

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SIMONČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program  
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA SIMONČIČ

PRIMERJAVA DVEH IMUNOKEMIJSKIH METOD ZA  
DOLOČANJE ANTI-MÜLLERJEVEGA HORMONA

COMPARISON OF TWO IMMUNOCHEMICAL  
METHODS FOR DETERMINING ANTI-MÜLLERIAN  
HORMONE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za koristne napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Hvala tudi vama, mami in Sanja, da me sprejemate takšno kot sem. Podpirali sta me ob mojih vzponih in padcih, ter potrpežljivo čakali da mi je uspelo dokončati diplomsko nalogo.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi vsa ta leta stali ob strani.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno, pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja mag.farm.

Ljubljana, marec 2012

Predsednik diplomske komisije: Prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: doc. dr. Mojca Kerec Kos

# KAZALO

ZAHVALA.....	3
IZJAVA.....	3
KAZALO.....	4
POVZETEK.....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM OKRAJŠAV.....	8
1 UVOD.....	9
1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA DELOVANJA ŽENSKIH SPOLNIH ORGANOV.....	10
1.1.1 FIZIOLOGIJA JAJČNIKOV.....	10
1.1.2. FIZIOLOGIJA MATERNICE.....	12
1.2. ENDOKRINI SISTEM.....	13
1.2.1 HIPOTALAMUS.....	14
1.2.2. HIPOFIZA.....	15
1.3. MENSTRUACIJSKI CIKLUS.....	16
1.4. MENOPAVZA.....	17
1.5. NEPLODNOST.....	19
1.6. HORMONI.....	21
1.7. ANTI - MÜLLERJEV HORMON.....	22
1.7.1. ANTI - MÜLLERJEV HORMON FIZIOLOGIJA.....	23
1.7.2. ANTI-MÜLLERJEV HORMON – OZNAČEVALEC KAKOVOSTI GAMETOGENEZE.....	24
1.8 METODE ZA DOLOČANJE ANTI-MÜLLERJEVEGA HORMONA.....	26
1.8.1. IMUNOLOŠKE METODE.....	26
1.8.1.1. PROTITELESA IN ANTIGENI.....	27
1.8.2. ELISA ( ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....	31
1.8.2.1 DIREKTNA (SENDVIČ) ELISA.....	32
1.8.2.2. INDIREKTNA ELISA.....	33
2. NAMEN DELA.....	35
3.1 PRINCIP TESTA ELISA IVD BECKMAN COULTER IN NAMEN UPORABE.....	36
3.1.1 ZBIRANJE VZORCA, PROCESIRANJE, REDČENJE IN SHRAMBA.....	36
3.1.2. MATERIAL.....	36
3.1.3 MATERIAL, KI JE POTREBEN, NI PA PRILOŽEN.....	37
3.1.4 PROCEDURA TESTA.....	38
3.1.4.1 Potek testa.....	38
3.1.5 REZULTATI.....	39
3.1.5.1 Standardna krivulja.....	39
3.1.6 PRIČAKOVANE VREDNOSTI.....	39
3.2 PRINCIP TESTA ELISA DSL IN NAMEN UPORABE.....	42
3.2.1 ZBIRKA VZORCEV IN PRIPRAVA.....	42

3.2.2. MATERIAL .....	43
3.2.3. MATERIAL, KI JE POTREBEN, NI PA PRILOŽEN.....	44
3.2.4 PROCEDURA TESTA .....	44
3.2.4.1 PRIPRAVA REAGENTOV .....	44
3.2.4.2 POSTOPEK TESTA.....	45
3.2.5 REZULTATI.....	46
3.2.5.1. STANDARDNA KRIVULJA.....	46
3.2.6 PRIČAKOVANE VREDNOSTI.....	47
3.2.7 KONTROLA KAKOVOSTI.....	48
4 REZULTATI.....	51
4.1. VZORCI .....	51
4.2 STATISTIČNI PROGRAM.....	53
4.3 OBDELAVA PODATKOV .....	53
4.4 SKUPINSKA ANALIZA.....	53
4.5 REZULTATI METODE DSL .....	54
4.6 METODA BECKMAN COULTER.....	56
5 SKUPINSKA PRIMERJAVA REZULTATOV .....	58
6 RAZPRAVA.....	61
7 SKLEP.....	64
8 LITERATURA.....	65

## POVZETEK

Anti-Müllerjev hormon (v nadaljevanju AHM), je hormon, ki ga določamo za ugotavljanje ovarijske rezerve in zamenjuje dosedaj klasične določitve foliklestimulirajočega hormona. Staranje jajčnikov in starostne spremembe postajajo aktualna problematika. AMH ni le označevalec populacije majhnih antralnih foliklov, temveč tudi napovednik kakovosti oocitov. Raven AMH lahko uporabimo za oceno stopnje menopavze.

Namen diplomske naloge je bila primerjava dveh imunokemijskih metod za določanje Anti-Müllerejega hormona in ugotovitev katera metoda daje boljše rezultate in je prijaznejša za uporabo v kliničnih laboratorijih. Analizirali smo vzorce seruma 46 pacientk, ki smo jih odvzeli v treh letih, med leti 2007 in 2010. V povprečju je bila starost pacientk 29.6 let, s standardnim odklonom 6.1 let. S statističnimi metodami smo ugotovili kakšna je primerljivost rezultatov.

Encimskoimunski test ELISA je hiter ter visoko občutljiv, uporaben pa je za večje molekule, ki imajo vsaj dva epitopa, katera se ne prekrivata. Primerjali smo metodi ELISA Beckman in ELISA DSL. AMH se ujame na monoklonska protitelesa z vezanim biotinom, skupaj s streptavidin peroksidazo. Antigen kompleks, ki ostane vezan na nosilec, določamo z dodatkom kromogen substrata. Intenziteta obarvanja vzorca je proporcionalna koncentraciji AMH.

Z imunološko metodo Beckman Coulter smo odkrili 26,08% več vzorcev s povišano koncentracijo AMH, z imunološko metodo DSL pa smo odkrili 19.57% več vzorcev z normalno vrednostjo AMH in 6.52% več vzorcev z zmanjšano vrednostjo. Najmanjše odstopanje med metodama se je pokazalo pri številu vzorcev z zmanjšano vrednostjo AMH. Ni bistvenega pomena katero metodo bi uporabili, vendar sem se odločila za metodo, ki ima manjše koeficiente variacije pri ponovljivosti v seriji in izven serije, to je metoda ELISA Beckman Coulter. Prijaznejša za uporabo v kliničnem laboratoriju je metoda Beckman Coulter, ker merimo absorbanco na eni valovni dolžini, pri metodi DSL pa merimo absorbanco substrata na dveh valovnih dolžinah.

## ABSTRACT

Determination of Anti-Müllerian hormone is important to predict an ovarian reserve. Nowadays it replaces the follicle stimulating hormone. The aging of ovaries and the age changes are becoming a current issue. AMH does not only predict the pool of small antral follicles but can also be a predictor of oocyte quality. The level of AMH can be used to determine the stage of menopause.

In this paper the comparison of the two immunoassays for determination AMH was made to find out which method gives better results and is friendlier to use in a clinical laboratory. We analyzed the serum samples of 46 patients. The analysis was made in the time of three years, between 2007 and 2010. The average age of the women is 29.6 years, with the standard deviation 6.1 years. Statistical analysis was made to find out the comparability of results.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is fast and highly sensitive. We use it to detect larger molecules with at least two epitopes, which do not overlap. We compared the immunoassays ELISA Beckman Coulter and ELISA DSL. AMH is caught to monoclonal antibodies labeled with biotin, together with streptavidin – peroxidase. The biotinylated antibody binds to the solid phase antibody – antigen complex and binds the conjugate. The intensity of the coloration is the proportional to the AMH concentration.

With immunoassay Beckman Coulter we discovered 26.08% more samples with increased concentration of AMH, but with immunoassay DSL we discovered 19.57% more samples with normal concentration of AMH and 6.52% more samples with decreased concentration of AMH. The minimal deviation between the methods was shown with the number of samples with decreased value of AMH. It is not significant which method we use, but I decided for the method with lower coefficient of variation in repeatability inside and outside the series, this is ELISA Beckman Coulter. The ELISA Beckman is friendlier for the use in clinical laboratory because we determine the absorbance measurement on one wavelength, in ELISA DSL the substrate is determined by dual wavelength absorbance measurement.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH – adenokortikotropni hormon

AMH – Anti – Müllerjev hormon

CRH – kortikotropin sproščujoči hormon

E2 – estradiol

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

ELISA – Enzyme – linked immunosorbent assay – encimsko imunski test

FSH – foliklestimulirajoči hormon

GnRH – gonadotropin sproščujoči hormon

HIV – humani imunodeficientni virus

HRP – hrenova peroksidaza

ICSI – intracitoplazmično injiciranje sperme

IUI – umetna osemenitev

IVF – zunajtelesna oploditev

IVF-ET – in vitro oploditev in prenos zarodka

LH – lutenzirajoči hormon

OBMP – oploditev z biomedicinsko pomočjo oz. umetna oploditev

OHSS – sindrom hiperstimulacije jajčnikov

PCOS – sindrom policističnih jajčnikov

SZO – Svetovna zdravstvena organizacija

TGF $\beta$  – transformirajoči rastni hormon

TMB - tetrametilbenzidin

TSH, TRH – ščitnico stimulirajoči hormon



# 1 UVOD

Zaradi spremenjenih socialnoekonomskih razmer se v današnjem času ženske kasneje odločajo za družino. Staranje jajčnikov in starostne spremembe postajajo aktualna problematika današnjega časa, saj ugotavljajo, da se v razvitih deželah načrtujejo prve nosečnosti v pozni fazi rodnega obdobja. [1]

Na število otrok v družini vplivajo različni družbeno-ekonomski in kulturni dejavniki, prav tako tudi tradicija. Medtem ko v nekaterih deželah v razvoju rojevajo mlada dekleta (Tunizija, Maroko), se v razvitih zahodnih deželah za nosečnost odločajo čedalje starejše ženske, sočasno pa v nekaterih razvitih deželah (npr. v ZDA) narašča plodnost v adolescenci in čedalje več parov se odloča za prostovoljno neplodnost. [2]

Tako je povprečna starost prvorodke 29.3 leta. Po 30. letu začne reprodukcijska sposobnost počasi padati. Pri starosti ženske 25 let je možnost, da bo ženska zanosila po 6 mesecih rednih spolnih odnosov 75% , pri starosti 40 let pa ta možnost drastično pade. Vzrok za to je, da je jajčnik organ, ki se pri ženski najhitreje postara ter kromosomske nepravilnosti jajčec, pa so prav tako posledica staranja jajčnika oz. jajčnih celic. Poleg tega ima 40 let stara ženska dvakrat večjo verjetnost za spontani splav kot 20 letna. Več je tudi zunajmaterničnih nosečnosti pri starosti nad 35 let. Vse številčnejše so ženske, ki iščejo pomoč zaradi neplodnosti v poznih tridesetih letih. Vendar so postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo pri starejših ženskah manj uspešni kot pri mlajših. Manjše je število nosečnosti na bolnico in število nosečnosti na ciklus, večja pa je tudi pojavnost spontanih splavov. Degenerativne spremembe v jajčniku se pričnejo že po 35. letu starosti, po 38. letu pa se pojavljajo še znamenja hormonskih sprememb (FSH, inhibin) in spremembe v menstruacijskem ciklu. Zato se tudi plodnost zmanjša. [1]

Prevalenca neplodnosti je v različnih deželah sveta različna. Pri čemer se moramo opirati na različne vire zanesljivih in nezanesljivih informacij. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) ima od 5 do 8% parov v razvitih in do 30% parov v razvijajočih se deželah, to je 50 do 80 milijonov žensk in moških v reproduktivnem obdobju, določene probleme z neplodnostjo. [2]

Razvoj novih tehnologij je bistveno vplival na obravnavanje neplodnosti tako v razvitih kot tudi v razvijajočih se deželah. Velik del je prispeval tudi razvoj endokrinologije. Z novimi diagnostičnimi testi odkrivamo nekdanje popolnoma neugotovljive hormonske motnje, ki jih zdravimo z na novo izoliranimi in sintetiziranimi hormoni. [2]

## 1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA DELOVANJA ŽENSKIH SPOLNIH ORGANOV

Ženska rodila so zgrajena tako, da tvorijo jajčeca, sprejemajo spermio in hranijo nerojenega otroka. Ženska spolovila delimo v notranja in zunanja. Notranja spolovila v medenici so parna jajčnika (ovarium) in jajcevoda (tuba uterina) ter maternica (uterus) in nožnica (vagina). Do polne velikosti se razvijejo med 10. in 15. letom starosti. [2]

Ženska je ponavadi na vrhuncu rodnosti v poznih dvajsetih letih. Da pride do oploditve, mora semenčica, ki potuje po jajcevodu navzgor, priti v stik z jajčecem najkasneje 24 ur po tistem, ko se je jajce sprostilo iz jajčnika. Zdrava ženska ima v povprečnem mesecu 25-odstotno možnost da zanosi. Večina žensk, ki želijo zanositi, lahko zanosi po naravni poti v enem letu. [2,5]

### 1.1.1 FIZIOLOGIJA JAJČNIKOV

Na vsaki strani maternice je za oreh velik jajčnik. Ima obliko večjega mandlja, vendar se njegova velikost spreminja zlasti v odvisnosti od starosti (v starosti se manjša). Od samega začetka življenja žensko telo hrani v njih na tisoče nezrelih jajčec (oocitov). V rodnem obdobju se jih sprosti samo okoli štiristo. Ta jajčeca pod vplivom luteinizirajočega hormona in folikle stimulirajočega hormona dozori. Vsak mesec tako dozori najmanj eno jajce in folikel, ki ga obdaja, počne (ovulacija). Po deset centimetrov dolgem jajcevodu potuje do maternice, v kateri je sluznična stena pripravljena, da ga sprejme in hrani naprej. [5]

Pred prvo ovulacijo je jajčnik gladek in rožnate barve, pozneje postane bolj sivkasto rožnate barve in grčast zaradi brazgotin po ovulacijah. Če jajčeca v jajcevodu ne oplodi semenčica, da bi se lahko razvilo v zarodek, se sluznična obloga maternice 14 dni po ovulaciji odlušči in izloči z menstrualno krvavitvijo. Prva menstruacija se imenuje menarha. Menstruacija se konča v menopavzi. [5]

V jajčniku se združujeta dve fiziološko pomembni dejavnosti: rast in dozorevanje spolnih celic in sinteza hormonov.

V skorjo so v različnih razvojnih stopnjah vloženi specifični deli jajčnika, jajčni folikli. V povrhnjem delu, neposredno pod vezivno ovojnico, so najmanjši, primordialni ali primarni folikli, folliculli primarii. To so okrogle tvorbe, zgrajene iz nezrelih jajčnih celic, primarnih oocitov. V premeru merijo od 20 do 50  $\mu\text{m}$ . [2]

Po rojstvu vsebujejo primarni folikli deklice oocyte I v profazi prve meiotične delitve in v tej stopnji obmirujejo do pubertete. Ob ovulaciji se prva meiotična delitev konča. S staranjem se število primarnih foliklov zmanjšuje in po 35. letu jih v preparatu že težje najdemo. [5]

Ženske se rodijo z določenim številom ovarijskih foliklov. Že intrauterino in takoj po rojstvu se začne propadanje primordialnih foliklov; to propadanje pa je pospešeno po 38. letu starosti. Takoj po rojstvu ima novorojenka v skorji obeh jajčnikov sedemsto tisoč do dva milijona jajčec. V otroštvu velika količina primarnih foliklov zakrni (atrezira) in jih do začetka razvojne dobe ali pubertete ostane samo še trideset do štirideset tisoč, od teh v rodnem obdobju do ovulacije dozori samo štiristo jajčec. Do popolnega propada in degeneracije vseh foliklov v ovariju pa pride več let po menopavzi. [3]

Poka na površini jajčnika se hitro zaceli v vidno brazgotino. Ker jajčni folikel počí vsakič na drugem mestu, je jajčnikova površina pokrita s številnimi brazgotinami.

Od 400 000 primarnih foliklov, ki nastanejo v fetalnem obdobju razvoja jajčnika, jih dozori v generativnem obdobju ženske največ 400. Ostali počasi propadejo, degenerirajo in izginejo. Proces propadanja lahko zajame folikel na kateri koli stopnji razvoja. Atrezija se prične že v času intrauterinega razvoja deklice in se konča v klimakteriju.

Celotni razvoj in dozorevanje jajčnih foliklov sta odvisna od cikličnih hormonskih sprememb. [2]

Staranje jajčnikov in starostne spremembe postajajo aktualna problematika današnjega časa, saj ugotavljajo, da se v razvitih deželah načrtujejo prve nosečnosti v kasni fazi rodnega obdobja.[14]

### 1.1.2. FIZIOLOGIJA MATERNICE

Maternica je votla mišična vreča z debelo steno in sluznično notranjo oblogo, endometrijem, ki je sposobna sprejeti in hraniti oplojeno jajčece. Preden ženska prvič zanosi je maternica hruškaste oblike, od sprednje proti zadnji strani sploščena. Po porodu se ne skrči na prvotno velikost. Do pubertete raste maternica počasi, po puberteti pa je rast hitrejša, dobiva hruškasto obliko in se spusti v medenico. Pri menstruaciji se maternica rahlo poveča, bolje je prekrvavljena in zaobljena. V menopavzi postaja maternica zopet manjša. Lega maternice se spreminja in je odvisna od polnosti mehurja, ki je spodaj pred njo in od polnosti danke, ki je nad njo in za njo. [2,5]

Zgradba maternice je prilagojena implantaciji in razvoju ploda. Fiziološko pomembni plasti sta sluznica in mišična plast. [2]

## 1.2. ENDOKRINI SISTEM

Telo je sestavljeno iz milijonov celic, ki imajo specialne naloge. Da celice uspešno opravijo zadano nalogo, mora med njimi obstajati neka komunikacija. V času razvoja sta se razvila dva osnovna sistema komuniciranja, endokrini in živčni sistem. Aktivnost endokrinega sistema je komplementarna aktivnosti živčnega sistema. Živčni sistem je namenjen predvsem za hitro, kratkotrajno komunikacijo med posameznimi celicami. Endokrini sistem pa je namenjen dalj časa trajajoči komunikaciji med več celicami. [10]

Endokrinologija je veda o kemičnih komunikacijah, s pomočjo katerih organizem nadzoruje fiziološka dogajanja, potrebna za vzdrževanje homeostaze.

V endokrinem sistemu žleze proizvajajo hormone, ki upravljajo različne funkcije v telesu. [8]

Pomembnejše endokrine žleze:

- češerika,
- hipofiza,
- ščitnica,
- priželjc,
- nadledvična žleza,
- trebušna slinavka,
- jajčnik,
- testis. [23]

Hormoni, tako imenovani kemični kurirji, po krvi potujejo do izbranih organov in jim prenašajo sporočila, pomembna za njihovo delovanje. Pomembni so za pravilno delovanje vsake celice po telesu, še posebej pomembno vlogo pa igrajo v času pubertete, menstruacije, nosečnosti in menopavze. [8]

Hipotalamus in hipofiza tvorita funkcionalno celoto, ki povezuje živčni in endokrini sistem. Oba integracijska sistema usklajujeta delovanje posameznih organov, zagotavljata dinamično ravnovesje in stalnost notranjega celičnega okolja ter skrbita za rast, dozorevanje in reprodukcijo organizma. [8]

Delovanje endokrinega sistema nadzoruje hipotalamus, ki leži v središču možganov in tudi sam tvori hormone, čeprav sam ni žleza. Hipotalamus je pomemben predvsem pri spanju in prebujanju, uravnavanju temperature, pri stresu in pri razburjenosti. Določeni centri so odgovorni za čustva, kot sta apatija in bes, drugi pa sodelujejo pri višjih miselnih funkcijah. [5]

### 1.2.1 HIPOTALAMUS

Hipotalamus ima več razredov nevronov: sinaptične, ki delujejo na blizu z neurotransmiterji, in neuroendokrine, ki sintetizirajo in izločajo peptide v krvni obtok in delujejo na daleč. Neuroendokrini nevroni imajo sposobnost, da pretvarjajo živčne impulze v hormonske informacije, vsaka funkcija pa poteka po svojih specifičnih nevronih. Izločeni hormonski peptidi delujejo več časa, ker modulirajo daljše procese in morajo vzdrževati potrebno sinaptično učinkovitost in vzdražljivost nevronov. Vplivajo na mnoge kompleksnejše dejavnosti organizma, kot na primer na razpoloženje, motivacijo in učenje. Neurohormone sintetizira celično telo nevrona, jih skladišči v mehurčkih in prenaša po aksonu, da se izločijo, ko je nevron dovolj vzdražen. V glavnem gre za polipeptide, aminokislino. Hipotalamus sprošča predvsem peptide, ki sprožijo nadaljne peptide v hormonski verigi preko hipofize. [7]

Hipotalamus poleg vpliva na obnašanje, sodelovanje pri uravnavanju kardiovaskularnega sistema, lakote in hranjenja, vnosa vode in občutka žeje, uravnava predvsem:

- aktivnost adenohipofize s sproščanjem sproščevalnih in zaviralnih hormonov v hipotalamo-hipofizni portalni krvni obtok in
- aktivnost neurohipofize prek nevrinov živčnih celic, po katerih se prenašajo, neurohormoni iz določenih hipotalamičnih jeder neposredno v zadnji režanj hipofize.

[2]

Poti delovanja hipotalamusa:

- hipotalamus - hipofiza - ščitnica,
- hipotalamus - hipofiza - skorja nadledvične žleze,
- hipotalamus - hipofiza - spolne žleze.

Za normalni razvoj in fiziološke spremembe ženskih spolovil je najpomembnejši sproščevalni hormon gonadotropinov (GnRH). [5]

Kratko steblo povezuje hipotalamus z glavno žlezo, hipofizo, ki ni nič večja od zrna graha. Hormoni se pretakajo iz hipotalamusa v hipofizo, ki spodbuja ali zaustavlja nastajanje hormonov v drugih žlezah glede na potrebe telesa. [5]

Ena od glavnih nalog hipotalamusa je nadzorovanje hipofize oziroma pospeševanje ali zaviranje njenih funkcij z izločanjem snovi v kapilare, s katerimi je prepredena hipofiza. [2]

### 1.2.2. HIPOFIZA

Hipofiza oziroma možganski privesek je pomožni endokrini organ na spodnji strani možganov, prek peclja povezan s hipotalamusom. Je majhna žleza z notranjim izločanjem, ki leži v koščeni vdolbini lobanjskega dna, v tako imenovanem turškem sedlu. Možganski privesek preko izločanja hormonov nadzoruje in uravnava delovanje drugih podrejenih žlez z notranjim izločanjem. [6]

Sprednji režnj hipofize uravnavajo nevrohormoni, ki se sproščajo iz hipotalamusa. Pod njihovim vplivom adenohipofiza izloča hormone, ki uravnavajo delovanje ščitnice, nadledvičnih in spolnih žlez, rast telesa, obarvanost kože in tvorbo mleka v dojkah. Delovanje zadnjega režnja hipofize uravnava hipotalamus neposredno preko živčnih povezav. Nevrohipofiza izloča hormona, ki vplivata na ravnovesje vode v telesu, izločanje mleka iz dojk in krčenje maternice. [6]

Hipofiza je endokrini žleza, ki je nadrejena nekaterim perifernim žlezam. S hormonom TSH uravnava delovanje ščitnice, z ACTH delovanje skorje nadledvičnih žlez in z gonadotropini delovanje gonad. To so njene ciljne žleze. [8]

### 1.3. MENSTRUACIJSKI CIKLUS

Menstrualni ciklus je pri ženskah različen. Pri 90 odstotkih žensk traja 25 do 35 dni. Začne se prvi dan menstruacije in konča en dan pred začetkom naslednje menstruacije. Pri normalnem ciklusu traja menstruacija tri do sedem dni, ovulacija pa nastopi 12 do 16 dni pred začetkom naslednje menstruacije. [9]

Ciklus urejajo hormoni. Na začetku ciklusa se v jajčnikih pod vplivom estrogenov razvijejo jajčeca. Sredi ciklusa, ko je estrogena največ, se količina luteinizirajočega hormona nenadno poveča in hitro zmanjša, kar povzroči, da se jajčece sprosti, tj. ovulacija. [9]

Po ovulaciji začne naraščati količina progesterona, kar maternico pripravi na nosečnost. Če maternica ne sprejme oplojenega jajčeca, količina progesterona pade in pojavi se menstruacija (mesečna krvavitev je izluščanje maternične sluznice). Če se oplojeno jajčece ugnezdi v maternici, nastopi nosečnost, količina progesterona še naprej narašča, menstruacija pa izostane. [9]

Menstruacija je periodično luščenje endogeno sekretorno spremenjenega endometrija. Je odsev in posledica sprememb v delovanju jajčnikov, iz katerih izhajajo spodbude za vse spolne in zunajspolne spremembe med menstruacijskim ciklusom. [2]

Prvo menstruacijsko krvavitev, ki se navadno pojavi v starosti od 12 do 14 let, imenujemo menarho, zadnjo menstruacijsko krvavitev, ki sledi fazi generativnega obdobja, pa menopavzo, katera nastopi v starosti 47 do 50 let. V generativnem obdobju se menstruacije pojavljajo približno na 28 dni, z različnimi individualnimi spremembami (7 dni). [2]

Spremembe v toku ciklusa potekajo v vseh organih, ki imajo steroidne receptorje, najbolj pa so izražene v jajčniku, endometriju, nožnici in v jajcevodih. [2]



## 1.4. MENOPAVZA

Menopavza je zadnja spontana menstruacija, ki jo določimo retrogardno, saj velja pravilo, da je zadnja menstruacija tista, ki ji dvanajst mesecev ne sledi več nobena redna menstruacija. Obdobje reproduktivne aktivnosti žensk določata prva in zadnja menstruacija (menarha in menopavza). Menopavza se pri slovenskih ženskah pojavi med petinštiridesetim in petinpetdesetim letom, v povprečju pa pri dvainpetdesetem letu. Nastop menopavze je pod močnim genetskih vplivom, zato razni reproduktivni dogodki (število nosečnosti, porodov) in drugi psihični, socialni in ekonomski dejavniki pri njenem nastanku niso pomembni. Pri kadilkah se menopavza pojavi približno dve leti prej kot pri nekadilkah. [4]

Nekaj napovednih dejavnikov, ki opredeljujejo staranje jajčnika, so spremembe menstruacijskega ciklusa, endokrini in biokemični parametri ter plodnost. [4]

Kronološka starost se pri ženskah ne ujema vedno z biološko starostjo. Ženske, ki imajo navidezno normalne menstruacijske cikle, imajo lahko različne ravni ovarijske rezerve. Prvo znamenje zmanjšane ovarijske rezerve je skrajšanje menstruacijskega ciklusa. Izbor foliklov, ki bodo zreli v naslednjem ciklusu, se začne že v kasni lutealni fazi, ko rumeno telesce izloča vse manj progesterona, estradiola (E2) in inhibinov. Koncentracija FSH kaže obratni vzorec glede na koncentracijo E2, zato pride pet dni pred menstruacijo do hitrega porasta FSH (brez dviga luteinizirajočega hormona- LH), ki doseže plato dva dni po začetku menstruacije. Zvečana koncentracija FSH spodbuja rast skupine ovarijskih foliklov. Razlaga za skrajševanje menstruacijskega ciklusa naj bi bila v ugotovitvi, da so koncentracije inhibinov zmanjšane v času izbora foliklov pri ženskah starejših od 40 let. Zmanjšana koncentracija inhibina je lahko posledica manjšega števila in slabe kakovosti jajčnih celic v foliklu starajočega se jajčnika. Zaradi zmanjšane koncentracije inhibinov (čemur sledi čezmerno povečanje koncentracije FSH) nastane napaka v izboru foliklov, kar vodi v spremenjeno fazo dozorevanja in zorenja jajčnih celic, nastopi neprimeren čas za ovulacijo in rumeno telesce prične nepopolno delovati. V prvi fazi teh sprememb je skrajšana lutealna faza, zaradi nepopolnega delovanja rumenega telesca. Ta se lahko klinično izraža s predmenstrualnimi krvavkastimi izcedki ali s skrajšanjem menstruacijskega ciklusa. V drugi, napredovani fazi, pa so ovulacije redke ali jih ni, zato je dolžina menstruacijskega ciklusa odraz zorenja in propada nerazpočenega folikla, kar lahko znaša od 16 do 24 dni. [3]

Koncentracija FSH v predmenopavznem obdobju zelo variira. Več let pred menopavzo postopno narašča in občasno pada in bi bilo zato pri ženskah z redno menstruacijo izredno težko določiti koncentracijo, ki opredeljuje dokončno izčrpanje ovarijske rezerve. [3]

Vloga in pomen inhibinov je postala bolj poznana šele zadnje desetletje. Inhibini so dimerični disulfidno vezani glikoproteini, zgrajeni iz  $\alpha$  in  $\beta$  A ali  $\beta$  B podenote. Nastajajo v različnih tkivih: v možganih, kostnem mozgu, placenti, hipofizi, testisih in ovarijih. Njihova primarna vloga je inhibicija izločanja FSH. Inhibin B nastaja predvsem v majhnih foliklih, inhibin A pa je produkt dominantnega folikla in rumenega telesca. Koncentracija inhibina B v zgodnji foliklovi fazi ciklusa naj bi zrealila ovarijsko rezervo. Ko se ženska približuje menopavzi, se serumske koncentracije inhibina B v foliklovi fazi ciklusa zmanjšajo, temu pa sledi porast FSH. V procesu staranja jajčnika se ravni inhibina B v foliklovi fazi znižajo prej kot koncentracije inhibina A. V zadnjem desetletju se kot napovednik ovarijske rezerve uveljavlja anti-Müllerjev hormon (AMH), ki nastaja v granuloznih celicah ovarija in uravnava razvoj primarnih foliklov z inhibitornim delovanjem na izločanje FSH. Anti-Müllerjev hormon je del super družine ravnega faktorja  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), ki ga izločajo izključno testisi in ovariji. [3]

Približno deset let že vemo, da določanje koncentracije FSH drugi, tretji ali četrti dan menstruacijskega ciklusa precej natančno napoveduje bodočo plodnost. Raven FSH > 14 IE/L kaže le na 5 odstotno možnost, da bo prišlo do zanositve; normalna koncentracija FSH ob zvečani koncentraciji E2 tretji dan ciklusa je prav tako slab napovedni znak. Ta paradoksn izvid kaže, da je koncentracija E2 tako visoka, da zavre FSH do takšne ravni, da onemogočajo spodbujanje rasti foliklov. Izguba plodnosti je prvo znamenje staranja jajčnika in poteka ponavadi hkrati z monotrofnim porastom v koncentraciji FSH in s spremembami v menstruacijskem ciklusu. Pomanjkljivost tega testa je v občasnem padanju in naraščanju koncentracije FSH že nekaj let pred dokončnim izčrpanjem ovarijske rezerve. [3]

Med označevalce ovarijske rezerve spada tudi anti-Müllerjev hormon, ki v zadnjem desetletju postaja vse pomembnejši napovednik zaloge primarnih foliklov. [3]

## 1.5. NEPLODNOST

Neplodnost je nezmožnost zanositve po enem letu rednih spolnih odnosov brez uporabe kontracepcije. Težave lahko pričakujemo pri 10 – 15% spolno zrele (fertilne) populacije.

V Sloveniji je 400.000 parov v reproduktivnem obdobju, med njimi so tri četrtine v družinskem razmerju, približno 10% pa je neplodnih ali imajo težave z načrtovanjem družine. To pomeni, da ima 60.000 prebivalcev Slovenije težave zaradi neplodnosti. [3]

Fekundabilnost je verjetnost zanositve v enem menstrualnem ciklusu; pri zdravem mladem paru je to uresničljivo le v 25%, ker večinoma v vsakem ciklusu niso prisotni vsi pogoji za zanositev. [3]

Verjetnost zanositve je pri vsakem paru različna in je odvisna od številnih okoliščin, ki določajo oploditveno sposobnost (fertilnost) vsakega posameznika. Kombinacija lastnosti, ki jo vsak od partnerjev prinaša v skupnost, določa njihovo fekundabilnost, zato lahko vsakega posameznika označimo kot plodnega, manj plodnega ali neplodnega. Pri reševanju težav neplodnosti obravnavamo par kot celoto v isti ambulanti. [3]

Pri neplodnosti upoštevamo starostno obdobje, ko sta partnerja lahko plodna (reproduktivno obdobje); le-to nastopi po puberteti. Pri ženski poznamo tudi obdobje, ko je fiziološko manj plodna (premenopavza) ali neplodna (pomenopavza). [3]

Vzrok za neplodnost je lahko pri moškem, ženski ali obeh. Pri ženski ugotovimo vzrok za neplodnost v 50%, pri moškem v 35%, nepojasnjenih neplodnosti pa je 10 – 15%. Neplodnost je lahko primarna; to pomeni, da ženska ni nikoli zanosila, moški partner pa nikoli oplodil katere koli partnerke. Sekundarna neplodnost pa pomeni, da ženska ne more ponovno zanositi, pri moškem pa to pomeni, da je že oplodil partnerko. Čim dlje traja neplodnost v zakonu, tem manjša je verjetnost spontane zanositve. [3]

Pri ženskah so lahko vzroki za neplodnost:

- genitalnega izvora (v nožnici, materničnem vratu, maternici, jajcevodu, v jajčnikih),
- ekstragenitalnega izvora (zaradi bolezni drugih endokrinih žlez in drugih bolezni) ali

- psihogeni.

Pri moškem so lahko vzroki:

- genitalni (pretestikularni in testikularni),
- ekstragenitalni (posttestikularni) ali
- psihogeni.

Pri mnogih ženskah, ki odlagajo prvo nosečnost v kasno reproduktivno obdobje, je ena od možnosti zdravljenja neplodnosti tudi uvedba postopkov oploditve z biomedicinsko pomočjo oz. umetno oploditvijo (OBMP). Dolgotrajni diagnostični postopki in poskusi zdravljenja, če so neuspešni, še dodatno zmanjšujejo možnost uspešne nosečnosti, zlasti če je zdravljenje ekspektativno. Tudi v postopkih OBMP je očiten padec uspešnosti z naraščujočo starostjo ženske, hkrati pa ugotavljajo tudi pomemben porast spontanih splavov. Večja starost ženske je neposredno povezana tudi z večjim številom kromosomskih nepravilnosti, ki jih najdemo v 50% spontanich splavov v prvem trimesečju nosečnosti; večina teh so avtosomne trisomije. [3]

Umetna osemenitev (IUI) predstavlja vmesno stopnjo pred uvedbo bolj zapletenih postopkov, kot sta zunajtelesna oploditev (IVF) in intracitoplazemski vnos semenčic (ICSI). Tuji podatki kažejo, da je pri IUI velika razlika v uspešnosti pri ženskah, mlajših od 39 let (21% nosečnosti), kot pri starejših (14% nosečnosti kar 73% spontanich splavov). [3]

Na splošno velja, da je IUI uporabna in učinkovita terapevtska možnost za različne oblike neplodnosti. Ker pa je starost ženske dejavnik, ki bistveno vpliva na izid zdravljenja, je pomembno, da postopkov ne ponavljajo več kot dva do trikrat. Takoj po neuspešnem postopku IUI morajo ženski svetovati uvedbo postopka IVF. Tudi pri IVF-ET (in vitro fertilization and embryo transfer – in vitro oploditev in prenos zarodka) postopku so rezultati zdravljenja slabši pri starejših ženskah. Njihovi rezultati kažejo, da je komulativna stopnja nosečnosti pri ženskah starejših od 38 let, le 16% , v 21% pride do spontanega splava. [3]

Pri moških vzrokih neplodnosti je učinkovita metoda zdravljenja neplodnosti ICSI (intracitoplasmic sperm injection – intracitoplazmično injiciranje sperme), vendar le pri mlajših ženskah; pri starejših od 38 let rezultati niso spodbudni. [3]

Očitno je, da gre pri starejših ženskah za značilno manjšo možnost uspešnega zdravljenja neplodnosti z metodami IVF-ET in ICSI. Ob tem, da gre pri starejših ženskah pogosto za slaboten odziv na ovarijsko stimulacijo in da je število prekinjenih ciklov stimulacije veliko, pa ima pomembno vlogo tudi kakovost jajčnih celic. Kljub uporabi posebnih stimulacijskih protokolov in mikromanipulacije na območju zone ovojnice jajčne celice, se kakovost jajčnih celic ne more izboljšati. Zato je izjemno pomembno, da starejše ženske, ki začnajo zdravljenje neplodnosti s postopki OBMP, pravilno in pravočasno obveščajo o slabih rezultatih in v povezavi s tem o visokih stroških zdravljenja. [3]

## 1.6. HORMONI

Hormoni so snovi v organizmu, ki jih izločajo nekatere žleze. Od hormonov so odvisne posamezne naravne funkcije delovanja organizma. Izločajo se neposredno v kri in se z njo prenašajo po celem telesu, kjer vplivajo na različne organe. Hormoni so prenašalci informacij med organi oziroma med tkivi v organizmu. Izjema so tako imenovani tkivni hormoni, ki se sintetizirajo na mestu, kjer tudi učinkujejo. Slednjih ne izločajo žleze, pač pa nastanejo v dotičnem tkivu. Hormone so odkrili v zgodnjih letih 20. stoletja. Delujejo le na določene ciljne organe, kjer se vežejo na specifične receptorje. Receptorji se običajno nahajajo na zunanji strani celične membrane. Vezava molekule hormona na receptor povzroči v celici biokemično reakcijo. Nekateri hormoni, ki so dovolj lipofilni, pa lahko prehajajo skozi celične membrane (steroidni hormoni) in delujejo neposredno na celično jedro. [11]

Da lahko hormon povzroči učinek na tarčni celici, mora biti sposoben vplivati na aktivnost teh celic v ciljnim tkivu. Hormoni dosežejo učinek preko receptorjev. Receptorji so ključavnice, katere odklepa točno določen ključ (hormon). Hormon lahko kroži prosto po obtoku (in hitro izgine iz cirkulacije) ali pa se veže na proteine, in tako dalj časa ostane v cirkulaciji. [10]

## 1.7. ANTI - MÜLLERJEV HORMON

V zadnjem desetletju se kot napovednik ovarijske rezerve uveljavlja anti-Müllerjev hormon (AMH). [2]

Ovarijska rezerva je izraz, ki ga uporabljamo za določanje kapacitete jajčec v jajniku. To so jajčeca sposobna oploditve in zdrave ter uspešne nosečnost. Določanje ovarijske rezerve je pomembna pri zdravljenju neplodnosti. [13]

Med najzanesljivejše kazalce delovanja jajčnikov je doslej sodilo določanje koncentracije folikle stimulirajočega hormona (FSH), čigar slabost je nihanje iz fizioloških v bolezenska območja tudi nekaj let pred dokončnim izčrpanjem ovarijske rezerve. V zadnjem desetletju se kot napovednik ovarijske rezerve uveljavlja anti-Müllerjev hormon (AMH). [14] Visok nivo anti-Müllerjevega hormona je lahko prisoten tudi pri ženskah s policističnim ovarijskim sindromom, ki ogroža žensko plodnost. Zato je verjetno kombinacija AMH in transvaginalnega ultrazvoka za štetje števila antralnih foliklov najboljši način za napoved ovarijske rezerve in plodnosti. Ta kombinacija se včasih imenuje test človeške biološke ure. [13, 26]

AMH ni le označevalec populacije majhnih antralnih foliklov, temveč tudi napovednik kakovosti oocitov. Pri moških se je določanje AMH uveljavilo le pri diagnostiki interseksualnih stanj zaradi abnormne diferenciacije testisa, pri ženskah pa je v ospredju kot najbolj zanesljiv kazalec ovarijske rezerve pri prezgodnji menopavzi in čezmerne rezerve majhnih antralnih foliklov pri ženskah s policističnimi jajčniki. [14]

### 1.7.1. ANTI - MÜLLERJEV HORMON FIZIOLOGIJA

AMH se imenuje po Johanessu Petru Müllerju (1801–1858), ki je bil znamenit nemški fiziolog in anatom in je med prvimi raziskal sistem vodov sečil, ki se po njem imenujejo Müllerjevi vodi, iz katerih se razvijejo notranji spolni organi pri ženski. [17]

Pri sesalcih v embrionalnem razvoju AMH izločajo Sertolijeve celice testisa in preprečujejo razvoj Müllerjevih vodov v maternico in ostale Müllerjeve strukture (jajcevod, zgornja tretjina vagine). Efekt je ipsilateralen (ne na isti strani), to je da vsak testis zavre razvoj Müllerjevih vodov na svoji strani. [12]

AMH se začne sproščati v 8. tednu embrionalnega razvoja in uravnava razvoj notranjih spolnih organov. Najbolj značilen učinek AMH, ki poteka prek receptorjev AMH tipa II, je programirana celična smrt (apoptoza) na tarčnih tkivih (fetalni Müllerjevi vodi pri zarodku moškega spola). [14, 26]

Pri moških se AMH lahko določa v krvi v otroštvu in v odrasli dobi, pri ženski pa ga ne zaznamo do pubertete. [12] Nastaja v granuloznih celicah jajčnika in uravnava razvoj do primarnih foliklov z inhibicijskim delovanjem na izločanje FSH. Vrednosti se s staranjem zmanjšujejo in postanejo v predmenopavznem obdobju nemerljive. [14]

AMH je pri moških visok skozi otroštvo in prične padati med puberteto ter se niža vso odraslo dobo. Sprememba koncentracij AMH nastopi v puberteti pri obeh spolih, pri moških se niža, pri ženskah se viša. [12]

Odkrili so, da se funkcionalni AMH receptorji izražajo na možganskih nevronih embrijev miši. Znanstveniki so mnenja, da igra vlogo pri spolnem dimorfičnem možganskem razvoju in posledično pri razvoju spolno specifičnega obnašanja. [12]

## 1.7.2. ANTI-MÜLLERJEV HORMON – OZNAČEVALEC KAKOVOSTI GAMETOGENEZE

V reproduktivnem obdobju je koncentracija AMH povezana s številom majhnih antralnih foliklov ( $\leq 12$  mm), ni pa povezana s številom večjih antralnih foliklov ( $> 12$  mm), kar so dokazali v ciklikih nadzorovane ovarijske hiperstimulacije. Nizke vrednosti AMH pomenijo majhno količino malih antralnih foliklov, kar predstavlja manjšo ovarijsko rezervo. AMH ni odvisen od ravni FSH, saj se v fiziološki nosečnosti, ko so vrednosti FSH znižane, koncentracija AMH ne spremeni in ostane stalna. To pomeni, da je AMH gonadotropinsko neodvisen in odslkava le velikost populacije foliklov. V normalnem menstruacijskem ciklusu so vrednosti AMH stalne od 2. do 6. dneva ciklusa, v stimuliranih ciklikih pa se vrednosti AMH napredujoče znižujejo do pozne folikularne faze. Zmanjšanje vrednosti AMH v času nadzorovane stimulacije jajčnikov lahko razložimo z rastjo manjših foliklov, v katerih pride do diferenciacije granuloznih celic, s tem pa tudi do zmanjšane možnosti tvorbe AMH. Koncentracija serumskega AMH je nedvomno povezana s številom antralnih foliklov, zrcali pa tudi kakovost oocitov, saj so v raziskavi, v kateri so primerjali kakovost oocitov pri ženskah z normalnimi in zmanjšanimi vrednostmi AMH, našli razlike med obema skupinama. Ugotovili so povezavo med nizkimi vrednostmi AMH, slabšo kakovostjo oocitov in agregacijo gladkega endoplazemskega retikuluma, medtem ko bazalne vrednosti FSH niso ustrezno napovedale kakovosti gamet.

Zaključujejo, da je določanje AMH bolj zanesljiv napovedni dejavnik glede števila in kakovosti oocitov kot bazalne vrednosti FSH. Pri zarodku moškega spola AMH, ki ga izločajo Sertolijeve celice, povzroča regresijo Müllerjevih vodov. Pri odraslem moškem vloga AMH še ni povsem pojasnjena, vendar so v eni od raziskav ugotovili, da je koncentracija AMH v semenski tekočini zelo pomemben neinvazivni označevalec vztrajajoče hipospermatogeneze pri neobstruktivni azoospermiji, kar napoveduje tudi stopnjo uspešnosti pridobivanja testikularnih spermatozoev pred uvedbo postopka intracitoplazemske injekcije spermijev v oocite.

AMH se je izkazal tudi kot kazalec števila Sertolijevih celic in njihovega delovanja pri moških z nespuščenimi testisi. Pri teh je AMH negativno povezan s FSH in pozitivno z volumnom testisa in s koncentracijo semenčic. Nizke vrednosti AMH so ugotovili tudi pri interseksualnih stanjih zaradi abnormne diferenciacije testisa (čista in delna gonadna



disgenezija). Določanje AMH je zato pomemben diagnostični pripomoček za ugotavljanje dejavnosti Sertolijevih celic pri otrocih z interseksualnim stanjem, ker omogoča ločevanje med motnjami spolne diferenciacije zaradi abnormne determinacije testisa in motnjami, ki so zgolj posledica izolirane motnje v izločanju ali v delovanju testosterona.

AMH in FSH nista napovednika dejavnosti Leydigovih celic in tvorbe testosterona, kar so ugotovili v raziskavi, v kateri niso našli povezanosti med hipogonadizmom pri moških, ki so pri zdravljenju karcinoma prejeli gonadotoksična sredstva. [14]

AMH je bil sintetiziran. Njegova sposobnost, da zavira rast tkiva, ki izhajajo iz Müllerjevih vodov, je dvignila upanje za uporabnost pri zdravljenju različnih zdravstvenih stanj, vključno z endometriozo, adenomiozo in materničnim rakom. Raziskave potekajo v različnih laboratorijih. [12]

Določanje AMH je uporabno tudi pri ocenjevanju plodnosti, ovarijske rezerve, da lahko svetujejo ženskam, naj razmislijo o zmrznitvi jajčec ali pa naj se odločijo o čim prejšnji nosečnosti, če je njihova dolgoročna ocena plodnosti slaba.

Merjenje AMH je lahko tudi zavajajoče, saj se visoke ravni pojavljajo v pogojih, kot je sindrom policističnih jajčnikov, zato je potrebno vrednosti AMH upoštevati v povezavi z ocenitvijo jajčnikov s transvaginalnim ultrazvokom in štetjem antralnih foliklov.

Prav tako ima potencial za racionalizacijo programa za spodbujanje ovulacije in odločitve o številu zarodkov za prenos v postopkih asistirane reprodukcije za povečanje uspešnosti pri nosečnosti, medtem ko zmanjšuje tveganje za sindrom hiperstimulacije jajčnikov (OHSS). [12]

## 1.8 METODE ZA DOLOČANJE ANTI-MÜLLERJEVEGA HORMONA

AMH določamo s tehniko ELISA, ki spada med imunološke metode. Trenutno sta v uporabi dva komercialna, ultra občutljiva imunska testa, AMH Beckman Coulter ELISA in AMH Diagnostic System laboratories (DSL) ELISA. [25]

### 1.8.1. IMUNOLOŠKE METODE

Imunološke metode so omogočile bistveno izboljšavo pri določanju hormonov in s tem odprle nove možnosti v endokrinologiji. Od prvih začetkov pri merjenju insulina so se z izboljšanjem priprave specifičnih protiteles, z uvedbo preproste tehnike za jodiranje molekul z I-125 in s tehnološkimi izboljšavami analitskega postopka, imunološke metode razširile na določanje vseh biološko pomembnih snovi, ki so v zelo majhnih koncentracijah. [2]

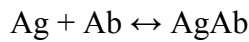
Vzporedno z radioimunskimi metodami so se razvijale alternativne analitske tehnike imunske tehnike. Temeljno načelo določanja snovi pri alternativnih imunskih tehnikah je enako kot pri radioimunskih metodah, razlika je v označenem antigenu (označenem hormonu) in v merilni tehniki. Od alternativnih imunskih tehnik so dandanes največ v rabi metode na podlagi encimov, fluorescence in kemiluminiscence. [2]

V primerjavi z analitskimi tehnikami imajo imunološke metode te prednosti:

- veliko občutljivost (občutljivost je opredeljena kot minimalna količina delujoče snovi, ki jo metoda še zazna),
- veliko specifičnost (specifičnost metode je opredeljena kot odsotnost križnih reakcij, ki jih povzročajo moteče snovi),
- natančnost (opredeljena kot razporeditev iz merjenih vrednosti okrog povprečne vrednosti), ki se lahko izrazi kot koeficient variacije,
- ponovljivost rezultatov določanja,
- preprostost izvedbe (izurjen laboratorijski delavec lahko v kratkem času opravi veliko število določitev),

- univerzalnost metode (z isto merilno opremo in delovnimi pripomočki lahko določamo širok spekter snovi). [2]

Imunske metode temeljijo na imunokemijski reakciji med antigenom in specifičnimi protitelesi proti temu antigenu:



Pri čemer pomeni Ag antigen (snov, ki jo določamo; haptenu ali v splošnem primeru ligand). Ag specifična protitelesa proti antigenu (ligandu, haptenu), AgAb imunski kompleks med antigenom in protitelesi. [2]

### 1.8.1.1. PROTITELESA IN ANTIGENI

Protitelesa, pravimo jim tudi imunoglobulini, so proteini, ki jih telo proizvede kot odziv na prisotnost tuje molekule antigena v telesu. Antigeni so po naravi lahko proteini, polisaharidi, nukleinske kisline, pa tudi manjše molekule (npr. penicilin). Za protitelesa je značilno, da se močno vežejo samo na tiste antigene, proti katerim so bila ustvarjena, se pravi, da je vezava strogo specifična. [15]

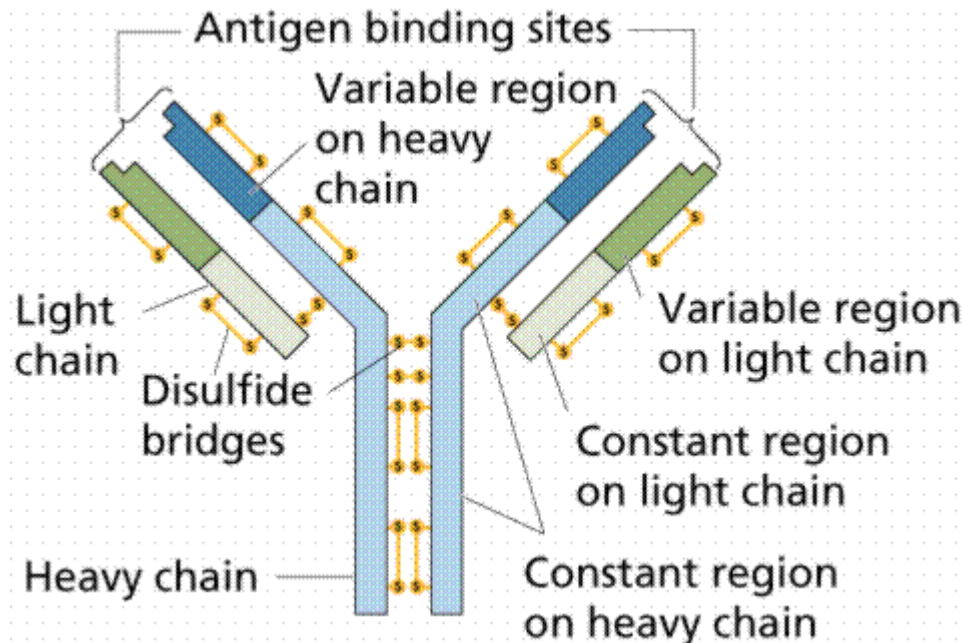
Protitelesa so glikoproteini, ki ščitijo organizem pred tujki, saj so se sposobni vezati na tujke, s tem pa preprečiti njihovo škodljivo delovanje. Tujke predstavljajo povzročitelji bolezni, nelastne beljakovine ali druge molekule, ki jih organizem prepozna kot potencialno nevarne. Imunoglobulini so prisotni tako na površini limfocitov B, kjer so receptorji za specifične antigene ali kot krožeča protitelesa v krvi ter limfni tekočini. [16]

Učinkujejo na več načinov:

- vežejo se na različne celice imunskega sistema,
- preprečujejo prehajanje virusov v celice,
- nevtralizirajo bakterijske toksine,
- aktivirajo komplement. [16]

Protitelesa se sintetizirajo v belih krvnih celicah imenovanih limfociti B. Osnovna monomerna molekula protitelesa je sestavljena iz štirih polipeptidov, in sicer iz dveh

identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig. Te so med seboj povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi in razporejene v obliki črke Y. [17]



Slika1 : Protitelo [18]

Poznamo 2 tipa lahkih ( $\lambda, \kappa$ ) in 5 tipov težkih verih ( $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma$  in  $\mu$ ). Glede na tip težke verige razvrstimo imunoglobuline v 5 razredov:

- IgG z verigo  $\gamma$ ,
- IgM z verigo  $\mu$ ,
- IgA z verigo  $\alpha$ ,
- IgD z verigo  $\delta$ ,
- IgE z verigo  $\epsilon$ .

Na vsaki verigi ločimo konstantni in variabilni del. Variabilni del sestavlja približno 110 aminokislin, nahaja se na koncu vsake lahke in težke verige ter predstavlja vezišče za antigen. Tu je aminokislinsko zaporedje najbolj spremenljivo in zaradi svoje raznolikosti omogoča imunskemu sistemu sintezo protiteles za katerikoli antigen, s tem pa specifično vezavo protitelesa samo na določen antigen. Poleg variabilnega dela ima vsaka veriga še konstantni del, ki se razlikuje pri različnih razredih protiteles. [17]

Osnovno molekulo protitelesa je s papinom mogoče razcepiti v tri približno enake fragmente. Dva od teh sta identična (Fab Fragmenta) in predstavljata vezišče za antigen, saj se v tem delu nahaja variabilni del. Tretji fragment, imenovan Fc, se ne more vezati z antigenom, ima pa efektorske funkcije, ki so značilne za posamezen razred protiteles. [17]

Antigeni so vse tiste snovi, ki reagirajo z določenimi protitelesi. Imunogeni so snovi, ki povzročijo pri ljudeh in živalih nastanek specifičnih protiteles. Hapteni lahko delujejo kot antigeni pri reakciji z določenimi protitelesi, kot imunogeni pa učinkujejo hapteni le, če so priključeni na veliko beljakovinsko molekulo (po navadi na serumske beljakovine). [2]

Antigene kot čiste snovi uporabljamo pri imunskih metodah v trojnem namenu:

- za pripravo standardnih koncentracij, s katerimi moremo ugotoviti umeritveno krivuljo,
- za pripravo označenega antigena,
- za pripravo specifičnega antiseruma proti določenemu antigenu.

V te namene so potrebne snovi z visoko stopnjo čistosti, ker vsake druge primesi lahko povzročajo stranske reakcije s protitelesi. [2]

Protitelesa se z antigeni vežejo preko različnih nekovalentnih vezi (vodikove, elektrostatske, Van der Waalsove in hidrofobne interakcije). Vezišče antigena imenujemo epitop, vezišče protitelesa pa paratop. Jakost vezave enega epitopa s pripadajočim paratopom imenujemo afiniteta. Osnovna monomerna enota protiteles (2 lahki in 2 težki verigi) ima dve enaki vezišči, zato se lahko protitelo hkrati veže na dve antigenski determinanti. Jakost vseh vezi med protitelesom in antigenom pa opredeljuje pojem avidnost. Paratopi prepoznajo celotno trodimenzionalno strukturo epitipov in razlikujejo že manjše spremembe aminokislinskega zaporedja antigenov, naboja, optične konfiguracije in sterične konformacije. Zaradi tega se protitelesa vežejo le na tiste antigene, s katerimi se najbolj skladajo, kar je bistven razlog za visoko specifičnost protiteles. [16]

Večje molekule, npr. proteini, imajo več epitopov. Vse molekule protiteles, sintetizirane v eni celici, imajo enako aminokislinsko zaporedje in se vežejo na isti epitop antigena. V organizmu, ki je prišel v stik z antigenom z več epitopi, nastane veliko limfocitov, ki izločajo protitelesa proti različnim epitopom; imenujemo jih poliklonska protitelesa. S posebnimi

tehnikami lahko limfocite immortaliziramo, t.j. napravimo nesmrtno, jih gojimo v kulturi, in s posebnim postopkom dobimo kulturo popolnoma enakih limfocitov, ki nastanejo z delitvijo ene same celice (kloni). Ti seveda izločajo enaka protitelesa, proti istemu epitopu, in jih imenujemo monoklonska protitelesa. [15]

Protitelesa pridobivajo z imunizacijo poskusnih živali z imunogeni. Večji titri antiseruma nastanejo s serijskimi imunizacijami živali. Protitelesa, ki tako nastanejo, so poliklonalna. To pomeni, da antiserum sestavlja več populacij protiteles iz različnih imunoglobulinov in z različnimi afinitetami do antigenov. [2]

Nespecifičnost protiteles povzročajo snovi, ki dajo križne reakcije s protitelesi. To pomeni, da kemijsko sorodne snovi lahko tudi reagirajo s protitelesi. [2]

V novejšem času se v analitskih imunskih tehnikah čedalje bolj uporabljajo monoklonska protitelesa. Monoklonska protitelesa pridobivajo z imunizacijo poskusnih živali z antigeni in z in vitro hibridizacijo celic. Monoklonska protitelesa imajo iste afinitetne lastnosti do antigena in so mnogo bolj specifična kot poliklonalna protitelesa. [2]

Protitelesa lahko s pridom uporabljamo za določanje položaja določenih biomolekul znotraj celice. Pri fluorescenčni mikroskopiji uporabljamo protitelesa, na katere je kovalentno vezano fluorescenčno barvilo. Na protitelesa lahko vežemo tudi markerje z večjo elektronsko gostoto, npr. kovinske atome (pogosto se uporablja zlato). Tovrstna metoda je npr. imunoelektronska mikroskopija. [15]

V diagnostične namene se pogosto uporablja t.i. metoda ELISA, ki se odlikuje po svoji hitrosti ter visoki občutljivosti (detektiramo lahko zelo majhne koncentracije antigena, celo pod 1 ng). Metoda je uporabna za večje molekule, ki imajo vsaj dva epitopa, ki se ne prekrivata. Uporabljajo se različne izvedbe.

[15]

## 1.8.2. ELISA ( ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

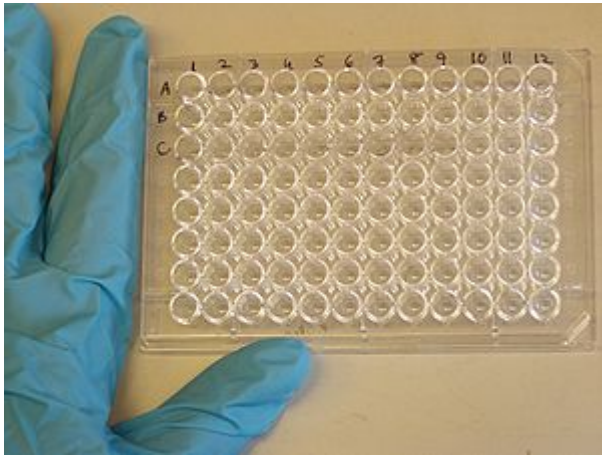
Encimskoimunski test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) je daleč najpogostejša metoda za določanje prisotnosti bodisi specifičnih protiteles bodisi antigenov v testiranih vzorcih, saj lahko naenkrat testiramo veliko število vzorcev na kvalitativen ali kvantitativen način. Temelji na specifični interakciji antigen – protitelo.

Kadar v vzorcu določamo specifična protitelesa, uporabimo posredni (indirektni) test ELISA, kadar pa določamo prisotnost antigena v nekem vzorcu, uporabimo sendvič test ELISA. Če pa so specifična primarna protitelesa že konjugirana z encimom za detekcijo, govorimo o neposrednem (direktnem) testu ELISA. [20]

Osnova imunskih testov na trdnem nosilcu je reakcija med antigenom in protitelesi. Značilnost teh testov je, da vključujejo standardne pripravke, ki omogočajo kvantitativno vrednotenje na osnovi umeritvene krivulje. Glede na označbo imunskih kompleksov (z radioaktivnim, encimskim ali fluorokromnim označevalcem) jih delimo v podskupine. Najbolj znana sta radioimunski in encimsko imunski test. [17]

Encimskoimunski test, encimski imunski test ali ELISA, je biokemijska metoda, ki se uporablja v imunologiji za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Za določanje protiteles se uporablja indirektna ELISA. Direktna ali sendvič ELISA pa je prirejena za določanje antigenov. Pri obeh načinih ELISE je na zadnje dodano protitelo vezan encim (od tu izhaja ime metode), ki omogoči spremembo barve substrata in tako detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. Ker jo lahko uporabljamo za detekcijo tako protiteles, kot tudi antigenov v vzorcu, je primerna za določanje protiteles na različne viruse (HIV test) ali za določanje prisotnosti antigenov v serumu. Uporablja se jo tudi v živilski industriji, za dokazovanje prisotnosti alergenov, kot so mleko, arašidi, orehi ali jajca. [19]

Princip metode je, da encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt, katerega intenziteto lahko merimo. Pri direktni tehniki je že primarno protitelo konjugirano z encimom, pri indirektni tehniki pa je encim konjugiran na sekundarno protitelo. [17]



Slika2 : Mikrotitrna ploščica [19]

### 1.8.2.1 DIREKTNA (SENDVIČ) ELISA

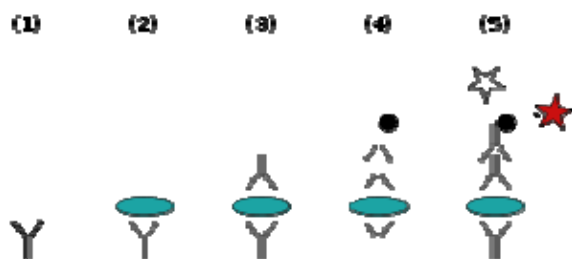
Pri sendvič testu ELISA največkrat uporabljamo dve različni monoklonski protitelesi razreda IgG, specifični za antigen, ki prepoznata dva različna epitopa – antigenski determinanti na antigenu. Prvo protitelo (lovilno) vežemo neposredno na mikroploščico, drugo (detekcijsko) protitelo pa uporabimo za določanje prisotnosti antigena v vzorcu. Detekcijsko protitelo je lahko neposredno encimsko označeno, lahko pa podobno kot pri indirektnem testu ELISA uporabimo še sekundarna encimsko označena protitelesa, ki specifično prepoznavajo detekcijsko protitelo. Označena protitelesa so lahko tudi poliklonska. [20]

Osnovni koraki:

1. Na trdni nosilec vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo. Z lovilnimi protitelesi prekrijemo dno vdolbinic.
2. Naneseemo vzorec, v katerem je množica različnih antigenov in preiskovan antigen.
3. Speremo nosilec, da odstranimo nevezane in šibko vezane antigene, tako da ostanejo na protitelo vezani le iskani antigeni.
4. Dodamo detekcijska protitelesa, specifična na vezan antigen, ki so konjugirana z encimom in so usmerjena proti drugemu epitopu antigena.
5. Speremo ploščo, da odstranimo nevezana protitelesa. Po spiranju ostane na antigen vezanih le določeno število detekcijskih konjugiranih protiteles.
6. Dodamo kromogen substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
7. Detektiramo intenzivnost barve. [16, 20]



Slika spodaj vsebuje še dodaten korak. Po vezavi preiskovanega antigena, dodamo detekcijsko protitelo. Šele nato dodamo z encimom označeno protitelo na detekcijsko protitelo. Takšna protitelesa se vežejo na Fc-regije drugih protiteles. Na ta način se izognemo zamudnemu postopku konjugacije protiteles z encimom za vsak posamezen antigen, ki ga želimo določiti. [16]



Slika3 : Direktna (sendvič) *ELISA*.

(1) Na površini plošče so vezana protitelesa; (2) dodamo vzorec in preiskovani antigen se veže na pritrjeno protitelo; (3) dodamo detekcijsko protitelo, ki se veže na vezan antigen; (4) dodamo encimsko označeno protitelo, ki se veže na detekcijsko protitelo ; (5) dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima spremeni barvo. [19]

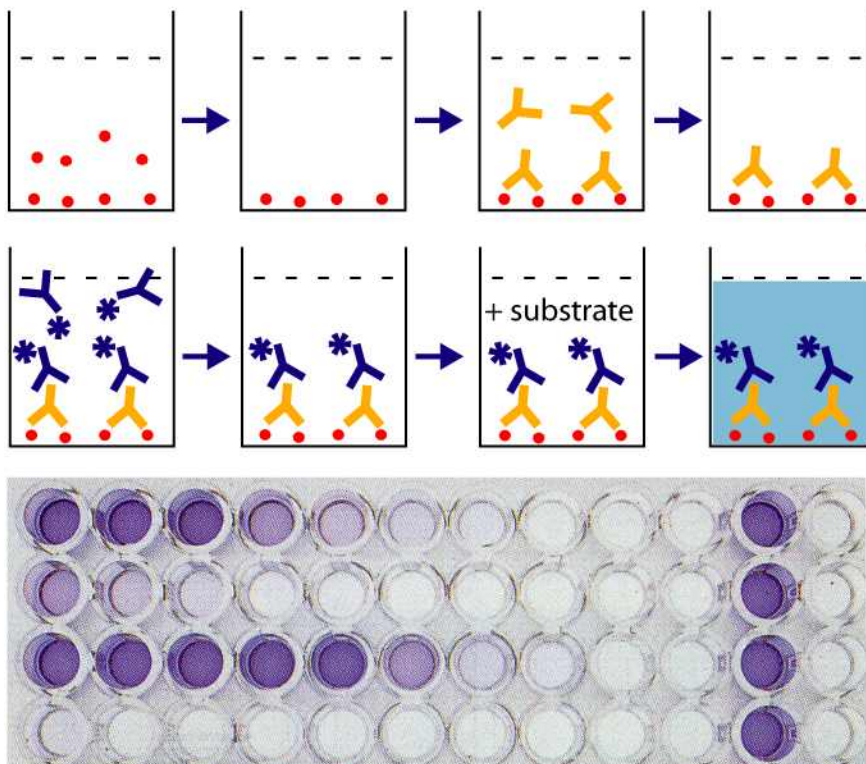
Obarvan produkt reakcije merimo v posebnem, v ta namen pripravljenem spektrofotometru za merjenje absorbanca v mikrotitrskih ploščah. Izmerjena absorbanca je sorazmerna s količino produkta, količino vezanih sekundarnih protiteles ter količino vezanih primarnih protiteles, katerih količino v vzorcu določamo. [17]

### 1.8.2.2. INDIREKTNA ELISA

Pri indirektnem testu ELISA luknjice mikroploščice prekrijemo z antigenom. V naslednji stopnji v luknjice nanese vzorce, s katerimi določamo prisotnost specifičnih protiteles. Na antigen vezana primarna protitelesa zaznamo oziroma dokazujemo z dodatkom sekundarnih, encimsko označenih protiteles, specifičnih za konstantno regijo primarnih protiteles. Ob dodatku encimskega substrata se razvije barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično. [20]

Uporablja se za detekcijo specifičnih protiteles v vzorcu. Osnovni koraki so:

1. Na trdni nosilec vežemo znan antigen in z njim prekrijemo dno vdolbinic.
2. Dodamo vzorec s preiskovanimi protitelesi, ki so po navadi raztopljeni v serumu druge živalske vrste, da se izognemo vezavi drugih nespecifičnih protiteles. Vzorec je množica protiteles z različnimi specifičnostmi.
3. Po spiranju nevezanih in šibko vezanih protiteles ostanejo na antigen vezana le iskana specifična protitelesa.
4. Naneseemo sekundarna, z encimom konjugirana protitelesa, usmerjena proti Fc regiji primarnih protiteles.
5. Speremo nevezana označena protitelesa. Na primarna protitelesa ostane vezano le določeno število sekundarnih konjugiranih protiteles.
6. Dodamo kromogen substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
7. Detektiramo barvo. [16, 20]



Slika 4 : Indirektna ELISA [24]

## 2. NAMEN DELA

Anti-Müllerjev hormon je hormon, ki ga določamo za ugotavljanje ovarijske rezerve in zamenjuje dosedaj klasične določitve foliklestimulirajočega hormona. Merjenje AMH je lahko uporabno kot pomoč pri določanju ovarijske rezerve in pri napovedi izida pri oploditvi z biomedicinsko tehnologijo. Raven AMH lahko uporabimo za oceno stopnje menopavze.

ELISA testi so encimskoimunski testi, ki se uporabljajo na principu detekcije protiteles ali antigenov v vzorcu. Pri ELISA testu se na zadnje dodano protitelo veže encim, ki omogoči spremembo barve substrata in posledično tudi detekcijo protitelesa ali antigena, ki ga iščemo.

V okviru naloge bomo med seboj primerjali dve imunokemijski metodi ELISA Beckman Coulter in ELISA DSL. Ugotovili bomo katera metoda daje boljše rezultate in je prijaznejša za uporabo v kliničnih laboratorijih. Analizirali bomo vzorce, da ugotovimo katera metoda je bolj uporabna za analitiko, le-to bomo primerjali na skupini 46 pacientk in s statističnimi metodami ugotovili kakšna je primerljivost rezultatov.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL – MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRINCIP TESTA ELISA IVD BECKMAN COULTER IN NAMEN UPORABE

To je dvo stopenjski encimsko imunski test, sendvič test za določanje AMH. V prvi stopnji se AMH ujamejo na monoklonska protitelesa, ki so pritrjena na dnu mikrotitrne ploščice. V drugi stopnji so dodana monoklonska protitelesa z vezanim biotinom, skupaj s streptavidin peroksidazo. Protitelo z biotinom se veže na trdno fazo antigen-protitelo kompleks in v zameno se veže s konjugatom. Po inkubaciji speremo ploščo, antigen kompleks, ki ostane vezan na nosilec, pa določamo z dodatkom kromogenega substrata. Intenziteta obarvanja vzorca je proporcionalna koncentraciji AMH v kalibratorju. [22]

##### 3.1.1 ZBIRANJE VZORCA, PROCESIRANJE, REDČENJE IN SHRAMBA

- Kri zbiramo v suhe epruvetke, v epruvetke z gelom za ločevanje ali v epruvetke, ki vsebuje heparin-litij ali EDTA.
- Serum oziroma plazmo ločimo od celic s centrifugiranjem.
- Če je potrebno redčimo vzorec.
- Serum ali plazma je lahko shranjena pri 2 do 8 °C, če bo test izveden v 24 urah. Za daljše shranjevanje mora biti vzorec zmrznjen pri manj kot -18°C. [22]

##### 3.1.2. MATERIAL

- Anti-AMH protitelesa vezana na ploščo: 12x8 vdolbinic

Neporabljene vdolbinice lahko shranimo pri 2 do 8°C v dobro zaprti vrečki, do datuma uporabe.

- Reakcijski pufer AMH: 12 mL stekleničke

Pufer je stabilen pri 2 do 8 °C do datuma uporabe.

- Monoklonska protitelesa označena z biotinom: ena steklenička (liofilizirana)

Steklenička vsebuje liofilizirana monoklonska protitelesa označena z biotinom v prisotnosti govejega serumskega albumina. Rekonstitucija konjugata s predpisanim volumnom destilirane vode. Po rekonstituciji je konjugat stabilen en teden pri 2 do 8°C ali pri temperaturi pod -18°C, do datuma uporabe.

- AMH kalibrator (10x): ena steklenička (liofiliziran)

Steklenička vsebuje liofiliziran AMH v prisotnosti govejega serumskega albumina.

Rekonstitucija kalibratorja poteka s predpisanim volumnom destilirane vode za pripravo 1500 pM raztopino AMH. Po rekonstituciji je kalibrator stabilen en teden pri 2 do 8°C ali pri temperaturi pod -18°C, do datuma uporabe. ( 1µg/L ustreza 7.14pM).

- Kalibrator 0 AMH: ena 4 mL steklenička

Steklenička vsebuje humani serum. Kalibrator 0 je stabilen pri 2 do 8°C, do datuma uporabe.

- Spiralna tekočina (20x): Ena steklenička po 50 mL

Koncentrirana raztopina mora biti razredčena pred uporabo. Razredčimo 50 mL v 950 mL destilirane vode. Stabilnost po razredčitvi: en mesec pri 2 do 8 °C ali pri temperaturi pod -18°C, do datuma uporabe.

- Streptavidin-HRP konjugat: ena 12mL steklenička

Steklenička vsebuje streptavidin in goveji serumski albumin. Reagent je stabilen pri 2 do 8°C do datuma uporabe na kompletu.

- Substrat: ena 12 mL steklenička

Substrat je stabilen pri 2 do 8 °C do datuma uporabe.

- Stop raztopina: ena 6 mL steklenička

Stop raztopina je 2N žveplena kislina. Pri tej koncentraciji je uvrščena kot dražilna. Raztopina je stabilna pri 2 do 8 °C do datuma uporabe.

### 3.1.3 MATERIAL, KI JE POTREBEN, NI PA PRILOŽEN

Poleg standardne laboratorijske opreme je potrebna še naslednja:

- Natančne mikropipete (20-200, 200-1000µL)
- Ponovljive mikropipete (50, 100µL)
- Stresalec mikrotitrskе ploščice
- Čitalec mikrotitrskе ploščice (450 nm)

### 3.1.4 PROCEDURA TESTA

Vse reagente segrejemo na sobno temperaturo in izvedemo naslednji postopek:

- Razredčimo 50 mL spiralne raztopine (20x) z 950 mL destilirane vode.
- Raztopimo monoklonska protitelesa z biotinom s predpisanim volumnom destilirane vode.
- Raztopimo koncentriran kalibrator s predpisanim volumnom destilirane vode.
- Pripravimo sveže razredčitve kalibratorjev od 1500 pM do 0 pM, v plastičnih epruvetah za vsako serijo, pred vsakim testom. Serije razredčin ne smemo shranjevati. [22]

#### 3.1.4.1 Potek testa

Preglednica 1: Potek testa [22]

KORAK 1	KORAK 2	KORAK 3
Dodamo 25 $\mu$ L kalibratorja ali vzorca in 100 $\mu$ L reakcijskega pufra v vdolbinico.	Dodamo 50 $\mu$ L protiteles z biotinom in 50 $\mu$ L streptavidin-HRP	Dodamo 100 $\mu$ L substrata
Inkubiramo 2 uri pri 18 do 25°C s tresenjem	Inkubiramo 30 minut pri 18 do 25 °C s tresenjem	Inkubiramo 30 minut pri 18 do 25°C s tresenjem
Spiranje plošče	Spiranje plošče	Dodamo 50 $\mu$ L stop raztopine in analiziramo ploščo pri 450 nm

- Spiranje plošče  
Ta korak je nujno potreben za ločitev vezane in proste frakcije.
- Analizator ima v naprej vnešen program za izvedbo testa in izračun rezultatov.

### 3.1.5 REZULTATI

Rezultati so pridobljeni iz standardne krivulje z interpolacijo. Krivulja služi za določitev koncentracije AMH v vzorcih, ki so bili izmerjeni istočasno kot kalibrator. [22]

#### 3.1.5.1 Standardna krivulja

Z uporabo pripravljenih kalibratorjev smo dobili naslednje odčitke absorbanc in sipanje rezultatov (glede na dvojnik)

Preglednica 2: Odčitki absorbanc in koeficienti variacije oziroma sipanje rezultatov [22]

KALIBRATOR AMH (pM)	ABSORBANCA (mOD)	CV(%)
150	2.252	0.1
81	1.129	1.1
27	0.412	3.1
9	0.155	1.4
3	0.073	3.1
0	0.033	8

### 3.1.6 PRIČAKOVANE VREDNOSTI

Proizvajalec reagenta Beckman Coulter je na osnovi študije priporočil okvirne vrednosti za zdrave ženske, pod 38 let in z normalnim folikularnim statusom, na 3. dan menstruacije.

Vrednosti so podane v tabeli. Priporočljivo je, da vsak laboratorij vzpostavi svoje referenčne vrednosti. [22]

Preglednica 3: Pripočene vrednosti za ELISA Beckman Coulter[22]

ŠTEVILO SUBJEKTOV	SREDNJA VREDNOST	OBMOČJE (10 do 90 percentilne)
335	4.0 µg/L	2.0 – 6.0 µg/L
	28.56 pM	14.28 – 48.55 pM

Koncentracije AMH se ne spreminjajo skozi menstruacijski cikel in se zmanjšujejo z leti. [22]

### 3.1.7. KONTROLA KVALITETE

- Analitična občutljivost je definirana kot najnižja koncentracija AMH, signifikantno različna kot ničelni kalibrator. Občutljivost je 1 pM ali 14 ng/mL. [22]
- Ta imunski test je specifičen za AMH. Nemerljiva navzkrižna aktivnost v vzorcih, ki vsebuje 150000 pM TGF  $\beta$ -1. [22]

- Ponovljivost v seriji in izven serije ni bila navedena v navodilih proizvajalca.

- Intra - test

Vzorci so bili testirani 12-krat v isti seriji. Koeficienti variacije so enaki ali manjši od 12.3%

- Inter – test

Vzorci so bili testirani v duplikatih, v 11 različnih serijah. Koeficienti variacije so enaki ali manjši od 14.2%. [22]

- Linearnost in pridobitek dodatka nista bila navedena v navodilih proizvajalca.

- Test redčenja

Vzorci visoke koncentracije so bili serijsko razredčeni 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16. Povprečen procent izkoristka za posamezen vzorec je bil med 90 in 100 %. [22]

- Preizkus izkoristka

Vzorcem z nizko koncentracijo vzorca smo dodali znano količino AMH. Pridobljen procent izkoristka je bil med 91.4 in 108.2%. [22]

- Merilno območje (od analitične občutljivosti do najvišjega kalibratorja) metode je od 1 pM do 150 pM ali 0.14  $\mu$ g/L do 21  $\mu$ g/L. [22]
- Pozornost je potrebno posvetiti hemoliziranim vzorcem, katerih ne moremo testirati. Za teste uporabljamo protitelesa in zato obstaja možnost za interferenco s heterofilnimi protitelesi v pacientovem vzorcu. Pacienti, ki so bili redno izpostavljeni živalim ali so



prejemali imunoterapijo ali diagnostične postopke z uporabo imunoglobulinov ali imunoglobulinskih fragmentov, lahko izločajo protitelesa, na primer HEMA, ki lahko motijo imunske teste. Ta moteča protitelesa lahko povzročajo napačne rezultate. Skrbno ovrednotimo rezultate pri pacientih, pri katerih sumimo, da imajo ta protitelesa. [22]

## 3.2 PRINCIP TESTA ELISA DSL IN NAMEN UPORABE

ELISA AMH je encimsko ojačani dvostopenjski imunski test. Standarde, kontrole in vzorce inkubiramo v mikrotitrski vdolbinici, ki so obložene z anti-AMH protitelesi. Po inkubaciji in spiranju dodamo v vsako vdolbinico detekcijske anti-AMH označene z biotinom. Po drugi inkubaciji in spiranju dodamo streptavidin hrenovo peroksidazo (HRP). Po tretji inkubaciji in spiranju, dodamo v vsako vdolbinico substrat tetrametilbenzidin (TMB). Nazadnje dodamo kislino za ustavitev. Stopnjo encimskega postopka substrata določimo z merjenjem absorbance na dveh valovnih dolžinah, pri 450 nm in med 600 in 630 nm. Izmerjena absorbanca je direktno sorazmerna koncentraciji AMH v vzorcih. Set AMH standardov uporabimo za zapis standardne krivulje absorbance v primerjavi s koncentracijo AMH. Koncentracijo AMH v vzorcih lahko nato izračunamo iz standardne krivulje. [21]

### 3.2.1 ZBIRKA VZORCEV IN PRIPRAVA

- Priporočen vzorec je serum.
- Upoštevamo naslednja navodila za ravnanje, procesiranje in shrambo krvnih vzorcev:
  - pri zbiranju krvnih vzorcev upoštevamo rutinske previdnostne ukrepe za venepunkcijo,
  - serumske vzorce moram centrifugirati šele po tem, ko nastane krvni strdek,
  - epruvete morajo biti vedno zamašene,
  - v dveh urah po centrifugiranju moramo prenesti vsaj 500  $\mu$ L seruma v epruvetko za shranjevanje. Takoj tesno zamašimo,
  - tesno zamašene epruvete shranimo pri 2 do 8°C za največ 24 ur,
  - če se test ne bo opravil v 24. urah, ali bo odposlan, je treba vzorce zmrzniti pri najmanj -20°C.
- Pri pripravi vzorcev upoštevamo naslednja navodila:
  - pred analizo moramo zanesljivo odstraniti preostali fibrin in celične snovi,
  - za centrifugiranje sledimo navodilom proizvajalca epruvete za zbiranje vzorca,
- izogibati se moramo ponavljajočega zmrzovanja in tajanja vzorcev,
- pri testiranju se moramo izogibati liziranih in hemoliziranih vzorcev. [21]

### 3.2.2.MATERIAL

- Plošča s protitelesi (Ab plate) DSL-10-14410. Kos (stripholder) vsebuje 96 polistirenskih mikrotitrskih vdolbinic z anti-AMH IgG, ki so imobilizirani na notranjo steno vsake vdolbinice.
- AMH standard A/ razredčen vzorec DSL-10-14401  
Ena steklenička, 20 mL, označena z A, vsebuje 0 µg/L AMH v proteinskem pufru z manj kot 0.05% ProClin 300.
- AMH standard B – G DSL-10-14402, DSL-10-14403, DSL-10-14404, DSL-10-14405, DSL-10-14406, DSL-10-14407  
Šest stekleničk, 0.5 mL vsaka, označene z B – G, ki vsebujejo koncentracije približno 0.05, 0.10, 0.25, 1.8, 7.5 in 15 µg/L AMH v proteinskem pufru z manj kot 0.05% ProClin 300.
- AMH kontole: DSL-10-14451, DSL-10-14452  
Dve steklenički, 0.5% vsaka, označene z Level I in II, ki vsebujejo nizke in visoke koncentracije AMH v proteinskem pufru z manj kot 0.05% ProClin 300.
- Konjugat AMH z biotinom: DSL-10-14420

Ena steklenička, 11 mL, vsebuje protitelesa AMH označena z biotinom, v proteinskem pufru z manj kot 0.05% ProClin 300.

- 4.6. Konjugat encim – streptavidin: DSL-10-14425

Ena steklenička, 11 mL, vsebuje streptavidin – hrenovo peroksidazo, v proteinskem pufru in v manj kot 10% metanola.

- 4.7. AMH testni pufer: DSL-10-14440

Ena steklenička, 11 mL, goveji serumski protein v proteinskem pufru z manj kot 0.05% ProClin 300.

- Tetrametilbenzidin (TMB) kromogena raztopina: DSL-10-9755

Ena steklenička, 11 mL, vsebuje raztopino tetrametilbenzidina v citratnem pufru, s hidrogen peroksidazo.

- Spiralna raztopina I: DSL-10-4030

Ena steklenička, 100 mL, vsebuje pufer z neionskim detergentom.

- Raztopina za ustavitev A: DSL-10-9780

Ena steklenička, 11 mL, vsebuje 0.2M žvepleno kislino. [21]

### 3.2.3. MATERIAL, KI JE POTREBEN, NI PA PRILOŽEN

- Čitalec mikrotitrne plošče, ki je sposoben meriti absorbanco pri 450 nm in da je sposoben popravka dvojne valovne dolžine med 600 in 630 nm.
- Deionizirana voda
- Precizna pipeta za 20 in 100  $\mu\text{L}$ .
- Stresalec mikrotitrne plošče, ki je sposoben 500 do 700 orbitalnih vrtljajev na minuto (rpm).
- Vortex mešalec
- Vpojne materiale, ki so potrebni, za vpijanje trakov z luknjicami.
- Steklene ali polistirenske cevke za enkratno uporabo. [21]

### 3.2.4 PROCEDURA TESTA

#### 3.2.4.1 PRIPRAVA REAGENTOV

- Spiralna tekočina: spiralni koncentrat razredčimo 10- krat z deionizirano vodo. Spiralna tekočina je stabilna en mesec pri sobni temperaturi (približno 25°C), če jo shranimo v tesno zaprti steklenički. [21]
- Mikrotitracijske vdolbinice: izberemo si določeno število prevlečenih vdolbinic, ki jih potrebujemo za test. Ostale vdolbinice, ki jih še ne bomo uporabili, shranimo s sušilnim sredstvom. Vrečka, v katero shranimo ploščo mora biti ponovno zatesnjena, da preprečimo stik z vlago. [21]

### 3.2.4.2 POSTOPEK TESTA

Vsi vzorci in reagenti morajo imeti sobno temperaturo (približno 25°C). Pred uporabo reagente temeljito premešamo s previdnim obračanjem. Standarde, vzorce in kontrole moramo testirati v dvojicah. [21]

Opomba: vse serumske vzorce, ki imajo višji rezultat kot najvišji standard, moramo temeljito premešati in razredčiti s standardom A, ki ima koncentracijo 0 ng/mL. Pediatrične vzorce pred testom razredčimo 1:10 s standardom A (0 ng/mL). Standardov in kontrol ne razredčujemo. [21]

- Mikrotitracijske trakove označimo pred uporabo.
  - V primerne vdolbinice odpipetiramo 20 µL standardov, kontrol in vzorcev.
  - V vsako vdolbinico dodamo 100 µL AMH testnega pufra z uporabo precizne pipete.
  - Ploščo inkubiramo eno uro pri sobni temperaturi (25°C), pri tem pa jo tresemo na orbitalnem mikrotitrskem tresalcu.
  - Vsako vdolbinico petkrat speremo in izsesamo za 30 sekund s spiralno tekočino, z uporabo avtomatičnega spiralca mikrotitrške ploščice ali pa ročno, z uporabo precizne pipete. Popivnamo in izsušimo tako, da ploščo obrnemo na absorpcijski papir.
- 
- Dodamo 100 µL raztopine konjugata proitelo-biotin v vsako vdolbinico, z uporabo precizne pipete.
  - Ploščo inkubiramo eno uro pri sobni temperaturi (25°C), pri tem pa jo tresemo na orbitalnem mikrotitrskem tresalcu.
  - Vsako vdolbinico petkrat speremo in izsesamo za 30 sekund s spiralno tekočino.
  - Z uporabo precizne pipete dodamo 100 µL streptavidin-encim substrata v vsako vdolbinico.
  - Ploščo inkubiramo pol ure pri sobni temperaturi (25°C), pri tem pa jo tresemo na orbitalnem mikrotitrskem tresalcu.
  - Vsako vdolbinico petkrat speremo in izsesamo za 30 sekund s spiralno tekočino.
  - Z uporabo precizne pipete dodamo 100 µL TMB kromogen raztopine, v vsako vdolbinico.

- Paziti moramo, da plošča ni izpostavljena neposredni sončni svetlobi.
- Ploščo inkubiramo 10 do 15 minut pri sobni temperaturi (25°C), pri tem pa jo tresemo na orbitalnem mikrotitrskem tresalcu.

Opomba: biti moramo zelo pazljivi, ker se barva lahko razvije hitreje ali počasneje, kot je priporočen inkubacijski čas, odvisno od lokalizirane sobne temperature. Vizualno moramo opazovati razvijanje barve, da optimiziramo inkubacijski čas.

- V vsako vdolbinico dodamo 100  $\mu$ L stop raztopine z uporabo precizne pipete.
- Absorbanco raztopine v vdolbinici beremo v tridesetih minutah, z uporabo mikrotitrškega bralca na 450 nm.

Opomba:

- med merjenjem absorbance moramo ničelni standard programirati kot slepo probo,
  - če je možna korekcija valovne dolžine, nastavimo instrument na dvojno merjenje valovne dolžine pri 450 nm, z ozadjem popravka valovne dolžine med 600 in 630 nm.
- [21]

Postopek, ki je opisan zgoraj lahko opravimo z analizatorjem, ki ima v naprej vnešen program za izvedbo testa in izračun rezultatov.

## 3.2.5 REZULTATI

### 3.2.5.1. STANDARDNA KRIVULJA

- Izračunamo srednjo vrednost za vsak standard, kontrolo in vzorec.
- Na y os napišemo logaritem srednje vrednosti vsakega standarda v primerjavi z logaritmom koncentracije AMH v  $\mu$ g/L na x osi, z uporabo linearne krivulje. Namesto tega lahko podatke vstavimo v linearno os v odvisnosti od linearne osi in uporabimo, dolgo zglajeno krivuljo.
- Narišemo krivuljo, ki najbolj ustreza sredini podvojenih točk.
- Določimo koncentracijo kontrol in standardov, z uporabo standardne krivulje. Ob tem primerjamo srednji odčitek absorbance z ustrežno koncentracijo AMH.

- Vsak vzorec, ki ga odčitamo višje, kot je najvišji standard, moramo primerno razredčiti s standardom A, ter ga ponovno testirati. Pred testiranjem pediatrične vzorce razredčimo 1:10, in sicer z uporabo standarda A.
- Če izmerimo koncentracijo nižje kot analitično občutljivost, jo moramo upoštevati kot tako.
- Če je potrebno, vrednost pomnožimo s faktorjem redčenja.

Opomba: če odčitki absorbance presegajo omejitve čitalnika ploščic, je potrebno drugo branje pri 405 nm (z referenčnim filtrom med 600 in 630 nm, če je na voljo). V tem primeru nadaljujemo z izdelavo druge standardne krivulje z odčitki absorbance vseh standardov pri 405 nm. Koncentracijo vzorcev izven standardne krivulje pri 450 nm odčitamo iz nove standardne krivulje. Odčitki nove standardne krivulje 405 nm naj ne nadomestijo odčitkov, ki so na standardni krivulji 450 nm. [21]

Z uporabo pripravljenih kalibratorjev smo dobili naslednje odčitke absorbanc in koncentracij (glede na dvojnik).

Preglednica 4: Standardna krivulja [21]

ŠTEVILKA LUKNJICE	VSEBINA LUKNJICE	POVPREČNA ABSORBANCA	KONCENTRACIJA ( $\mu\text{g/L}$ )
	STANDARDI		
A1, A2	A	0.03 (slepa)	0
B1, B2	B	0.01	0.05
C1, C2	C	0.02	0.10
D1, D2	D	0.06	0.25
E1, E2	E	0.39	1.8
F1, F2	F	1.50	7.5
G1, G2	G	3.13	15

### 3.2.6 PRIČAKOVANE VREDNOSTI

Pričakovanih referenčnih vrednosti za test ELSA DSL proizvajalec ni podal, zato smo jih morali določiti sami v laboratoriju. Določili smo mejno vrednost 0.7 do 3.5  $\mu\text{g/L}$

### 3.2.7 KONTROLA KAKOVOSTI

- Analitična občutljivost je najnižja zaznavna koncentracija AMH, ki se razloči od ničle (AMH standard A) s 95% zanesljivostjo, je 0.006 µg/L. To vrednost smo določili z obdelavo kompletne krivulje sedmih kalibracijskih točk, kontrol, in osmih ponovitev ničelnega standarda v večih testih. Analitična občutljivost je interpolirana na točko, ki je dva standardna odklona od povprečnega izmerjenega signala ničelnega kalibratorja. [21]
- Reagenti, dobljeni s kompletom, so optimizirani za merjenje koncentracij AMH v serumu. [21]
- Ponovljivost v seriji in izven serije je navedena v preglednici 5 in 6.

Preglednica 5: Ponovljivost znotraj testna smo določili iz srednje vrednosti vsake od osmih ponovitev. [21]

<b>VZOREC</b>	<b>ŠTEVILO</b>	<b>SREDNJA VREDNOST (µg/L)</b>	<b>STANDARDNI ODKLON (µg/L)</b>	<b>KOEFICIENT VARIACIJE (%)</b>
1	8	0.144	0.006	4.6
2	8	0.843	0.020	2.4
3	8	4.408	0.147	3.3

Preglednica 6: Ponovljivost med testom smo določili za 10 ločenih serij od srednje vrednosti povprečnih dvojnikov. [21]

<b>VZOREC</b>	<b>ŠTEVILO</b>	<b>SREDNJA VREDNOST (µg/L)</b>	<b>STANDARDNI ODKLON (µg/L)</b>	<b>KOEFICIENT VARIACIJE (%)</b>
1	10	0.149	0.012	8.0
2	10	0.850	0.041	4.8
3	10	4.279	0.290	6.7

- Pridobitek dodatka je prikazan v preglednici 7.



Analiziramo tri vzorce seruma, ki vsebujejo različne koncentracije endrogenega AMH, obogatena z različnimi količinami AMH. [21]

Preglednica 7: Pridobitek dodatka oziroma izkoristek

	<b>ENDROGENA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>DODANA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>PRIČAKOVANA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>OPAZOVANA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>IZKORISTEK</b>
1	0.164	0.2	0.361	0.392	109
2	0.917	0.2	1.117	1.125	101
3	4.527	0.2	4.727	4.639	98

- Linearnost je prikazana v preglednici 8.

Dva serumska vzorca razredčimo z 0 µg/L AMH standardom in analiziramo. [21]

Preglednica 8: Linearnost

<b>VZOREC</b>	<b>FAKTOR</b> <b>REDČENJA</b>	<b>PRIČAKOVANA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>OPAZOVANA</b> <b>(µg/L)</b>	<b>IZKORISTEK</b> <b>(%)</b>
1	N/A	N/A	0.88	N/A
	1:2	0.44	0.40	91
	1:4	0.22	0.18	82
	1:8	0.11	0.08	75
	1:16	0.055	0.049	89
2	N/A	N/A	10.6	N/A
	1:2	5.3	5.1	96
	1:4	2.65	2.65	100
	1:8	1.33	1.18	89
	1:16	0.66	0.53	80

- Pri testnih protitelesih obstaja možnost interference s hemofilnimi protitelesi v vzorcu. Ljudje, ki so v stalnih stikih z živalmi, so morda prejeli imunoterapijo, ali so bili podvrženi diagnostičnim postopkom z uporabo imunoglobulinov ali imunoglobulinskih fragmentov, lahko proizvajajo protitelesa, na primer HAMA, ki

motijo test. Prav tako so lahko prisotna v vzorcu druga hemofilna protitelesa, kot so človeška proti-kozja protitelesa. [21]

- Če je prisotna mikrobiološka kontaminacija ali čezmerna motnost, zavrzemo stekleničko. [21]

## 4 REZULTATI

### 4.1. VZORCI

Analizirali smo rezultate meritev koncentracije 46. vzorcev seruma pacientk, ki smo jih odvzeli v treh letih, med leti 2007 in 2010. V povprečju so stare 29.6 let, s standardnim odklonom 6.1 let.

Preglednica 9: Tabela koncentracij, izmerjenih z dvema metodama za določanje Anti - Müllerjevega hormona v  $\mu\text{g/L}$ .

<b>ZAPOREDNA ŠTEVILKA VZORCA</b>	<b>STAROST ŽENSKE</b>	<b>METODA DSL AMH <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b>METODA BECKMAN AMH <math>\mu\text{g/L}</math></b>
1	35	0,1	0,3
2	32	0,3	0,5
3	19	0,3	0,6
4	24	0,2	1,5
5	33	0,1	2,1
6	34	0,2	1,8
7	40	0,2	1,7
8	22	0,5	1,0
9	37	0,5	1,1
10	37	0,5	2,1
11	32	0,4	2,0
12	29	0,6	2,0
13	32	0,6	1,7
14	32	0,6	1,8
15	27	0,8	1,9
16	34	0,7	2,1
17	19	1,0	4,2

18	34	0,9	3,5
19	26	0,8	3,0
20	31	0,8	3,5
21	28	0,9	4,2
22	24	0,9	4,3
23	30	1,1	5,0
24	29	1,0	4,2
25	29	1,0	4,5
26	26	1,2	5,0
27	39	1,2	6,1
28	19	0,5	7,0
29	34	1,7	6,1
30	33	1,7	6,8
31	34	1,4	8,1
32	33	2,1	7,8
33	31	1,9	9,0
34	35	1,8	8,9
35	28	1,7	11,0
36	26	2,8	7,9
37	33	2,5	12,1
38	47	3,5	14,8
39	32	3,0	14,0
40	31	2,0	9,0
41	29	3,0	13,8
42	21	2,9	14,6
43	18	4,0	18,1
44	22	3,8	19,0
45	21	3,8	17,9
46	25	4,0	19,0

## 4.2 STATISTIČNI PROGRAM

Za statistično obdelavo zbranih podatkov smo uporabili statistični program Statistica – basic statistic and tables in MedCalc. Za preverjanje hipoteze o normalni porazdelitvi vrednosti koncentracij Anti Müllerjevega hormona v serumu smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test.

## 4.3 OBDELAVA PODATKOV

Najprej smo podatke vsake preiskovane metode statistično obdelali posebej. Nato pa smo rezultate primerjali z določenimi testi še med sabo.

## 4.4 SKUPINSKA ANALIZA

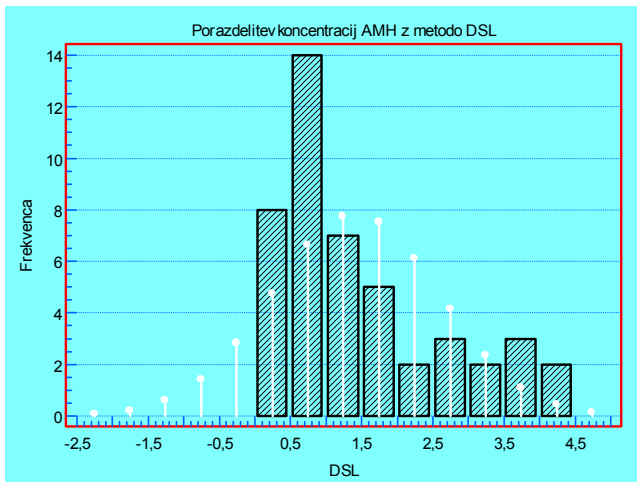
Najprej smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnovskega testa testirali normalno porazdelitev koncentracij anti-Müllerjevega hormona za vsako metodo posebej, hkrati pa smo s tem testom izračunali še povprečno vrednost in standardno deviacijo rezultatov. V naslednjem koraku smo preverili, če se srednji vrednosti med seboj statistično razlikujeta, na koncu pa smo izračunali še korelacijo med obema metodama.

## 4.5 REZULTATI METODE DSL

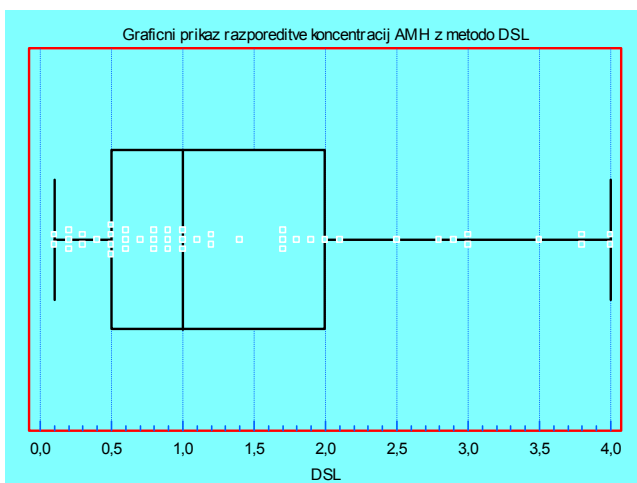
Preglednica 10: Statistični podatki za metodo ELISA DSL

STATISTIČNI PODATKI	DSL
Število vzorcev	46
Najnižja vrednost	0.1000
Najvišja vrednost	4,0000
Aritmetična sredina	1,4239
95% interval zaupanja za povprečje	1.0789 do 1.7689
Mediana	1.000
95% interval zaupanja za mediano	0.7353 do 1.7000
Varianca	1.3499
Standardna deviacija	1.1618
Relativna standardna deviacija	0.8159 (81.59%)
Standardna napaka srednje vrednosti	0.1713
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	Sprejemanje normalnosti (P=0.076)
Percentil 2.5	0.1000
Percentil 5	0.1800
Percentil 10	0.2100
Percentil 25	0.5000
Percentil 75	2.0000
Percentil 90	3.4500
Percentil 95	3.8400
Percentil 97.5	4.0000

Normalnost podatkov smo preverili s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa za normalno populacijo. Rezultat za metodo DSL je 0.076. Ker je dobljena vrednost višja od 0.05, pomeni, da so se vrednosti koncentracij Anti-Müllerjevega hormona v serumu porazdelile normalno. Povprečna koncentracija Anti-Müllerjevega hormona v serumu žensk, ki je bila izmerjena z metodo DSL, je bila 1.4239  $\mu\text{g/L}$ . Vrednost je pod referentnim intervalom za normalno populacijo, ki znaša 3.5 do 7  $\mu\text{g/L}$ . Vrednosti grafično prikazujeta sliki 5 in 6.



Slika 5: Porazdelitev koncentracij z metodo DSL



Slika 6: Prikaz razporeditve koncentracij Anti-Müllerjevega hormona z metodo DSL

## 4.6 METODA BECKMAN COULTER

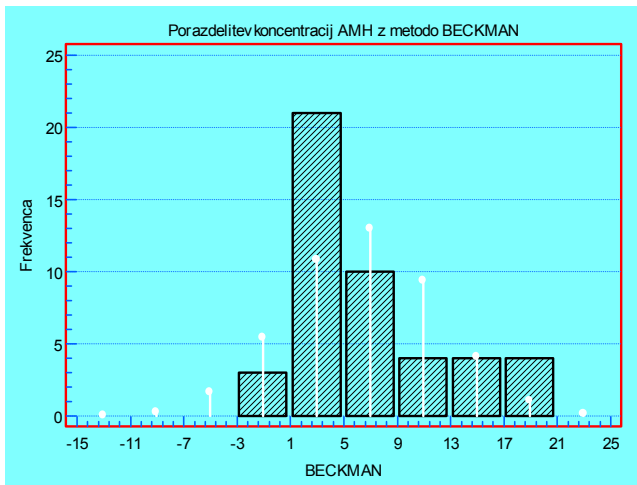
Preglednica 11: Statiistični podatki za metodo ELISA Beckman Coulter

STATISTIČNI PODATKI	BECKMAN COULTER
Število vzorcev	46
Najnižja vrednost	0.3000
Najvišja vrednost	19.0000
Aritmetična sredina	6.4478
95% interval zaupanja za povprečje	4.8149 do 8,0808
Mediana	4.4000
95% interval zaupanja za mediano	2.2480 do 7.5173
Varianca	30.2399
Standardna deviacija	5.4991
Relativna standardna deviacija	0.8529 (85.29%)
Standardna napaka srednje vrednosti	0.8108
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	Sprejemanje normalnosti (P=0.134)
Percentil 2.5	0.4300
Percentil 5	0.5800
Percentil 10	1.1400
Percentil 25	2.0000
Percentil 75	9.0000
Percentil 90	14.7800
Percentil 95	18.2800
Percentil 97.5	19.0000

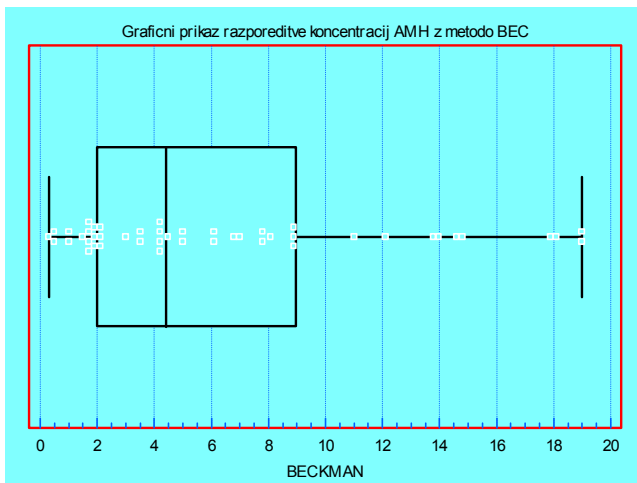
Normalnost podatkov smo preverili s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa za normalno populacijo. Rezultat za metodo Beckman Coulter je 0.134. Ker je dobljena vrednost višja od 0.05, pomeni, da podatki signifikantno ne odstopajo od normalne porazdelitve.

Povprečna koncentracija Anti-Müllerjevega hormona v serumu žensk, ki je bila izmerekna z metodo Beckman Coulter, je bila 6.4478  $\mu\text{g/L}$ . Vrednost je v referentnem intervalu za normalno populacijo, ki znaša 2.0 do 6.8  $\mu\text{g/L}$ . Vrednosti grafično prikazujeta sliki 7 in 8.





Slika 7: Porazdelitev koncentracij Anti-Müllerjevega hormona z metodo Beckman Coulter



Slika 8: Razporeditev koncentracij Anti Müllerjevega hormona z metodo Beckman Coulter

## 5 SKUPINSKA PRIMERJAVA REZULTATOV

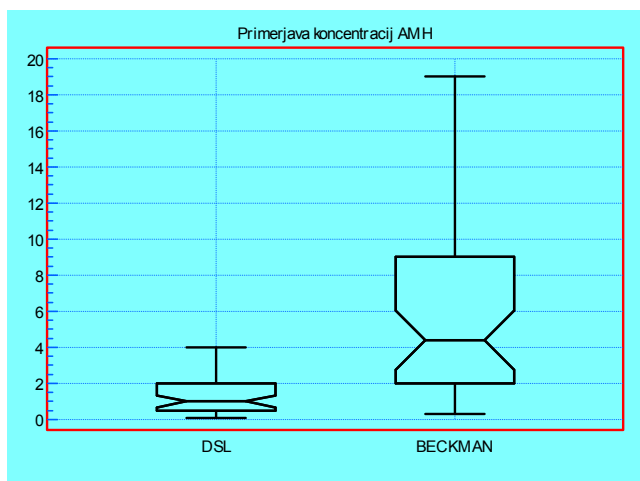
V diplomski nalogi smo primerjali dve imunokemijski metodi (DSL – Diagnostic System laboratories in Beckman Coulter) za merjenje Anti Müllerjevega hormona. Z metodama smo pregledali 46 žensk in jim določili ovarijsko rezervo. Od 46 vzorcev smo z diagnostično metodo DSL določili 14 (30.43%) vzorcev z znižano vrednostjo AMH, 28 (60.87%) vzorcev z normalno koncentracijo AMH in 4 (8.70%) vzorcem smo določili povišano vrednost AMH. Z metodo Beckman Coulter pa smo določili 11 (29.91%) vzorcev z znižanimi vrednostmi AMH, 19 (41.30%) vzorcev je imelo normalno koncentracijo AMH in 16 (34.78%) vzorcev s povišano koncentracijo.

Preglednica 12: Ujemanje mejnih vrednosti rezultatov metod

	<b>UPORABLJENE MEJNE VREDNOSTI µg/L</b>	<b>ŠTEVILO ŽENSK S POVIŠANO VREDNOSTJO</b>	<b>ŠTEVILO ŽENSK Z MEJNO VREDNOSTJO</b>	<b>ŠTEVILO ŽENSK Z ZNIŽANO VREDNOSTJO</b>
<b>DSL</b>	0.7 – 3.5	4 (8.70%)	28 (60.87%)	14 (30.43%)
<b>BECKMAN COULTER</b>	2.0 – 6.8	16 (34.78%)	19 (41.30%)	11 (23.91%)
<b>RAZLIKA MED METODAMA</b>		26.08%	19.57%	6.52%

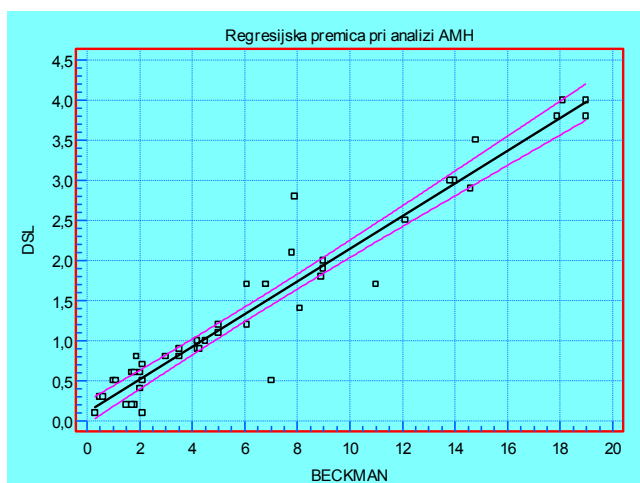
Z imunološko metodo Beckman Coulter smo odkrili 26,08% več vzorcev s povišano koncentracijo AMH, z imunološko metodo DSL pa smo odkrili 19.57% več vzorcev z normalno vrednostjo AMH in 6.52% več vzorcev z zmanjšano vrednostjo.

Najmanjše odstopanje med metodama se je pokazalo pri številu vzorcev z zmanjšano vrednostjo AMH.

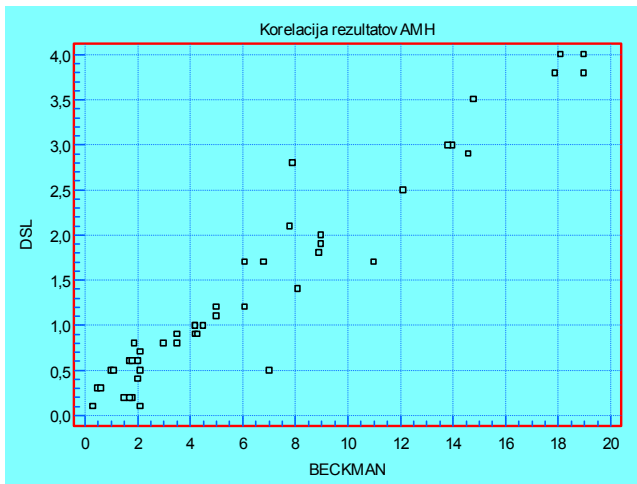


Slika 9: Primerjava koncentracij AMH

Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient. Na sliki je diagram regresijske premice, z upoštevanjem 95% meje zaupanja in 95% napovedane vrednosti. Enačba regresijske premice je  $y = 0.1486 + 0.2027 x$ . Korelacijski koeficient je 0.9657, ki kaže na to, da je statistična povezanost med rezultati dobra.



Slika 10: Regresijska premica pri analizi AMH (spremenljivka x je Beckamn Coulter, spremenljivka y je DSL)



Slika 11: Korelacija rezultatov AMH

## 6 RAZPRAVA

AMH ni le označevalec populacije majhnih antralnih foliklov, temveč tudi napovednik kakovosti oocitov.

AMH določamo z imunokemijskimi metodami. Pri diplomi smo uporabili dve metodi ELISA, katerih rezultate smo primerjali med sabo. Encimskoimunski test ELISA je hiter ter visoko občutljiv, uporaben pa je za večje molekule, ki imajo vsaj dva epitopa, ki se ne prekrivata. Primerjali smo metodi ELISA Beckman Coulter in ELISA DSL. Rezultate smo pridobili iz kalibracijske krivulje z interpolacijo. Krivulja služi za določitev koncentracije AMH v vzorcih, ki so bili izmerjeni istočasno kot kalibrator. Pri metodi ELISA DSL merimo absorbanco na dveh valovnih dolžinah.

Analizirali smo 46 vzorcev seruma pacientk. V povprečju so stare 29,6 let. Vsi testi z obema metodama so bili izvedeni po navodilih proizvajalca. Med ženskami, ki smo jim z obema metodama merili koncentracijo AMH, je 25 žensk starejših od 30 let. Med temi ženskami je 12 žensk, ki imajo znižane vrednosti AMH, to je 48%. Žensk mlajših od 30 let je 21. Od teh ima znižane vrednosti 5 žensk. To je 24%. Kar pomeni, da ima dvakrat več žensk po 30. letu znižane vrednosti AMH. To se ujema s trditvijo, da začne po 30. letu plodnost počasi padati, po 40. letu pa drastično pade.

Mejne vrednosti metod ELISA DSL in ELISA Beckman Coulter se razlikujejo, ker se pri metodah uporabljajo različna protitelesa. Mejno vrednost za koncentracijo AMH v serumu pri metodi ELISA DSL je priporočil proizvajalec, to je 0.7 – 3.5 µg/L. Ker pa za metodo ELISA Beckman Coulter proizvajalec ni podal nobenih priporočljivih vrednosti, smo jih določili v laboratoriju. Mejna vrednost za koncentracijo AMH v serumu pri metodi ELISA Beckman Coulter je 2.0 – 6.8 µg/L.

Iz rezultatov lahko razberemo, da je testiranje z dvema metodama pokazalo, da ima večina testiranih vzorcev normalno koncentracijo AMH. Vrednosti koncentracij AMH izmerjenih z obema metodama so porazdeljene normalno in signifikantno ne odstopajo od normalne porazdelitve. Največje odstopanje med metodama se je pokazalo pri številu vzorcev s povišano koncentracijo AMH. Visoke vrednosti AMH so lahko zavajajoče, zaradi sindroma policističnih jajčnikov. Pri teh ženskah bi bila potrebna še ocenitev jajčnikov s

transvaginalnim ultrazvokom in štetjem antralnih foliklov. Zaradi tako velikega odstopanja pri povišanih vrednostih, lahko sklepamo, da je zgornja mejna vrednost pri metodi ELISA Beckman Coulter vprašljiva.

Najmanjše razlike v rezultatih pa so se pokazale pri številu vzorcev z zmanjšano vrednostjo AMH. To potrjuje teorijo, da bi morala biti zgornja mejna vrednost pri Beckman Coulter višja od 6.8 µg/L.

Povprečna vrednost izmerjena z metodo DSL je pod intervalom normalne populacije, vrednost izmerjena z metodo Beckman Coulter pa je v intervalu normalne populacije. Z izračunom korelacije pa smo ugotovili, da se lahko odločimo za zamenjavo metod.

Pri naši raziskavi smo ugotovili, da so koncentracije AMH 4.53-krat nižji z metodo DSL, kot z metodo Beckman Coulter. Sklepam, da je to zato, ker metodi uporabljata različna protitelesa. Ti rezultati se ujemajo s študijo, pri kateri so primerjali metodi DSL in Beckman Coulter na 276. vzorcih seruma. Njihova raziskava kaže da so rezultati z metodo ELISA DSL 5.05-krat nižji kot ELISA Beckman Coulter. [26]

Pri napovedovanju ovarijske rezerve je raziskava, ki so jo opravili v Specialističnem biomedicinskem laboratoriju v Franciji, pokazala, da je metoda Beckman Coulter bolj uporabna pri postopkih umetne oploditve kot metoda ELISA DSL. [25]

V neki raziskavi, ki je bila izvedena na 69. ženskah, so izvedli simultano določitev duplikatov seruma z obema metodama. Kljub uporabi različnih ELISA testov, ni bilo ugotovljene signifikantne razlike med koncentracijo AMH pri ženskah, ki so noseče in pri ženskah, ki niso. To pomeni, da level AMH v serumu ni dober pokazatelj nosečnosti. Zanimivo, AMH pa se je izkazal za dobrega pokazatelja negativnega rezultata. Z uporabo metode Beckman Coulter imajo vse noseče ženske koncentracijo AMH nad 1.4 µg/L. Po drugi strani pa niso odkrili nobene mejne vrednosti pri metodi DSL. Tako da se je koncentracija AMH v serumu, z uporabo metode Beckman Coulter, izkazala za zelo zanimivo pri negativni napovedni vrednosti za nosečnost. [25] Ta raziskava potrjuje, da je metoda ELISA Beckman Coulter bolj uporabna od ELISA DSL na večih področjih.

Zmanjšana ovarijska rezerva in starost ženske imajo direktni vpliv na postopke umetne oploditve. Uspeh zunajtelesne oploditve je močno odvisen od protokola optimalne stimulacije jajčnikov, ki poskrbi za zadostno število oocitov dobre kvalitete. Pomembna je individualizacija protokola stimulacije glede na leta, endokrini status in ovarijski status. [25]

## 7 SKLEP

Namen moje diplomske naloge je ugotoviti, katera metoda je boljša za uporabo v kliničnem laboratoriju, obenem pa poiskati razlike med njima.

- Metodi uporabljata različna protitelesa, zato so vrednosti in referenčne vrednosti drugačne.
- Ni bistvenega pomena katero metodo bi uporabili, vendar sem se odločila za metodo, ki ima manjše koeficiente variacije pri ponovljivosti v seriji in izven serije, to je metoda ELISA Beckman Coulter.
- Prijaznejša za uporabo v kliničnem laboratoriju je metoda Beckman Coulter, ker absorbanco merimo na eni valovni dolžini, pri metodi DSL pa absorbanco merimo na dveh valovnih dolžinah.
- Rezultati so primerljivi, največja razlika je pri pacientki številka 28, kjer metoda DSL kaže znižano vrednost AMH, metoda Beckman Coulter pa povišano vrednost. Vzorec smo ponovili in potrdili povišano vrednost z reagentom Beckman Coulter.

Med strokovnjaki prevladuje mnenje, da je neplodnosti čedalje več. Vzroke za to iščejo v naraščanju vnetij ženskega spolnega sistema, v spolno prenosljivih boleznih in v odlašanju pri odločitvi za prvega otroka. Nedvomno pa se ugotovi veliko več primerov neplodnosti tudi zaradi novih diagnostičnih in terapevtskih postopkov, kot je določanje Anti-Müllerjevega hormona.



## 8 LITERATURA

1. Starost in reprodukcija (2006), ginekologija, seminar  
URL= <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=1498> (dostopano 06.02.2010)
2. Meden-Vrtovec H s sodelavci (1989), Neplodnost, Cankarjeva založba v Ljubljani, 131-149
3. Meden-Vrtovec H, Virant-Klun I, Drobnič S: Strokovni prispevek: Staranje jajčnikov in zdravljenje neplodnosti, Zdravniški vestnik 2003; 72: Supl.II: 93-6
4. Arko D s sodelavci (2006): Ginekologija, učbenik, Maribor: Visoka zdravstvena šola
5. Dr.Hickin L(2002): Vodnik za vsako žensko, nasveti za zdravje in dobro počutje, izdaja v slovenščini Mladinska knjiga Založba d.d., Ljubljana
6. Wikipedia – hipofiza URL= <http://sl.wikipedia.org/wiki/Hipofiza> (dostopano 09.08.2010)
7. Kupfermann I: Hipotalamus, limbični sistem, čustveno vedenje, zapiski in razmišljanje  
URL=  
[https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:ynPra6\\_SwzgJ:www.alenkarebula.com/alenkadrupal/sites/default/files/1177611936504zapiski%2520%2520Kupfermannn.doc+irving+kupfermann+hipotalamus&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESg1K0qLqD2\\_jBnHi33o0gguRd36aSMTbGHsQINocNRJeHFhDdQzd6vFVh9mCHWqSYe02YxX3Ik1v7UsBiqF12ZD\\_ljNYmhmLGX7thzpjJmV\\_IUu9fthhFZPKZbEgq261LIhKvj&sig=AHIEtbSn0jqvk9wQaR9z46tauQK5Us4HXA&pli=1](https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:ynPra6_SwzgJ:www.alenkarebula.com/alenkadrupal/sites/default/files/1177611936504zapiski%2520%2520Kupfermannn.doc+irving+kupfermann+hipotalamus&hl=sl&gl=si&pid=bl&srcid=ADGEESg1K0qLqD2_jBnHi33o0gguRd36aSMTbGHsQINocNRJeHFhDdQzd6vFVh9mCHWqSYe02YxX3Ik1v7UsBiqF12ZD_ljNYmhmLGX7thzpjJmV_IUu9fthhFZPKZbEgq261LIhKvj&sig=AHIEtbSn0jqvk9wQaR9z46tauQK5Us4HXA&pli=1) (dostopano 09.08.2010)
8. Dr.Pfeirer (2005): Hipotalamus in hipofiza, Interna medicina, literatura URL=  
<http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=925> (dostopano 09.08.2010)
9. Hormonski profil aktivne ženske URL= <http://www.aktivni.si/ostali-sporti/hormonski-profil-aktivne-zenske/> (dostopano 06.08.2010)
10. Osredkar J (2007), Endokrinologija, zapiski za predmet Klinična biokemija, Laboratorijska biomedicina VSŠ
11. Wikipedija – Hormon URL= <http://sl.wikipedia.org/wiki/Hormon> (dostopano 06.08.2010)
12. Wikipedia – Anti- Müllerian hormone URL= [http://en.wikipedia.org/wiki/Anti-M%C3%BCllerian\\_hormone](http://en.wikipedia.org/wiki/Anti-M%C3%BCllerian_hormone) (dostopano 06.02.2010)
13. Wikipedia – Ovarian reserve URL= [http://en.wikipedia.org/wiki/Ovarian\\_reserve](http://en.wikipedia.org/wiki/Ovarian_reserve) (dostopano 19.04.2011)

14. Meden – Vrtovec H, Osredkar J (2010) Anti-Müllerjev hormon – napovednik ovarijske rezerve. Zdravniški vestnik, letnik 79, številka 6, 507-511
15. Kuhelj R s sodelavci (2003): Biokemija v praksi: načela in tehnike s priložo, Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije, 3. Izdaja – Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 75-77
16. Kikelj Neža (2010), Pomen določanja protiteles proti protrombinu z dvema encimsko imunskima metodama, diplomsko delo, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo
17. Vozelj M (2000): Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 48-55, 56-58
18. Medicinski slovar (2010): Protitelesa (1.del): zgradba, URL=<http://chrtowsky.wordpress.com/2010/02/04/protitelesa-1-del-zgradba/> (dostopno 15.12.2010)
19. Wikipedia – ELISA URL= <http://sl.wikipedia.org/wiki/ELISA> (dostopano 03.11.2010)
20. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Molekularna imunologija, ELISA URL=[http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk5642/molekularna\\_imunologija\\_-\\_navodila\\_za\\_vajo\\_2.pdf](http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk5642/molekularna_imunologija_-_navodila_za_vajo_2.pdf) (dostopano 19.04.2011)
21. DSL, Diagnostic System laboratories, INC. A Beckman coulter company, 2008 Beckman Coulter INC., PCL-10-14400A ACTIVE MIS/AMH ELISA, Direction for use
22. Immunotech A Beckman Coulter Company EIA AMH/MIS Direction for use – enzyme immunoassay for the in vitro determination of Anti-Müllerian hormone/ Mullerian inhibiting substance (AMH/MIS) in human serum and plasma A11893
23. Kemp S, Anatomy of the endocrine system URL=[http://www.emedicinehealth.com/anatomy\\_of\\_the\\_endocrine\\_system/article\\_em.htm](http://www.emedicinehealth.com/anatomy_of_the_endocrine_system/article_em.htm) (dostopano 17.04.2011)
24. Slika 4: indirektna ELISA URL= <http://worldofviruses.wordpress.com/laboratory-work/> (dostopano 03.11.2010)
25. Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D (2007),: Measurment of serum Anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART), ScienceDirect, Clinica Chimica Acta 375, 162-164
26. Bersinger N, Wunder D, Birkhäuser M, Guibourdenche J (2007),: Measurement of anti-mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA in assisted

reproduction: differences between serum and follicular fluid., Letter to the Editor, Clinica Chimica Acta 384, 174-175

27. Gruijters M, Visser J, Durlinger A, Themmen A (2003): Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function., Molecular and Cellular Endocrinology, Volume: 211, Issue: 1-2, 85-90