graf 1) je

razviden model linearne regresije. Za oceno moči povezave med koncentracijo progesterona v polni krvi in v plazmi smo uporabili Pearsonov korelacijski koeficient, ki je 0,996, kar nakazuje močno korelacijo med rezultati.

Ugotovili smo, da določanji progesterona v heparizirani plazmi in heparizirani polni krvi na analizatorju Pathfast dajeta visoko primerljive rezultate.

Enačba regresijske premice je:  $y = 0,9902x + 0,2111$

Iz naklona regresijske premice ( $0,9902 < 1$ ) je razvidno, da so rezultati merjenja progesterona na analizatorju Pathfast v plazmi primerljivi z merjenji v polni krvi.

Izračunali smo še ponovljivost v seriji. Imeli smo tri kontrolne vzorce za plazmo in tri za polno kri z nizko, srednjo in visoko koncentracijo. Za vsak kontrolni vzorec smo opravili 20 ponovitev. Izračunali smo standardno deviacijo in koeficient variacije. Ugotovili smo, da je ponovljivost v seriji v plazmi in v polni krvi zelo dobra.

Izračunali smo tudi ponovljivost izven serije. Tri kontrolne vzorce nizke, srednje in visoke vrednosti smo na analizatorju Pathfast določali štirikrat dnevno v 20 dneh. Ugotovili smo, da je ponovljivost izven serije na analizatorju Pathfast nekoliko slabša, kot so priporočila proizvajalca. Vzrok za slabši rezultat je najverjetneje moja neizkušenost za delo na aparatu.

Ugotavljali smo tudi linearnost metode. Razredčitev smo naredili tako, da smo pomešali nizke in visoke koncentracije vzorcev in progesterona med seboj. Nato smo vzorcem, ki smo jih pomešali oziroma redčili, izmerili vrednost progesterona v treh paralelkah ter izračunali povprečje. Izračunali smo razliko do teoretične vrednosti. V grafu smo ugotovili, da je linearnost redčenja dobra, saj ne presega 15 % linearne premice.

Test pridobitka dodatka je pokazal ujemanje rezultatov po dodatku progesterona v območju  $-/+ 5 \%$ .

V diplomski nalogi smo ugotovili, da določanje progesterona v heparizirani plazmi in v heparizirani polni krvi na analizatorju Pathfast daje visoko primerljive rezultate in da lahko za testiranje uporabimo polno kri. Na ta način skrajšamo čas za pridobitev rezultata, saj vzorca ni potrebno centrifugirati.



## SKLEP

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Izračunan Pearsonov korelacijski koeficient ( $r = 0,996$ ) nam nakazuje, da z analizatorjem Pathfast dobimo primerljive rezultate, ne glede na to, ali uporabimo plazmo ali polno kri.
- Ponovljivost v seriji in izven serije je dobra.
- Testiranje ob pacientu oziroma POCT ima prednost predvsem v tem, da hitreje pridemo do rezultatov, kar omogoči takojšnji začetek zdravljenja.
- Ugotovili smo, da je določanje progesterona v polni krvi primernejše, saj vzorcev ni potrebno centrifugirati in hitreje pridemo do rezultatov.

## LITERATURA

- 1.) [http://sl.wikipedia.org/wiki/Endokrini\\_sistem](http://sl.wikipedia.org/wiki/Endokrini_sistem)
- 2.) Slijepčević Dragoljub: Endokrinologija gonades, Naučna Knjiga, Beograd, 1988: 3-5, 32-35, 44, 138-139, 164.
- 3.) Osredkar J.: Izbrana poglavja iz klinične kemije, maj 2008; 17-18, 31-36.
- 4.) Kocijančič Andreja: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 8-21, 256.
- 5.) <http://members.fortunecity.com/irvaj/holes.html>
- 6.) Seminar za tehnike laboratorijske medicine: Zbornik predavanj, Celje, Izola, Ljubljana, Maribor, september, oktober 1998: 5-8.
- 7.) Kocijančič Andreja: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 256-262, 256-262.
- 8.) Štiblar-Martinčič, Cör, Cvetko, Marš: Anatomija, histofiziologija, fiziologija, Ljubljana 2007: 78-86.
- 9.) <http://www.kontracepcija.si/si/cudesa-telesa/hormonsko-ravnotezje>
- 10.) [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:NtmYYtTLXJgJ:www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/MenstrualniCiklus.doc+progesteron&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESit5IKHNUMvQvoGBNHfiQAhoWy7f4PZjdBO6\\_Nzf6KkIV-oHXDvWtjYbssXhrfx0exhSQ0wyb8J9GkPiNUYBvJC2riKefbI78mTCrTu6ULFyIPgspr9a-a3Eo1ThsAhChhwmCIs&sig=AHIEtbQQukI0eK06tdOazFDYbQYNXG8MIw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:NtmYYtTLXJgJ:www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/MenstrualniCiklus.doc+progesteron&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESit5IKHNUMvQvoGBNHfiQAhoWy7f4PZjdBO6_Nzf6KkIV-oHXDvWtjYbssXhrfx0exhSQ0wyb8J9GkPiNUYBvJC2riKefbI78mTCrTu6ULFyIPgspr9a-a3Eo1ThsAhChhwmCIs&sig=AHIEtbQQukI0eK06tdOazFDYbQYNXG8MIw)
- 11.) [http://www.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page\\_id=11411](http://www.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=11411)
- 12.) [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?hl=sl&langpair=en%7Csl&rurl=translate.google.si&u=http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000411.htm&usg=ALkJrhgHefXF1bP7ySWZwml9nWQ7bQggwg](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=sl&langpair=en%7Csl&rurl=translate.google.si&u=http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000411.htm&usg=ALkJrhgHefXF1bP7ySWZwml9nWQ7bQggwg)
- 13.) <http://members.fortunecity.com/irvaj/holes.html>
- 14.) [http://www.medicine.virginia.edu/basic-science/departments/pharmacology/dab\\_lab/lecture\\_notes/lecture\\_notes/pdf/progesterone.pdf](http://www.medicine.virginia.edu/basic-science/departments/pharmacology/dab_lab/lecture_notes/lecture_notes/pdf/progesterone.pdf)
- 15.) [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:NtmYYtTLXJgJ:www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/MenstrualniCiklus.doc+progesteron&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESit5IKHNUMvQvoGBNHfiQAhoWy7f4PZjdBO6\\_Nzf6KkIV-](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:NtmYYtTLXJgJ:www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/MenstrualniCiklus.doc+progesteron&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESit5IKHNUMvQvoGBNHfiQAhoWy7f4PZjdBO6_Nzf6KkIV-)

[oHXDvWtjYbssXhrfx0exhSQ0wyb8J9GkPiNUYBvJC2riKefbl78mTCrTu6ULFyIPgsp  
r9a-a3Eo1ThsAhChhwmCIs&sig=AHIEtbQQukI0eK06tdOazFDYbQYNXG8MIw](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17817817)

16.) Slijepčević Dragoljub: Endokrinologija gonades, polne žlezde, Naučna Knjiga, Beograd, 1988:32-35, 44, 138-139, 164.

17.) <http://www.lab-breyer.com/pretrage/detalji/id/59/>

18.) Christopher P. Price, PhD, FRCPath, FACB: Point-of-Care Testing for Managers and Policymakers: From Rapid Testing to Better Outcomes, Washington, DC 2006.

19.) <http://www.revija-vita.com/index.php?>

[stevilkavita=69&naslovclanek=Analiza\\_opravljen\\_izven\\_laboratorija](http://www.revija-vita.com/index.php?stevilkavita=69&naslovclanek=Analiza_opravljen_izven_laboratorija)

20.) <http://translate.google.si/translate?hl=sl&langpair=en>

[%7Csl&u=http://www.cmft.nhs.uk/directorates/labmedicine/departments/poct/poct.asp](http://www.cmft.nhs.uk/directorates/labmedicine/departments/poct/poct.asp)

21.) Osredkar Joško: Izbrana poglavja iz klinične kemije, maj 2008: 306-321.

22.) <http://translate.google.si/translate?hl=sl&langpair=en>

[%7Csl&u=http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA](http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA)

23.) <http://www.pathfast.de/index.php?>

[option=com\\_content&view=article&id=82&Itemid=79](http://www.pathfast.de/index.php?option=com_content&view=article&id=82&Itemid=79)

24.) <http://sysdoc.doors.ch/MITSUBISHI/PATHFAST-brochure.pdf>

25.) [http://www.unboundmedicine.com/medline/ebm/record/21391473/full\\_citation](http://www.unboundmedicine.com/medline/ebm/record/21391473/full_citation)