

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA ŠPANIĆ

**POMEN DOLOČANJA KONCENTRACIJE ENDOTELINA
PRI PACIENTKAH S POLICISTIČNIMI OVARIJI**

**DIAGNOSTIC VALUE OF ENDOTHELIN AT PATIENTS
WITH POLYCYSTIC OVARIES**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika ter somentorstvom asist. dr. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Meritve koncentracij endotelina so opravili v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Ginekološki pregled preiskovank so opravili na Ginekološki kliniki Ljubljana.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju in asist. dr. Simoni Jurković Mlakar za mentorstvo, vso strokovno pomoč in skrben pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi predsednici komisije izr. prof. dr. Mariji Bogataj in članu komisije doc. dr. Mateju Sovi za pregled naloge in koristne nasvete.

Najlepše se zahvaljujem vsem bližnjim, ki so mi kakorkoli bili v podporo v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja in somentorice asist. dr. Simone Jurković Mlakar.

Vesna Španić

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1.1. JAJČNIK (OVARIUM)	1
1.1.1.1. ANATOMIJA in HISTOLOGIJA	1
1.1.1.2. FOLIKLI	2
1.1.2. FIZIOLOGIJA MENSTRUALNEGA CIKLA	3
1.1.3. MEHANIZEM POVRATNIH ZVEZ ALI MEDSEBOJNEGA DELOVANJA	6
1.2. SINDROM POLICISTIČNIH OVARIJEV	8
1.2.1. OPREDELITEV SINDROMA POLICISTIČNIH OVARIJEV	8
1.2.2. MOTNJE PRI BOLNICAH S SINDROMOM POLICISTIČNIH OVARIJEV IN UKREPI ZA ZDRAVLJENJE	9
1.2.3. DIAGNOSTIKA PCOS	16
1.3. ENDOTELIN	18
1.3.1. IZOFORME ENDOTELINA	18
1.3.2. ENDOTELINSKI RECEPTORJI	19
1.3.3. BIOSINTEZA ENDOTELINA	20
1.3.4. MEHANIZEM DELOVANJA ENDOTELINA	21
1.3.5. UČINKI ENDOTELINA NA ORGANE/ORGANSKE SISTEME	21
1.3.6. DOLOČANJE PROTEINOV	23
2. NAMEN DELA	24
3. METODE IN MATERIALI	25
3.1. OPIS VZORCEV	25
3.2. ELISA	25
3.2.1. Princip metode	25
3.2.2. Priprava reakcijskih zmesi	27
3.2.3. Priprava vzorcev	28
3.2.4. Potek dela	28
3.2.5. Značilnosti testa	30

3.2.6. Natančnost testa	30
3.3. ANALIZATOR Personal Lab™	31
3.4. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	33
4. REZULTATI.....	35
4.1. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN OVREDNOTENJE SKUPINE	35
4.1.1. Statistično vrednotenje celotnega vzorca	37
4.1.2. Statistično vrednotenje skupin 0 in 1	39
4.2. STATISTIČNI TESTI.....	41
4.2.1. Statistični testi celotnega vzorca	41
4.2.2. Statistični testi skupin 0 in 1	42
4.2.3. LOGISTIČNA REGRESIJA	45
4.3. DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST.....	48
4.3.1. Določitev mejne vrednosti koncentracije endotelina (ang. » <i>cut-off value</i> «)	49
4.3.2. Občutljivost in specifičnost glede na zdrave preiskovanke	50
5. RAZPRAVA.....	53
5.1. VREDNOSTI PLAZEMSKE KONCENTRACIJE ENDOTELINA – CELOTNA SKUPINA	54
5.2. VREDNOSTI PLAZEMSKE KONCENTRACIJE ENDOTELINA – SKUPINA 0 in 1	54
5.3. Občutljivost in specifičnost testa.....	56
6. SKLEP.....	58
7. LITERATURA.....	59
8. PRILOGA	62

POVZETEK

Sindrom policističnih ovarijev (PCOS) je zelo heterogena endokrinopatija, ki vpliva na reproduktivno zdravje, razvoj presnovnih motenj in srčno-žilnih obolenj ter psihološko stanje prizadetih žensk. Zaradi heterogenosti sindroma je za diagnostično oceno potreben strukturiran pristop, ki obsega anamnezo, zdravniški pregled, biokemijske teste in ginekološki ultrazvočni pregled.

V okviru diplomske naloge smo se osredotočili na enega izmed potencialnih biokemijskih kazalcev prisotnosti PCOS, to je endotelin, katerega klinična uporabnost še ni bila potrjena. Z uporabo imuno-kemijskega testa ELISA (*ang. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) se je določila koncentracije endotelina v plazmi. Pri izvedbi testa se uporabljajo anti-ET protitelesa, ki so vezana na trdnem nosilcu. Koncentracije smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo dobili s spektrofotometrično analizo.

Za določanje klinične uporabnosti endotelina smo naredili raziskavo med dvema skupinama preiskovank. V diagnostično skupino 0 smo uvrstili ženske, ki na ginekološkem ultrazvočnem pregledu niso imele vidnih nikakršnih anomalij na ovarijih (kontrolna skupina). Diagnostična skupina 1 pa je vključevala vse preiskovanke, ki so imele na ginekološkem ultrazvočnem pregledu potrjeno prisotnost policističnih ovarijev.

Glede na kontrolno skupino smo določili mejno vrednost koncentracije endotelina in izračunali specifičnost in občutljivost testa. Med diagnostičnima skupinama nismo dokazali statistično značilne razlike v plazemskih koncentracijah endotelina. Merjenje z ELISA metodo, glede na naše rezultate, ne loči bolnic s PCOS od zdravih preiskovank. Diagnostično specifičnost in občutljivost smo prikazali tudi z ROC krivuljo, ki prikaže zmogljivost metode v razločevanju med bolnicami s PCOS in zdravimi preiskovankami. Na podlagi majhne površine pod ROC krivuljo naši rezultati nakazujejo neprimernost endotelina za diagnostiko PCOS, kar ni v skladu z dosedanjimi navedbami v literaturi. Lahko zaključimo, da bi za dokončno opredelitev diagnostičnega pomena endotelina bile potrebne dodatne raziskave.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is heterogeneous endocrine disorder affecting multiple systems (reproductive organs, cardiovascular disorders, metabolic and psychological effects). Due to the heterogeneity of the syndrome, a structured approach is performed for diagnostic evaluation, which includes anamnesis and physical examination, biochemical tests and gynecological ultrasound examination.

In our research we have focused on endothelin, the potential biochemical indicator of the presence of PCOS, whose clinical utility has not yet been confirmed. For measuring the endothelin concentration in plasma samples the immuno-chemical ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) test was performed. The anti-ET monoclonal antibody immobilized on the solid phase was used. The spectrophotometric analysis was performed for calculation of endothelin concentration from the calibration curve.

To clarify the clinical potent of endothelin two test groups were compared. The diagnostic group 0 (control group) comprised women who did not have any abnormalities on ovaries (on gynecological ultrasound examination). Diagnostic group 1 comprised women who had confirmed the presence of polycystic ovary on a gynecological ultrasound examination.

Regarding the results of the control group the cut-off value, the diagnostic specificity and sensitivity were determined. Among the diagnostic groups the statistically significant differences in endothelin plasma concentration were not proven. This prospective study revealed that the measurement of endothelin with ELISA method is not a significant predictor in discrimination of PCOS patients from controls. The receiver operating characteristic (ROC) curve was also performed for determination of the diagnostic specificity and sensitivity. The ROC curve represents the ability of the test to discriminate the PCOS patients from controls. Based on the low area under ROC curve the results of this research indicated that the endothelin did not have high discriminating power. That was not consistent with our expectations, based on previous findings about endothelin. Therefore we can conclude that for final determination of endothelin role in diagnosis of PCOS, the further research should be performed.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	protitelo
Ag	antigen
CTRL	kontrola
CŽS	centralni živčni sistem
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEAS	dehidroepiandrosteron sulfat
E2	estradiol
ECE	encim endotelin konvertaza
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ET-X (X=1,2,3)	endotelin X (X=1,2,3)
ET_x (x=A,B)	endotelinski receptor x (x=A,B)
FSH	folikel stimulirajoči hormon
GnRH	gonadoliberin
HDL	lipoproteini visoke gostote
IFG	prediabetes
IGF X (X=I,II)	inzulinu podoben rastni faktor X (X=I,II)
IGFBP I	ang. » <i>insulin-like growth factor-binding protein I</i> «
IL-x (x=1,6)	interlevkin-x (x=1,6)
IR	inzulinska rezistenca
ITM	indeks telesne mase
LDL	lipoproteini nizke gostote
LH	luteinizirajoči hormon
OGTT	oralni tolerančni test za glukozo
PCO	policističen ovarij
PCOS	sindrom policističnih ovarijev
PGE2	prostaglandin E2
PGI2	prostaciklin = prostaglandin 12
PRL	prolaktin
RH	rastni hormon
SHBG	ang. » <i>sex hormone-binding globulin</i> «
TG	trigliceridi
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze- α
TSH	tireotropin
UZ	ultrazvok

okrajšave imen aminokislin	
Asp	asparginska kislina
Cys	cistein
Glu	glutaminska kislina
His	histidin
Ile	izolevcin
Leu	levcin
Lys	lizin
Met	metionin
Phe	fenilalanin
Ser	Serin
Thr	treonin
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
Val	valin

KAZALO SLIK

SLIKA 1: JAJČNIK (OVARIUM) - PREČNI PREREZ	3
SLIKA 2: NORMALEN MENSTRUACIJSKI CIKLUS.	4
SLIKA 3: PRIKAZ DELOVANJA POVRATNIH ZVEZ HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-OVARIJ.	7
SLIKA 4: A) ULTRAZVOČNI SLIKI ZDRAVEGA IN POLICISTIČNEGA OVARIJA TER B) LAPAROSKOPSKA ELEKTROKOAGULACIJA JAJČNIKOV (LEKO).	11
SLIKA 5: STRUKTURA ENDOTELINA.	18
SLIKA 6: SHEMA SINTEZE ENDOTELINA.	20
SLIKA 7: DOLOČEVANJE PROTITELES Z INDIRECTNIM TESTOM ELISA.	26
SLIKA 8: KVANTITATIVNO DOLOČEVANJE ANTIGENA Z METODO SENDVIČ ELISA.	27
SLIKA 9: PRIKAZ MEJNE VREDNOSTI, OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI ANALITA..	33

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: REPRODUKTIVNE MOTNJE BOLNIC S PCOS IN NJHOVO ZDRAVLJENJE.....	9
PREGLEDNICA II: ENDOKRINE MOTNJE IN ZDRAVLJENJE PRI BOLNICAH S PCOS.	11
PREGLEDNICA III: PRESNOVNE MOTNJE IN ZDRAVLJENJE PRI BOLNICAH S PCOS.	13
PREGLEDNICA IV: UČINEK ENDOTELINA NA ORGANE/ORGANSKE SISTEME.	21
PREGLEDNICA V: PREGLED IMUNOKEMIJSKIH METOD.	23
PREGLEDNICA VI: RAZTOPINE ŽE PRIPRAVLJENE ZA UPORABO PRI IZVEDBI TESTA.	28
PREGLEDNICA VII: PRIKAZ PONOVLJIVOSTI V DNEVU/MED DNEVI.....	30
PREGLEDNICA VIII: REZULTATI DESKRIPTIVNE STATISTIKE POSAMEZNIH SPREMENLJIVK.	37
PREGLEDNICA IX: STAROSTNA PORAZDELITEV SKUPINE PREISKOVANK.....	37
PREGLEDNICA X: PRIKAZ FREKVENČNE PORAZDELITVE CELOTNEGA VZORCA PO DIAGNOZI.	38
PREGLEDNICA XI: DESKRIPTIVNA STATISTIKA ZA SKUPINO Z DIAGNOZO 0.	39
PREGLEDNICA XII: DESKRIPTIVNA STATISTIKA ZA SKUPINO Z DIAGNOZO 1.....	39
PREGLEDNICA XIII: REZULTATI KOLMOGOROV-SMIRNOV TESTA.....	41
PREGLEDNICA XIV: PRIKAZ PEARSONOVEGA KOEFICIENTA KORELACIJE	42
PREGLEDNICA XV: REZULTATI KOLMOGOROV-SMIRNOV TESTA ZA DIAGNOSTIČNO SKUPINO 0.	43
PREGLEDNICA XVI: REZULTATI KOLMOGOROV-SMIRNOV TESTA ZA DIAGNOSTIČNO SKUPINO 1.....	43
PREGLEDNICA XVII: T-TEST DVEH NEODVISNIH VZORCEV.	44
PREGLEDNICA XVIII: ANALIZA VARIANCE KONCENTRACIJE ENDOTELINA.	44
PREGLEDNICA XIX: POVZETEK PRIMEROV ZA STATISTIČNO ANALIZO Z LOGISTIČNO REGRESIJO.	46
PREGLEDNICA XX: PRIKAZ SPLOŠNEGA ODSOTOKA VZORCA, KI SE JE UPORABIL ZA NADALJNJE IZRAČUNE.	46
PREGLEDNICA XXI: PARAMETRI VKLJUČENI V ENAČBO.....	46
PREGLEDNICA XXII: PARAMETRI, KI NISO VKLJUČENI V ENAČBO V KORAKU 0	47

PREGLEDNICA XXIII: VREDNOSTI NEODVISNIH SPREMENLJIVK	47
PREGLEDNICA XXIV: PRIKAZ HI-KVADRAT IN P VREDNOSTI KOEFICIENTOV MODELA.	48
PREGLEDNICA XXV: PRIKAZ VREDNOSTI KORELACIJ MED SPREMENLJIVKAMI.	48
PREGLEDNICA XXVI: PODATKI ZA IZRAČUN SPODNJE IN ZGORNJE MEJNE VREDNOSTI.	49
PREGLEDNICA XXVII: ŠTEVILO POZITIVNIH IN NEGATIVNIH TESTOV GLEDE NA DIAGNOZO.	50
PREGLEDNICA XXVIII: ANALIZA ROC ZA KONCENTRACIJO ENDOTELINA.....	52

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: PORAZDELITEV REZULTATOV ZA KONCENTRACIJO ENDOTELINA V OBEH SKUPINAH PREISKOVANK.	36
GRAF 2: HISTOGRAM FREKVENČNE PORAZDELITVE V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJ ENDOTELINA.	38
GRAF 3: PRIKAZ FREKVENČNE PORAZDELITVE V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE ENDOTELINA GLEDE NA DIAGNOSTIČNO SKUPINO.	40
GRAF 4: KVARTILNI DIAGRAM – PRIMERJAVA PORAZDELITVE REZULTATOV ZA KONCENTRACIJO ENDOTELINA KONTROLNE SKUPINE IN DIAGNOSTIČNE SKUPINE 1. MEJNA VREDNOST.	50
GRAF 5: ROC KRIVULJA ZA ENDOTELIN (PCOS/KONTROLA)..	52

1. UVOD

1.1.1. JAJČNIK (OVARIUM)

Jajčnik je ženska spolna žleza (gonada), kjer se razvijajo spolne celice in proizvajajo nesteroidni ter steroidni hormoni. Pri plodu je jajčnik retroperitonealno ležeči organ, ki se razvije pod ledvico. Tako kot modo tudi jajčnik potuje navzdol v fetalni dobi, vendar se ustavi v mali medenici in postane intraperitonealno ležeči organ (1).

1.1.1.1. ANATOMIJA in HISTOLOGIJA

Jajčnik leži na lateralni steni male medenice in v svoji legi visi, saj je pritrjen na okolico z vezmi. *Lig. ovarii proprium* je lastna jajčnikova vez, ki veže njegov maternični pol na tubarni kot maternice, *lig. suspensorium ovarii* pa veže njegov tubarni pol na lateralno steno male medenice in vsebuje žile za jajčnik (2). *Mesovarium* ali oporek je duplikatura potrebušnice, ki ga veže na zadnjo stran široke maternične vezi (*lig. latum uteri*), ta pa veže maternico na medenično steno (1).

Jajčnik je čvrst parni organ ovalne oblike, obdan z vezivno ovojnico in zgrajen iz skorje (*substantia corticalis*) in sredice (*substantia medullaris*). Skorja jajčnika je prežeta s čvrstim vezivnim tkivom (stroma), v katerem se nahajajo folikli, ki so v različnih razvojnih stadijih in v tesnem organskem ter folikularnem stiku s stromalnimi strukturami (1). Medularni del jajčnika pa je zgrajen iz elastičnih in kolagenskih vlaken, žil, živcev in mezgovnic. Tu so tudi *rete ovarii* – ostanki primarnih spolnih trakov in hilusne celice, ki so morfološko in funkcionalno podobne Leydigovim celicam testisov; včasih pa so prisotni tudi rudimentni ostanki Wolffovih vodov (3). Medialna površina jajčnika je obrnjena proti notranjosti medenice, lateralna pa proti medenični steni. Skozi lino (*hilus*), ki se nahaja na robu, s katerim je jajčnik pritrjen na mezovarij (*margo mesovaricus*) vstopajo in izstopajo žile, mezgovnice in živci (1).

Arteria ovarica izhaja iz trebušne aorte in jajčniku dovaja arterijsko kri. Le-to jajčnik pridobiva tudi prek maternične arterije, kar preprečuje ishemijo in omogoča povečan pritok krvi, ko je to potrebno, npr. med nosečnostjo (4).

Simpatično živčevje ovarija izvira iz spodnjega torakalnega dela, saj se embrionalna gonada razvije v predelu toraksa; parasimpatično živčevje ovarija pa je vaginalnega

porekla. vzdolž foliklov v vseh stopnjah razvoja tečeta tako simpatično kot parasimpatično nitje (4).

1.1.1.2. FOLIKLI

Naloga folikla je ohranjanje jajčne celice, ki mora dozoreti ter ustvarjanje primernih hormonskih pogojev za ustrezno pripravo maternične sluznice na vgnezditev zarodka. Jajčece je potrebno pravočasno sprostiti in omogočiti nastanek primerne rumenega telesca, ki bo vzdrževalo pogoje za nemoteno nosečnost v zgodnjem obdobju (2).

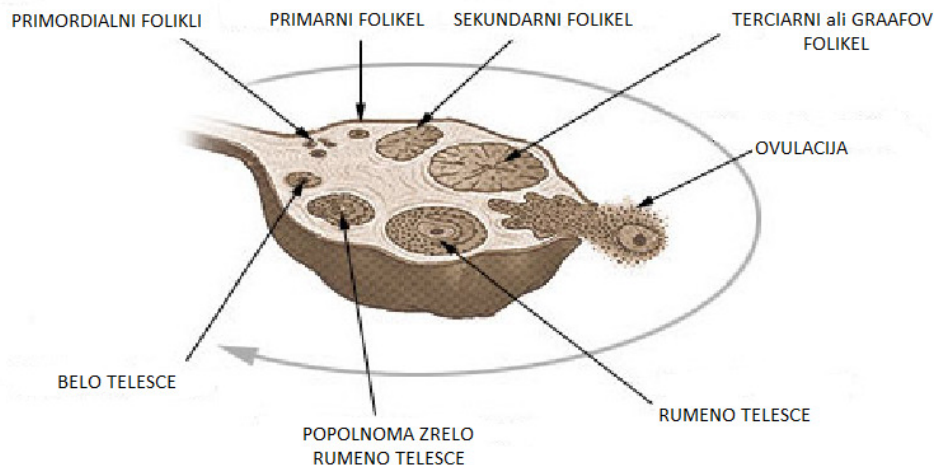
Mešički oziroma folikli se nahajajo v skorji jajčnika in so v različnih razvojnih stadijih (Slika 1):

- primordialni folikel – ima eno jajčno celico, obdano z eno plastjo ploščatih epitelijskih celic;
- primarni folikel – ima eno jajčno celico, obdano s plastjo kuboidnih epitelijskih celic; pri starejšem primarnem foliklu je epitelij večskladen;
- sekundarni folikel – ima večplasten epitelij s kuboidnimi celicami. Med primarnim oocitom in notranjo plastjo folikularnih celic je glikoproteinska membrana. V tem stadiju se med foliklovimi celicami začne nabirati tekočina;
- terciarni ali Graafov folikel – tekočina se zlije v eno kapljo znotraj votlinice, ki jo obdaja večskladni epitelij (1).

Skupina celic z oocitom štrli iz jajčnika, saj se folikel med zorenjem pomika proti njegovi površini. Okrog oocita so celice urejene žarkasto, vezivna stroma okrog folikularnega epitelijskega se preoblikuje in tvori žlezne celice (*theca interna*), katere izločajo estrogene, na zunanji strani pa jo obdaja vezivno tkivo in gladke mišične celice (*theca externa*) (3). Nad zrelim foliklom na površini jajčnika, kjer je stroma stanjšana, se pojavi bleda lisa. Na tem mestu med ovulacijo folikel počni in oocit, ki je obdan s *korono radiato* in *zono pelucida*, tekočina izplavi iz mešička (1). Rumeno telesce tvorijo celice večskladnega folikularnega epitelijskega in notranje teke, ki vsebujejo rumeno lipoidno snov in izločajo ženske steroidne hormone: progesteron in estrogen. Oocit prestrežejo jajcevodove fimbrije in če ne pride do oploditve se začne po 12 dneh rumeno telesce spreminjati v vezivno brazgotinasto belo telesce. V primeru oploditve pa se rumeno telesce poveča pod vplivom gonadotropinov in izloča več mesecev, dokler te vloge ne prevzame placenta. To imenujemo rumeno telesce nosečnosti (*corpus luteum graviditatis*), v katerem poleg estrogena in progesterona nastaja

tudi polipeptid relaksin, ki mehča simfizo in druge medenične sklepe ter maternični vrat, kar olajša porod (3).

Razmnoževanje oogonijev je končano že prenatalno, tako je ob rojstvu v obeh jajčnikih okrog sedemsto tisoč do dva milijona foliklov, vendar jih med menarho in klimakterijem dozori le nekaj sto, preostali pa propadejo in jih imenujemo atretični folikli (1).



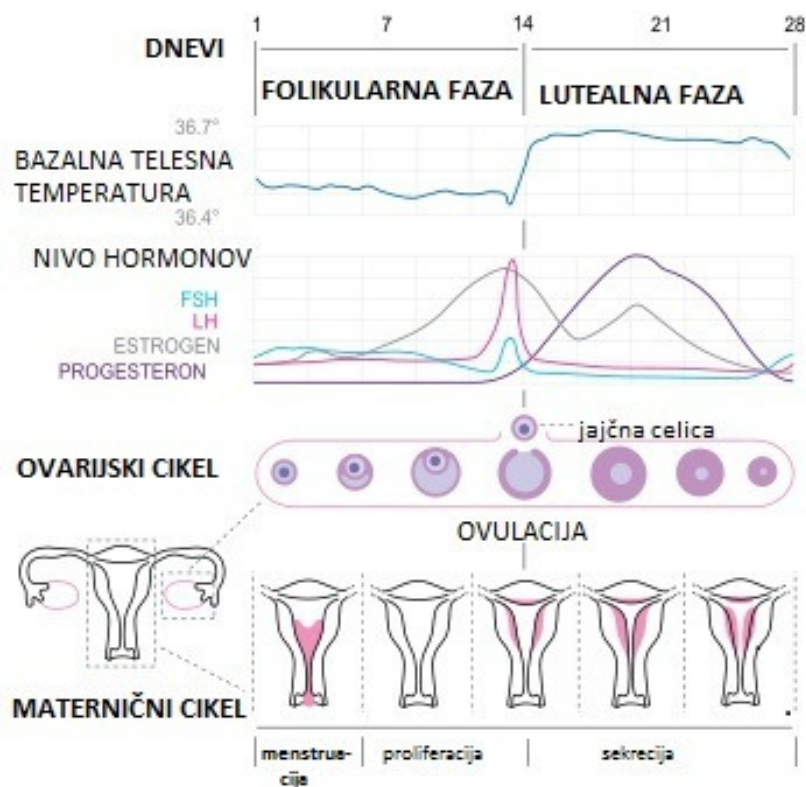
Slika 1: Jajčnik (ovarium) - prečni prerez (5).

1.1.2. FIZIOLOGIJA MENSTRUALNEGA CIKLA

Delovanje hipotalamo-hipofizno-ovarijskega sistema vpliva na periodično luščenje sekretorno spremenjene maternične sluznice oziroma endometrija.

Normalen menstruacijski cikel (Slika 2) je odvisen od uravnovešenega delovanja različnih dejavnikov. Uravnavajo ga:

- hipotalamus,
- možganski privesek (hipofiza),
- jajčnika (ovarija),
- maternična sluznica (endometrium) in drugi deli genitalnega trakta,
- mehanizem povratnih zvez ali medsebojnega delovanja med hipotalamusom, hipofizo in ovariji (feed back mehanizem) (3).



Slika 2: Normalen menstruacijski cikel (6). (*FSH – folikel stimulirajoči hormon; LH – luteinizirajoči hormon*).

1) Hipotalamus je predel vmesnih možganov (diencephalona), ki leži pod talamusom in v zagonih iz nevronov izloča decapeptid gonadoliberin (GnRH), ki se preko portalnega obtoka pretaka v hipofizo, kjer nadzira izločanje folikel stimulirajočega (FSH) in luteinizirajočega (LH) hormona (1). Sproščanje GnRH-ja je pulzatilno, posledično je sekrecija gonadotropinov odvisna od frekvenca njegovega sproščanja (4). Pri uravnavanju izločanja GnRH-ja so glavni nevrottransmiterji kateholamini, serotonin, melatonin in endogeni opijati (7).

2) Adenohipofiza izloča tri gonadotropne hormone – FSH, LH in PRL (prolaktin) - ti so glikoproteini, ki po krvnem obtoku pridejo do reproduktivnega in endokrinega dela jajčnikov ter drugih spolnih organov, kjer s pomočjo spolnih steroidov vplivajo na fiziološke procese in reprodukcijo (8).

FSH vzpodbuja delitev granuloznih celic, nastajanje FSH- in LH-receptorjev, pospešuje steroidogenezo in izločanje estradiola v rumenem telescu ter spreminja učinek lokalnih dejavnikov (3). Odgovoren je za folikularno fazo ovarijskega ciklusa, saj vzpodbudi zorenje nekaj foliklov, od katerih se eden preoblikuje v vodilnega, ob tem pa se večja količina estrogenov v krvi, kar ob določeni koncentraciji vzpodbudi hipotalamus za sproščanje GnRH-ja in s tem LH-ja (prim. mehanizem medsebojnega delovanja) (4).

LH vzpodbuja steroidogenezo v celicah teke foliklov, sproži ovulacijo, vzpodbuja in ohranja delovanje rumenega telesa ter sodeluje pri dogajanju lokalnih dejavnikov (1). Po ovulaciji vpliva na delovanje rumenega telesa, ki izloča progesteron in estrogene (3).

PRL vpliva na laktacijo, učinkuje na reproduktivni sistem in sodeluje pri uravnavanju metaboličnih procesov, bilance tekočin in pri prilagajanju organizma na stres (1, 4).

3) Jajčnika tvorita spolne hormone, in sicer estrogene (estradiol, estron in estriol), progesteron in androgene, katerih prekursor za sintezo je holesterol. V stromi jajčnika in v celicah teke foliklov pod vplivom LH-ja nastajajo androgeni, ki se v folikularni fazi ciklusa v granuloznih celicah spreminjajo v estrogene pod vplivom encima aromataze (1). V tem obdobju razvoja folikla so celice granuloze odvisne od FSH, ki aktivira aromatazo. Gre za dvocelični sistem steroidogeneze, saj androstendion in testosteron vstopita v kapilarni krvni obtok v zunanjem sloju vezivne ovojnice, ki obdaja folikle, nato prestopita bazalno membrano in se spremenita v estradiol v zrnatih celicah (3).

Pod vplivom FSH-ja se v menstruacijskem ciklusu začne razvoj primordialnih foliklov, nato se iz skupine sekundarnih foliklov le eden razvije v Graafov folikel, kar je odvisno od naslednjih faktorjev:

- folikel sam izloča zadostno količino estrogenov in postane neodvisen od gonadotropinske stimulacije;
- prek negativne povratne zveze zvišan estrogen iz tako razvitega folikla zavre sproščanje FSH-ja, kar posledično vodi v propad drugih, manj zrelih foliklov, ki so še odvisni od gonadotropinske stimulacije (4).

V preovulatornem obdobju predstavljata estradiol in 17-hidroksiprogesteron ovarijski signal za pozitivni mehanizem medsebojnega delovanja, kateremu sledi ovulacijski vrh LH-ja in FSH-ja, saj se takrat v ovariju povečajo količine prostaglandinov, kar s kolagenazo in plazminom povzroči ovulacijo. Takoj po ovulaciji se v votlinico

razpočenega terciarnega folikla izlije kri, tako da lahko govorimo o rdečem telescu. Granulozne celice se spreminjajo v velike luteinske celice, ki vsebujejo pigment lutein in lipide, ki pod vplivom LH-ja v rumenem telescu tvorijo progesteron, estrogene in prostaglandin F₂ (3).

V medsebojnem delovanju se zaradi povišanega nivoja progesterona v krvi pojavi zaviralni učinek na hipotalamus in hipofizo, posledično (mehanizem dolge povratne zveze) začne izločanje LH-ja upadati, kar vodi do spremembe rumenega telesca v brazgotinasto belo telesce; sledi menstruacija.

V jajčniku se tvorijo gonadni peptidi inhibin, aktivin, rastni dejavniki in ostali peptidi, ki pospešujejo ali zmanjšujejo učinke FSH-ja in LH-ja.

- Inhibina A in B – nastajata v granuloznih celicah foliklov in selektivno zavirata izločanje FSH-ja iz hipofize;
- inzulinu podobni rastni faktorji (insulin growth factor IGFI in IGFII) – pospešujejo razvoj celic granuloze v foliklih, delovanje encima aromataze, nastajanje progesterona in inhibinov;
- aktivin – pospešuje izločanje FSH;
- folostatin – zavira delovanje aktivina (1, 3, 4, 8).

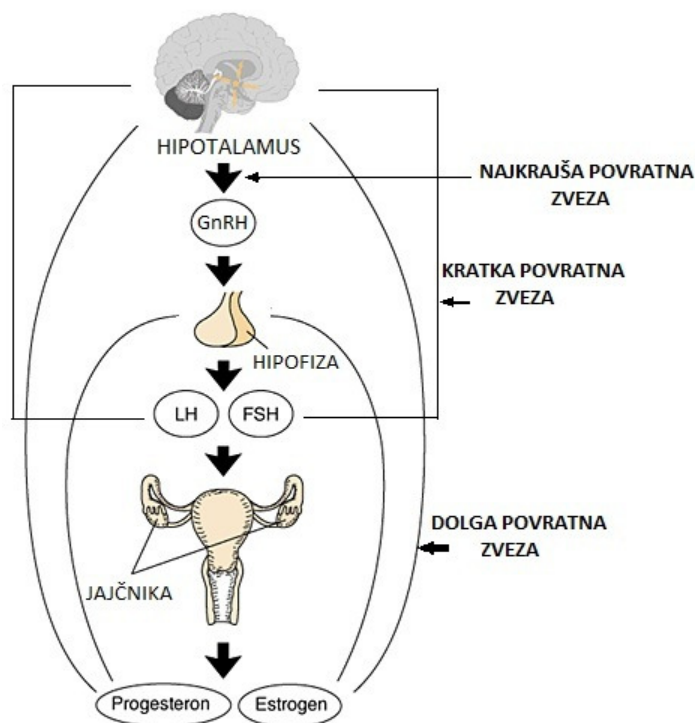
1.1.3. MEHANIZEM POVRATNIH ZVEZ ALI MEDSEBOJNEGA DELOVANJA

Na povratnih zvezah temelji usklajeno delovanje med hipotalamusom, hipofizo in ovarijskimi hormoni (Slika 3). Peptidonergični nevroni hipotalamusa imajo lastnosti živčne in žlezne celice in posledično odgovarjajo tako na humoralne dražljaje (steroidi, metaboliti) kot na nevrottransmitterje znotraj centralnega živčnega sistema. Nevroni, ki izločajo GnRH, dobivajo tri vrste humoralnih signalov, in sicer:

1. od perifernih ciljnih žlez – **dolga povratna zveza**;
2. od hipofize – **kratka povratna zveza**;
3. od samega GnRH – **ultr kratka povratna zveza (7)**.

V primeru, ko povečano izločanje ovarijskih hormonov zavira delovanje hipotalamusa (izločanje GnRH-ja) in hipofize (izločanje FSH-ja in LH-ja) govorimo o dolgi negativni povratni zvezi. Takrat visoke vrednosti progesterona potencirajo negativni efekt estradiola. Pozitivna povratna zveza pa se zgodi v predovulatornem obdobju, saj takrat višje vrednosti estrogenih hormonov delujejo spodbudno, tako da začneta hipotalamus in hipofiza usklajeno izločati hormone.

Medsebojno učinkovanje med gonadotropnima hormonoma hipofize in gonadoliberinom iz hipotalamusa predstavlja kratko povratno zvezo. Pri kratki negativni povratni zvezi gre za vpliv gonadotropinov na razgradnjo GnRH-ja, saj LH aktivira peptidaze v hipotalamusu. Ultrakratki feed-back mehanizem pa predstavlja to, da sproščanje GnRH-ja kontrolira tudi svojo lastno sintezo (1, 3, 4, 7, 9).



Slika 3: Prikaz delovanja povratnih zvez hipotalamus-hipofiza-ovarij (10).
(*GnRH* – gonadoliberin, *LH* – luteinizirajoči hormon, *FSH* – folikel stimulirajoči hormon).

1.2. SINDROM POLICISTIČNIH OVARIJEV

Sindrom policističnih ovarijev (PCOS) je najpogostejša endokrinopatija v rodnem obdobju žensk, ki sta jo prvič opisala Chereau in Rokitansky leta 1844, Stein in Leventhal pa sta leta 1935 objavila prvi članek, ki policistične ovarije povezuje z amenorejo (11). PCOS je precej heterogen sindrom, ki prizadane 5-10 % žensk v rodnem obdobju, za katere sta značilni motena ovulacija in hiperandrogenizem, kar vpliva na reproduktivno zdravje, razvoj presnovnih motenj in srčno-žilnih obolenj ter psihološko stanje prizadetih žensk (12).

1.2.1. OPREDELITEV SINDROMA POLICISTIČNIH OVARIJEV

Zaradi spremenljivosti simptomov in same heterogenosti sindroma sta opredelitev in diagnosticiranje dokaj težavna; posledično je bilo izoblikovanih več definicij:

1. V letu 1990 so na ekspertni konferenci National Institutes of Health (NIH) izoblikovali "klasično" opredelitev sindroma, ki vključuje vse naštet: 1. oligo-/amenoreja, 2. androgenizacija (klinični in/ali laboratorijski znaki), 3. izključitev drugih bolezni, ki povzročajo podobno klinično sliko (moteno delovanje ščitnice, Cushingov sindrom, tumor nadledvičnice) (13).
2. V letu 2003 so v soglasju med European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) in American Society for Reproductive Medicine (ASRM) izoblikovali razširjena ("rotterdamska") merila. Opredelitev, po izključitvi bolezni, ki povzročajo podobno klinično sliko, vključuje 2 od naslednjih 3 meril: 1. policistični ovariji na ultrazvoku (v vsaj enem jajčniku mora biti najmanj 12 foliklov s premerom 2-9 mm ali z ovarijskim volumnom večjim od 10 ml), 2. oligo-/amenoreja, 3. hiperandrogenizacija (klinični in/ali laboratorijski znaki) (12, 14).
3. V letu 2006 je delovna skupina Androgen Excess Society (AES) oblikovala najnovejša merila sindroma, ki vključujejo vse naštet: 1. oligo-/amenoreja in/ali policistični ovariji, 2. čezmerna poraščenost in/ali hiperandrogenemija, 3. izključitev drugih bolezni, ki so posledica presežka androgenov oziroma povzročajo podobno klinično sliko (11, 15).

1.2.2. MOTNJE PRI BOLNICAH S SINDROMOM POLICISTIČNIH OVARIJEV IN UKREPI ZA ZDRAVLJENJE

1.2.2.1. REPRODUKTIVNE MOTNJE BOLNIC S PCOS

Pri bolnicah s PCOS so reproduktivne motnje zelo pogoste, saj se moteno delovanje ovarijev odraža v abnormalni folikulogenezi in steroidogenezi. Opis posameznih motenj in ukrepanje ter zdravljenje v primeru le-teh so opisani v Preglednici I.

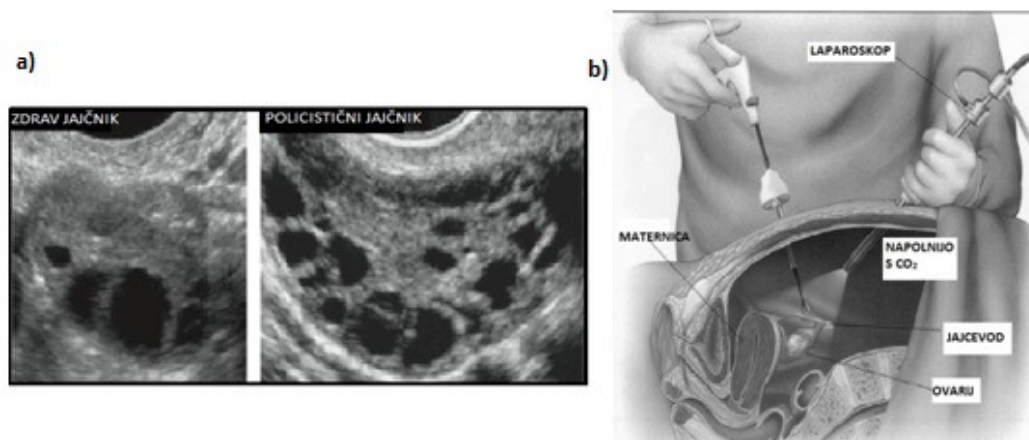
Preglednica I: Reproductive motnje bolnic s PCOS in njihovo zdravljenje.

<i>motnja</i>	<i>značilnosti</i>	<i>ukrepi za zdravljenje</i>
1. MOTNJE MENSTRUALNEGA CIKLA	<ul style="list-style-type: none"> - disfunkcija ovarijev, - posledica povišanih androgenov, - inhibirana folikulogeneza, - ženske z amenorejo – v 30-40 % PCOS (<i>sindrom policističnih ovarijev</i>), - oligoamenoreja (6 ali manj krvavitev/leto) – pri 85-90 % PCOS bolnic (13). 	<ul style="list-style-type: none"> - znižanje telesne teže za 5-10 % - vzpostavljeni redni menstrualni ciklusi, - kontracepcijske tablete - redne mesečne menstrualne krvavitve in zmanjšana možnost karcinoma maternične sluznice, - progesteronske tablete (npr. medroksiprogesteron acetat) vsak mesec, 10 do 14 dni, če PCOS bolnica želi zanositi – ravno tako dosežemo redne menstrualne krvavitve in nižjo možnost razvoja raka materničnega vratu (16).
2. MOTEN RAZVOJ FOLIKLOV	<ul style="list-style-type: none"> - v večji meri prisotni sekundarni in terciarni folikli, - znižana koncentracija FSH-ja (<i>folikel stimulirajoči hormon</i>) ustavi rast foliklov, - povišani koncentraciji estrogena in inhibina zavirata izločanje FSH-ja iz hipofize - ne pride do selekcije dominantnega folikla (17), - nastanejo policistični ovariji (Slika 4a): <ul style="list-style-type: none"> 1. povečan volumen nad 10 ml/najmanj 12 foliklov (premer 2-9 mm) v povečani stromi jajčnika (18), 2. za 50 % debelejša ovojnica (<i>tunica albuginea</i>) – zadebeljena ovarijska kapsula, 3. hiperplazija hilusnih celic, 4. UZ (<i>ultrazvočna</i>) slika: primordijalni folikli zastopani v manjši meri; prevladujejo atretični in rastoči primarni folikli (18, 19). 	<ul style="list-style-type: none"> - znižanje telesne teže za 5-10 % - vzpostavljena ovulacija in redni menstrualni ciklusi, - glej zdravljenje neplodnosti.

<p>3. NEPLODNOST</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PCOS verjetno najpogostejši vzrok neplodnosti, - anovulacija (pogosto skupaj z inzulinsko rezistenco in debelostjo), - povečano tveganje za spontani splav (pri spontani/umetni oploditvi), - razvoj sindroma hiperstimulacije jajčnikov pri oploditvi z biomedicinsko pomočjo, - nosečnice s PCOS bolj podvržene zapletom - gestacijski diabetes, preeklampsija, nosečniška hipertenzija in prezgodnji porod (20, 21). 	<ul style="list-style-type: none"> - znižanje telesne teže za 5-10 % - zniža raven androgenov, ponovna vzpostavitev ovulacije in možnost zanositve, - klomifen citrat stimulira jajčnike k proizvajanju enega ali več jajčec (80 % do ovulacije; 50 % tudi do oploditve), - letrozol - nesteroidni inhibitor aromataze - zmanjšana proizvodnja estrogenov vodi v povečano izločanje FSH iz hipofize – indukcija ovulacije (22), - ¹metformin (bigvanid), poskusno tudi rosiglitazon in pioglitazon (tiazolidindiona) – za nižanje ravni inzulina /povečevanje občutljivosti perifernih tkiv za inzulin - povečanje števila ovulacij, vzpostavitev cikličnih menstrualnih krvavitev in plodnosti, - gonadotropini - agresivnejši način zdravljenja, 10 dni prejema injekcije LH (<i>luteinizirajoči hormon</i>) in/ali FSH, nato eno od pomožnih metod oploditve (ovulacija pri vseh, zanositev v 60 %) (22), - ²laparoskopija - kirurški način zdravljenja, pri bolnicah, ki niso odzivne na ostale metode; 80-87 % možnosti za zanositev.
--	---	--

¹ Glavni učinek metformina je zmanjšanje glukoneogeneze v jetrih, s čimer se poveča občutljivost za inzulin in zmanjša njegova serumska koncentracija ter spodbujanje tvorbe androgenov v teka celicah jajčnika. Metformin za indukcijo ovulacije uporabljajo bodisi samega bodisi v kombinaciji s klomifen citratom. Tiazolidindioni znižajo jetrno proizvodnjo glukoze in povečajo občutljivost za inzulin v jetrih, skeletnih mišicah in maščevju, saj so agonisti PPAR- γ receptorjev (*ang. peroxisome proliferator activated receptor gamma*). Kontraindikacije za zdravljenje z metforminom so ledvična insuficienca, hepatopatija in srčno popuščanje zaradi nevarnosti nastanka laktacidoze (23).

² Laparoskopija (Slika 4b) se danes redkeje uporablja, saj je na razpolago veliko drugih medicinskih možnosti ter zaradi same invazivnosti metode in tveganj, ki jo spremljajo. V splošni endotrahealni anesteziji, s tehniko treh vbodnih mest, z monopolarno električno iglo in energijo 300 W na vsakem jajčniku naredijo od 5 do 15 punktacij v trajanju 4 sekunde (24, 25).



Slika 4: a) Ultrazvočni sliki zdravega in policističnega ovarija (10) ter b) laparoskopija elektrokoagulacija jajčnikov (LEKO) (26).

1.2.2.2. ENDOKRINE MOTNJE BOLNIC S PCOS

Posledice PCOS so anomalije v mehanizmu medsebojnega delovanja med GnRH/LH in ovarijskimi androgeni. Opis posameznih motenj in ukrepanje ter zdravljenje v primeru le-teh so opisani v Preglednici II.

Preglednica II: Endokrine motnje in zdravljenje pri bolnicah s PCOS.

<i>motnja</i>	<i>značilnosti</i>	<i>ukrepi za zdravljenje</i>
1. HIPERSEKRECIJA LH in HIPOSEKRECIJA FSH	<ul style="list-style-type: none"> - povišana serumska koncentracija LH (40-60 % PCOS bolnic) - zmanjšana možnost zanositve, večja nevarnost spontanega splava (9), - LH povišan zaradi neurejenega sproščanja hormona, povišane bioaktivnosti LH, prevlade osnovne izooblike hormona (22), - hipersekrecija LH v pozitivni korelaciji s povišano serumsko koncentracijo androstendiona, testosterona in 17-hidroksiprogesterona (20), - zaradi višje frekvence izločanja GnRH (<i>gonadoliberin</i>) v zagonih se zmanjša izločanje FSH - nastanek več malih foliklov v ovariju, povišan inhibin, hiperprodukcija estrogena (9). 	<ul style="list-style-type: none"> - navkljub specifičnosti povišanega LH se meritev koncentracije ne uporablja pri postavitvi diagnoze (17, 23).

<p>2. HIPERANDRO- GENIZEM (aknavost, hirsutizem, androgena alopecija, klitoromegalija)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - primarna klinična manifestacija neurejene produkcije steroidov, - povišana serumska koncentracija celokupnega ali prostega testosterona (60-80 % bolnic) (19), - posledica hipersekrecije LH, - 1/3 žensk s PCOS ima ³<i>acne vulgaris</i> - kronično vnetje žlez lojnic (13) na obrazu, manj pogosto na hrbtu in prsih, - poraščenost moškega tipa pri ženskah (60-90 % bolnic) (12) – sinteza dihidrotestosterona v koži neposredno stimulira lasni mešiček in rast dlak (20) – stopnja hirsutizma odvisna od genske zasnove in rasne pripadnosti (kvaliteta, dolžina, premer in pigmentacija dlak) (13), - alopecija se lahko paradokсно pojavlja skupaj z hirsutizmom – zaradi pretvorbe dehidroepiandrosterona in testosterona v dihidrotestosteron (20) – normalne lase nad čelom in na temenu začnejo nadomeščati tanki in puhasti lasje, lasna linija se pomika navzgor (12), - hipertrofijo klitorisa težko točno definirati (~ko velikost preseže 35 mm²) (20). 	<ul style="list-style-type: none"> - kombinirani oralni kontraceptivi (estrogen in progestin) - znižano nastajanje moških hormonov, progestini delujejo antiandrogeno, preprečujejo proliferacijo endometrija (posledica oligo-/amenoreje), - spironolakton (100-200 mg dnevno/21-dni/7-dni premora) - kompetitivni zaviralec androgenih receptorjev (zavira izločanje iz ovarija + povečuje očistek androgenov); sinergistično s kombiniranimi oralnimi kontraceptivi, - drospirenon (analog spironolaktona) - z estrogenom v kombiniranih oralnih kontraceptivih, - ciproteron acetat (z estrogenom) - kompetitivno zavira vezavo testosterona in 5α-dihidrotestosterona na androgeni receptor, - finasterid - kompetitivni inhibitor 5α-reduktaze tipa 2 (za pretvorbo testosterona do dihidrotestosterona) – niža koncentracijo cirkulirajočega dihidrotestosterona, - eflornitin hidroklorid - topikalno za obrazni hirsutizem - inhibira ornitin dekarboksilazo (za delitev celic v lasnem foliklu in rast dlak), - flutamida in glukokortikoidov se v Sloveniji ne uporablja za zdravljenje PCOS (23, 27).
<p>3. AKANTOZA (<i>lat. acanthosis nigricans</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - kožno obolenje (3% žensk s PCOS) (13), - hiperpigmentacija in hiperkeratoza kože (tilnik, pazduhe, pregibni deli telesa) (12), - v povezavi z inzulinsko rezistenco, hiperinzulinemijo, - maligna/benigna oblika - posledica diabetesa tipa II ali hiperinzulinemije - benigna oblika obolenja (20). 	<ul style="list-style-type: none"> - prvotno zdravimo obolenje, ki je povzročilo akantozo, ne videza kože.

³ Androgeni (testosteron, androstendion, dehidroepiandrosteron (DHEA) in njegov sulfat (DHEAS)) ovarijskega in/ali adrenalnega izvora stimulirajo žleze lojnice, ki nato sodelujejo pri pretvorbi cirkulirajočih androgenov v aktivne metabolite (predvsem dihidrotestosteron), kateri povzročijo povečanje žlez lojnic, povečano izločanje loja in rast keratinocitov. Lojnice se zamašijo s čepki iz loja in odluščenih celic kože, kar ovira iztekanje loja; posledično se lasni mešički izbočijo. V zamašene lojnice se naselijo *Propionibacterium acnes* – bakterije, ki so sicer del normalne kožne flore; v mešičku razkrajajo sebum (ta postane bolj viskozen) in stimulirajo vnetje (28).

1.2.2.3. PRESNOVNE MOTNJE BOLNIC S PCOS

Večina bolnic s PCOS ima poleg reproduktivnih in endokrinih motenj tudi metabolične motnje, ki so opisne v Preglednici III.

Preglednica III: Presnovne motnje in zdravljenje pri bolnicah s PCOS.

<i>motnja</i>	<i>značilnosti</i>	<i>ukrepi za zdravljenje</i>
1. ⁴METABOLNI SINDROM oz. SINDROM X	- povezava dejavnikov tveganja za kardiovaskularna obolenja z inzulinsko rezistenco, hiperinzulinemijo, abdominalno debelostjo, hipertenzijo in aterogeno dislipidemijo + povečano tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa II (29, 30).	- nefarmakološki in farmakološki ukrepi za zdravljenje posameznih motenj
2. ⁵INZULINSKA REZISTENCA (IR)	- posledica debelosti (pri ženskah s PCOS v območju od 25 % do 60 % - različni diagnostični kriteriji, etnična pripadnost (12), - predstopnja sladkorne bolezni tipa II, tveganja za kardiovaskularna obolenja, hipertenzijo in endotelijsko disfunkcijo (ateroskleroza/krajša življenjska doba) (31), - k nastanku prispevajo zmanjšan jetrni očistek, povečana občutljivost trebušne slinavke, rezistenca perifernih tkiv.	- oralni tolerančni test za glukozo (OGTT – <i>ang. oral glucose tolerance test</i>) – klinična ocena motene tolerance za glukozo in ugotavljanje sladkorne bolezni (28), - znižanje telesne teže za 5-10 % - zmanjšanje inzulinemije, spodbujanje androgeneze v jajčnikih (31), - metformin – vpliv direktno na steroidogenezo v ovariju, posredno pa prek zmanjšanja glukoneogeneze v jetrih.
3. APNEJA MED SPANJEM	- onemogočeno normalno dihanje med spanjem (30-55 % žensk s PCOS) (29), - močno smrčanje + kratke periode, ko se dihanje popolnoma ustavi – 10 s do 1 min/večkrat na noč (mišice jezika in zgornjih dihalnih poti se med vdihih sesedejo, preprečijo tok zraka), - označevalec IR (32).	- normalizacija telesne teže, - ukrepi, ki preprečujejo smrčanje (življenjski slog), - kirurška terapija (nos, žrelo) (29).

⁴ METABOLNI SINDROM oz. SINDROM X – za opredelitev po merilih "The National Cholesterol Education Program" morajo biti prisotne vsaj tri od navedenih lastnosti: abdominalna debelost, hipertrigliceridemija, nizka vrednost HDL-a, prediabetes (IFG) in visok krvni tlak (29,30).

⁵ Pri ženskah s PCOS je inzulinska rezistenca zastopana v približno 71% in tako predstavlja najbolj pogosto presnovno motnjo teh bolnic (32). Rezistenca perifernih tkiv na inzulin je posledica nepravilnosti pri prenosu signala po vezavi na receptor, saj je zmanjšana tirozin-kinazna aktivnost receptorja in posledično inhibirana normalna signalna pot, kar rezultira v značilno zmanjšani odzivnosti na inzulin (31).

<p>4. HIPERINZULINEMIJA</p>	<p>- debelost žensk s PCOS + napake pri sintezi/sekreciji inzulina + IR (19),</p> <p>- povečana serinska fosforilacija inzulinskega receptorja:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. znižan IGFBP-1 (<i>ang. insulin-like growth factor-binding protein-1</i>) - periferno zvišan IGF-1 (<i>ang. Insulin-like growth factor</i>); 2. inhibirana jetrna sinteza SHBG (<i>ang. Sex hormone-binding globulin</i>) – zvišani prosti androgeni v krvi; 3. povečana serinska fosforilacija encima P450c17α – poveča biosintezo androgenov v ovarijskih teka celicah, <p>-inzulin spodbuja izločanje LH (hipofiza) in skupaj z njim tvorbo androgenov (v jajčnikih) (12).</p>	<p>- z zmanjševanjem IR se zmanjšata inzulinemija in spodbujanje androgenoze v jajčnikih (31),</p> <p>- znižanje telesne teže,</p> <p>- metformin – vpliv direktno na steroidogenezo v ovariju, posredno pa prek zmanjšanja glukoneogeneze v jetrih (27).</p>
<p>5. DISLIPIDEMIJA</p>	<p>- hiperlipidemija - serumska koncentracija holesterola in/ali trigliceridov zvečana,</p> <p>- presnovne motnje z znižano serumsko koncentracijo HDL (<i>lipoproteini visoke gostote</i>)/spremenjeno sestavo posameznih lipoproteinov,</p> <p>- 85 % žensk s PCOS,</p> <p>- bolnice z IR - inzulin v pozitivni korelaciji s celokupnim holesterolom, LDL (<i>lipoproteini nizke gostote</i>) in TG (<i>trigliceridi</i>); v negativni korelaciji z HDL (30).</p>	<p>- zmanjšanje telesne teže in sprememba življenjskega sloga (zdrava prehrana, vsakodnevna telesna aktivnost itd.),</p> <p>- metformin (pomaga tudi pri hujšanju).</p>
<p>6. DEBELOST</p>	<p>- prekomerna telesna teža (ITM (<i>indeks telesne mase</i>) > 25 kg/m²); debelost (ITM > 27 kg/m²) – 50 % žensk s PCOS,</p> <p>- povečanje razmerja obsegov pas/boki, centralna razporeditev maščobnega tkiva, obilica visceralnega maščevja (še posebej aterogeno) (12),</p> <p>- 30 % ima moteno toleranco za glukozo - tveganje za sladkorno bolezen tipa II.</p>	<p>- OGTT - spremljanje klinične slike debelih PCOS žensk,</p> <p>- spodbujanje k zmanjšanju telesne teže,</p> <p>- sprememba življenjskega sloga in prehrane.</p>

<p>7. TVEGANJE ZA SRČNO-ŽILNA BOLENJA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - dejavniki tveganja: IR, centralna debelost, dislipidemija, povišan krvni tlak, hiperhomocisteinemija, zadebeljena intima-media, poslabšana elastičnost ožilja (11, 21, 32), - pomenopavzne ženske s PCOS - večja prevalenca arterijske hipertenzije (32), - predklinični pojavi ⁶ateroskleroze: zadebeljena intima-media karotidnih arterij in endotelna disfunkcija (11). 	<ul style="list-style-type: none"> - zaviralci angiotenzinske konvertaze (npr. lizinopril) in zaviralci angiotenzinskih receptorjev (npr. telmisartan) – ugodni učinki na krvni tlak in serumske androgene, - metformin – ugoden učinek na raven serumskega renina, - spironolakton – izboljšana endotelna funkcija pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (kontraindiciran pri sladkorni bolezni tipa II) (11).
---	---	--

1.2.2.4. RAZVOJ RAKA V POVEZAVI S PCOS

Pri bolnicah s PCOS poročajo o nekoliko bolj zastopanih tipih rakavih obolenj, kot so rak endometrija (tip 1 – hormonsko odvisen), rak dojke, endometrijski stromalni sarkom in karcinosarkom ter rak jajčnika. Za natančnejšo opredelitev relativnega tveganja so potrebne dodatne študije na tem področju. Pri ugotavljanju korelacije med PCOS-om in tveganjem za razvoj kateregakoli tipa rakavega obolenja bi bila največja težava v pridobivanju dejanske kontrolne skupine tem pacientkam.

S povečano incidenco endometrijskega karcinoma sta povezani tudi debelost in diabetes teh bolnic, zato je nekoliko težje opredeliti prispevek posamezne motnje k razvoju raka. V primeru podaljšane in težke menstrualne krvavitve je potrebno narediti biopsijo endometrija ali histeroskopijo in kiretažo maternice (20).

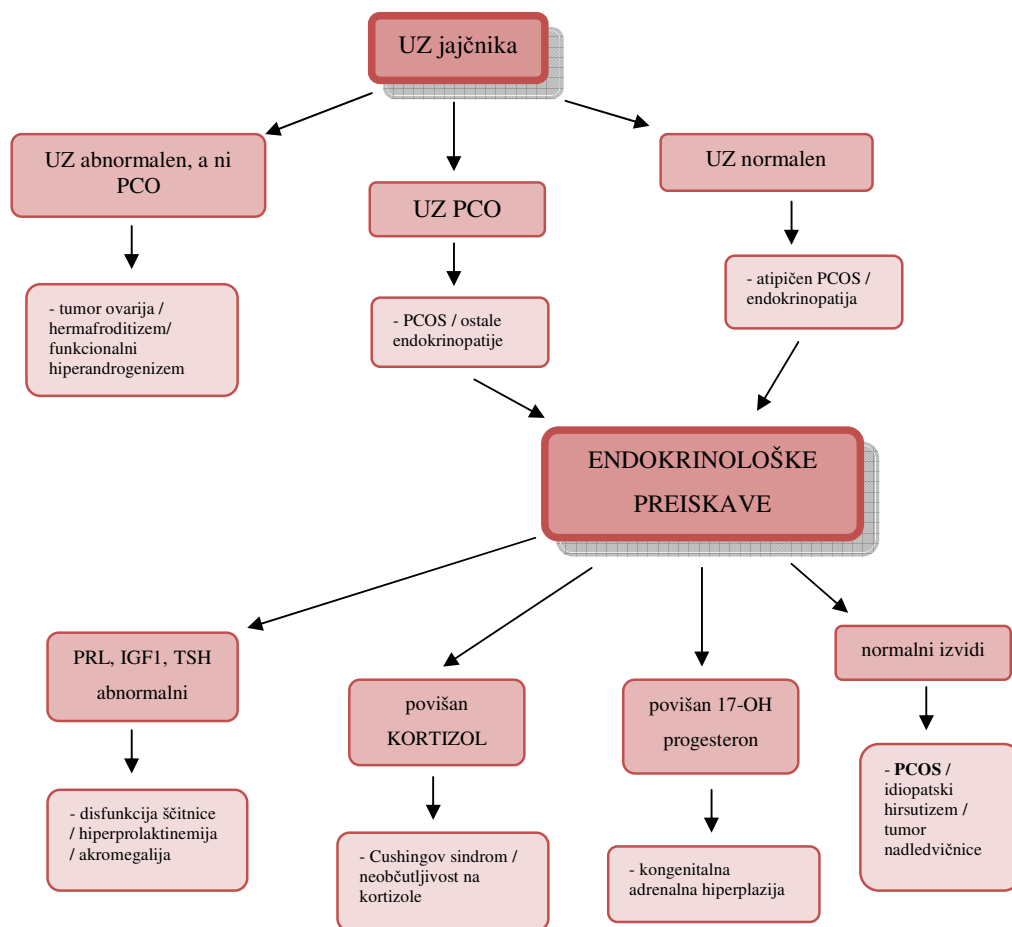
⁶ VLOGA METABOLIČNO AKTIVNIH PEPTIDNIH HORMONOV IN ADIPOCITOKINOV – pomembno patogenetsko vlogo imajo TNF- α (dejavnik tumorske nekroze- α), IL-6 (interlevkin-6), adiponektin in leptin. To so proteini, ki se med drugim izražajo v presnovno aktivnih tkivih (belo in rjavo adipozno tkivo, skeletno mišičje) in regulirajo metabolizem lipidov ter vplivajo na uravnavanje teka, porabe energije, občutljivosti tkiv na inzulin, odgovora na stres, spolnega dozorevanja in reprodukcije (33). Pri bolnicah s PCOS, ki so imele dokazano inzulinsko rezistenco so v eni od raziskav opazovali pozitivno korelacijo med endotelno disfunkcijo in povišanimi vrednostmi testosterona (11). Zmanjšana sinteza dušikovega oksida (NO) v endoteliju, povečana inaktivacija NO po sprostitvi iz endotelijskih celic in povečana tvorba vazokonstriktorskih dejavnikov so glavni mehanizmi razvoja endotelne disfunkcije. Med vazokonstriktorskimi dejavniki je za nastanek ateroskleroze in hipertenzije v veliki meri odgovoren endotelin-1, ki nastaja v endotelijskih celicah in gladkih mišičnih celicah krvnih žil. V kliničnih raziskavah so ugotovili povišane plazemske koncentracije endotelina pri ženskah s PCOS (ne glede na telesno težo) in pozitivno korelacijo med plazemskimi koncentracijami prostih androgenov in endotelina. Ena od signalnih poti, prek katere inzulin po vezavi na inzulinski receptor posreduje svoje učinke, je MAP (*ang. mitogen-activated protein*) kinazna pot – vpliva na rast in mitogenezo ter spodbujanje tvorbe endotelina-1 v žilnem endoteliju in posledične vazokonstrikcije (11).

1.2.3. DIAGNOSTIKA PCOS

Zaradi heterogenosti sindroma je za diagnostično oceno potreben strukturiran pristop (Shema 1) k temeljitemu pregledu pacientovega dosedanjega zdravstvenega stanja. Diagnoza PCOS-a temelji na anamnezi in zdravniškem pregledu, biokemijskih testih in ultrazvočnem pregledu jajčnikov (23).

DIAGNOSTIČNA OCENA

1. ANAMNEZA: za osebno anamnezo so pomembni sledeči podatki: teža ob rojstvu, hitra rast, debelost v otroštvu/adolescenci, prezgodnja adrenaarha (spolna poraščenost), čas menarhe, karakteristike menstrualnega ciklusa, simptomi hiperandrogenizma, neplodnost in spontani splavi; za družinsko anamnezo pa so pomembni podatki o PCOS, sladkorni bolezni, debelosti, hiperandrogenizaciji, subfertilnosti in prezgodnji plešavosti pri moških sorodnikih.
2. ZDRAVNIŠKI PREGLED: opravi se sistematski zdravniški pregled, ocena debelosti (teža, višina, ITM (*indeks telesne mase*), obseg bokov in pasu ter njuno razmerje), ocena hiperandrogenizma - aknavost obraza, abdominalna poraščenost, seboreja, mastna koža in lasje, alopecija. Opravijo tudi transvaginalni pregled debeline endometrija in ultrazvočni pregled jajčnikov, ki je neobhodna in najenostavnejša metoda pri diagnozi PCOS, za katero mora imeti vsaj eden jajčnik najmanj 12 foliklov z premerom 2-9 mm oziroma z volumnom večjim od 10mL.
3. PREISKAVE: opravljajo se endokrinološke preiskave za opredelitev hormonskega statusa: FSH, LH, E2 (*estradiol*), celokupni in prosti testosteron, SHBG (*ang. Sex hormone-binding globuline*), DHEAS, 17-OH-progesteron in androstendion. Naredijo se še OGTT (*oralni tolerančni test za glukozo*), meritve inzulina na tešče ter nekatere dinamični testi za diferencialno diagnozo PCOS napram drugim endokrinološkim motnjam. Opravljajo se tudi meritve nekaterih potencialnih snovi za določanje IR (*inzulinska rezistenca*), kot so homocistein, PAI (*ang. plasminogen activator inhibitor*) in adiponektin, a klinična uporabnost teh meritev v te namene še ni potrjena (20).



Shema 1: Diagnostična shema (34). (UZ – ultrazvok, PCO – policističen ovarij, PCOS – sindrom policističnih ovarijev, PRL – prolaktin, IGF1 – inzulinu podoben rastni faktor I, TSH – tireotropin).

Biokemijske analize so nujne pri ženskah s prekomerno telesno težo, izrazitim hirsutizmom in aknavostjo, neodzivno na zdravljenje, ter pri adolescentkah, ki imajo v prvih dveh letih po menarhi amenorejo/oligomenorejo ali neredne menstrualne krvavitve.

Zaradi variabilnosti sindroma so raziskave, terapija in spremljanje zdravstvenega stanja bolnic individualizirani (34).

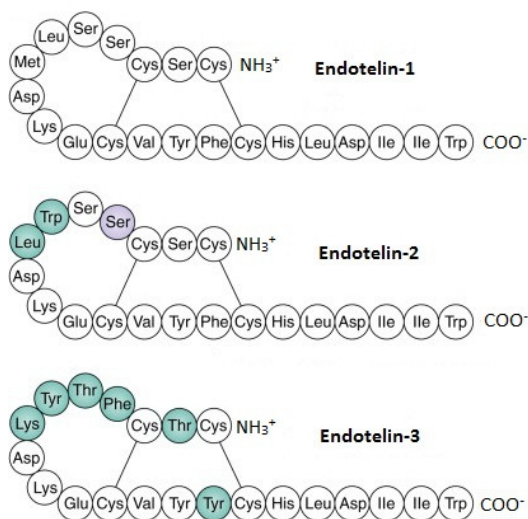
Med potencialnimi biokemijskimi kazalci se uveljavlja tudi endotelin-1, a klinična uporabnost še ni bila potrjena (31).

1.3. ENDOTELIN

Endotelijske celice igrajo pomembno vlogo pri uravnavanju žilnih, imunoloških in verjetno številnih drugih fizioloških funkcij v telesu. Peptidni konstriksijski faktor, proizveden v endoteliju, je bil prvič opisan v letu 1985, v letu 1988 pa so ga prvič izolirali in klonirali.

Lastnosti endotelinov:

- molekulska formula $C_{109}H_{159}N_{25}O_{32}S_5$,
- zgrajeni iz 21 aminokislin (Slika 5),
- vsebujejo štiri cisteinske ostanke,
- dve intramolekularni disulfidni vezi (Cys^1-Cis^{15} in Cys^3-Cys^{11}) (35, 36).



Slika 5: Struktura endotelina (37).

1.3.1. IZOFORME ENDOTELINA

Obstajajo tri izoforme endotelina z zelo podobnimi aminokislinskimi zaporedji in naslednjo razporeditvijo v človeških tkivih:

- endotoxin 1 (ET-1) proizvajajo izključno endotelijske celice, pojavlja pa se tudi v številnih drugih tkivih,
- endotoxin 2 (ET-2) je bistveno manj razširjen, prisoten v ledvicah in črevesju,

- endotelin 3 (ET-3) je prisoten v možganih, pljučih, nadledvičnici in črevesju (35, 36).

V človeškem genomu se gen za ET-1 nahaja na šestem kromosomu (6p23-p24), za ET-2 na prvem kromosomu in za ET-3 na 20. kromosomu (38).

Stimulatorji za nastanek ET so aktivirani trombociti, endotoksin, trombin, citokini, rastni faktorji, angiotenzin II, arginin, vazopresin, adrenalin, inzulin, hipoksija ter majhne strižne sile; inhibitorji za nastanek ET pa so NO, natriuretčni peptidi, PGE2 (*prostaglandin E2*), PGI2 (*prostaciklin*), heparin ter velike strižne sile.

Intravenska aplikacija endotelina povzroči prehodno vazodilatacijo, kateri sledi globoka in dolga vazokonstrikcija. V ledvičnem žilju ima ET-1 za petkrat močnejše vazokonstriktorno delovanje kot angiotenzin II. Plazemska koncentracija endotelina je zvišana po resnih kliničnih zapletih, kot je miokardni infarkt in po patoloških stanjih ob prisotnosti vazospazma (renalni in cerebralni vazospazem) (35, 36).

1.3.2. ENDOTELINSKI RECEPTORJI

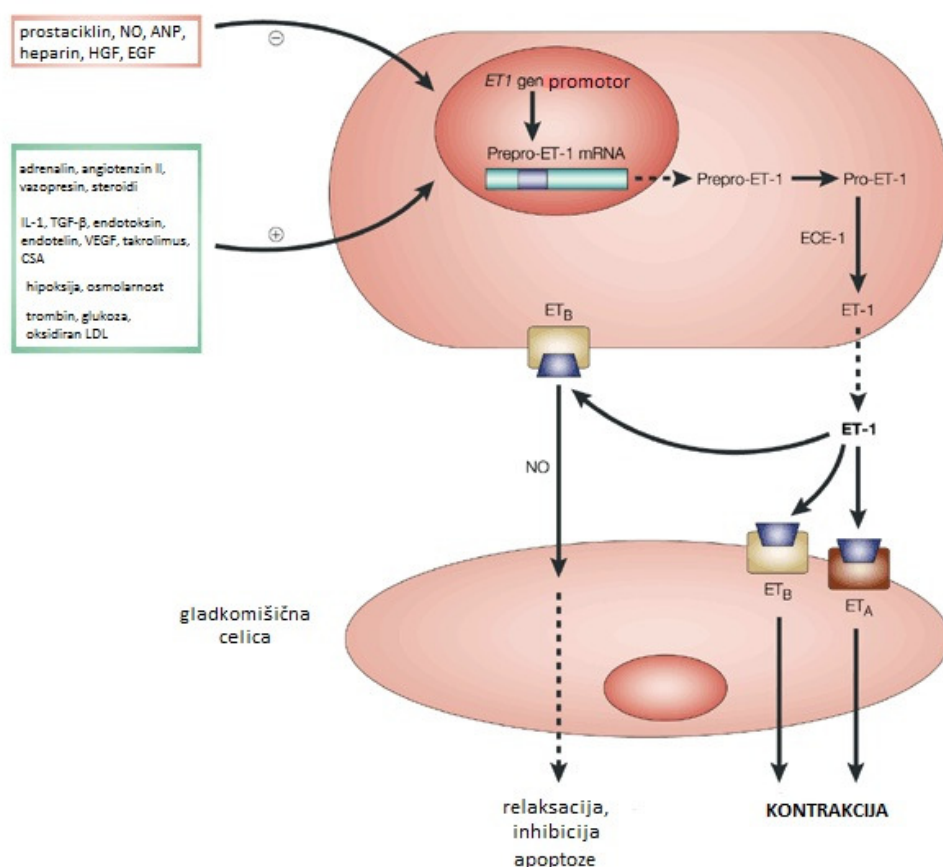
Klonirana sta bila dva tipa ET-receptorjev, in sicer vazokonstriktorski endotelinski receptor A (ET_A) in vazokonstriktorski/dilatacijski endotelinski receptor B (ET_B), katera spadata v superdružino G-proteinsko sklopljenih receptorjev.

ET-1 in ET-2 sta neselektivna ET-receptor agonista, z visoko afiniteto do ET_A in nizko afiniteto do ET_B. ET-3 se od ET-1 in ET-2 razlikuje v šestih aminokislinah na N-terminalni zanki, zaradi česar je za ET_B selektiven ligand; sam ET_B-receptor pa je v podobnem obsegu aktiviran z vsemi izoformami endotelina (39).

ET_A se nahaja v žilnih gladkih mišicah in ob vezavi agonista povzroča vazokonstrikcijo, bronhokonstrikcijo ter izločanje aldosterona; ET_B pa se nahaja tako v žilnih gladkih mišicah (podtip ET_{B2}) kot v endotelijah celicah (ET_{B1}) in povzroči izločanje NO ter prostaciklina. Vezava ET-3 na ET_B je ključna za normalen razvoj celic nevralne cevi (38).

1.3.3. BIOSINTEZA ENDOTELINA

Biosinteza (Slika 6) se začne z nastajanjem preproendotelina – to je inaktivni prekurzor za humani endotelin, zgrajen iz 212 aminokislin (38). Specifične endopeptidaze v procesu sinteze endotelina cepijo aminokislino in tako nastane proendotelin oz. veliki endotelin (*ang. big endothelin*), ki je zgrajen iz 38 aminokislin. Del nastalega proendotelina se že intracelično spremeni v zreli ET, del proendotelina pa se v nespremenjeni obliki izloča iz celic in pretvarja v zrelo obliko šele v perifernih tkivih. Pretvorba proendotelina v endotelin je katalizirana z encimom endotelin-konvertazo (ECE, *ang. endothelin converting enzyme*) (39).



Slika 6: Shema sinteze endotelina (40). (*NO* – dušikov oksid, *ANP* – atrijski natriuretični peptid, *HGF* – hepatocitni rastni dejavnik, *EGF* – epidermalni rastni dejavnik, *IL-1* – interleukin-1, *TGF-β* – tumorski rastni dejavnik-β, *VEGF* – rastni dejavnik vaskularnega endotelija, *CSA* – ciklosporin A, *LDL* – lipoproteini nizke gostote, *ET-1* – endotelin-1, *ECE-1* – encim endotelin-konvertaza-1, *ET_A* – endotelinski receptor A, *ET_B* – endotelinski receptor B).

Biosinteza endotelina ni omejena le na vaskularni endotelij, marveč poteka tudi v drugih celicah in tkivih, kot so pljučne celice, ledvica, pankreas in črevesje. Izločajo ga tudi celice centralnega živčnega sistema, kjer ima pomemben vpliv na živčne celice in celice glije (40).

1.3.4. MEHANIZEM DELOVANJA ENDOTELINA

Fiziološko delovanje endotelina je posledica številnih znotrajceličnih signalnih poti, saj aktivira kalcijeve kanalčke, fosfatidilinozitolno specifično fosfolipazo C, fosfatidilholin specifično fosfolipazo C in D, citosolno fosfolipazo A₂ ter fosforilacijo tirozin kinaze.

Kratkotrajne spremembe celičnih funkcij vključujejo številne signalne poti, kot je povišana citoplazemska koncentracija Ca²⁺, prek G-proteina posredovana aktivacija fosfolipaze C, protein kinaze C, fosfolipaze A₂ in D in arahidonske kisline ter spremembe znotrajceličnega pH-ja (zaradi izmenjave Na⁺-H⁺ ionov), kar se odraža z vazokonstrikcijo.

Dolgoročno delovanje ET-1 pa je posledica njegovega mitogenega učinka na gladke mišične celice krvnih žil, fibroblaste in glomerulne mezangialne celice ter nekatere druge celice. S spremembo koncentracije Ca²⁺ in aktivacijo protein kinaze C, endotelin vpliva na vaskularno preoblikovanje, hipertrofijo organov in patogenezo proliferativnih stanj, kot so ateroskleroza, bronhialna astma in obolenja ledvic (39, 41).

1.3.5. UČINKI ENDOTELINA NA ORGANE/ORGANSKE SISTEME

Učinki endotelina na organe in organske sisteme so navedeni v Preglednici IV:

Preglednica IV: Učinek endotelina na organe/organske sisteme.

organ/organski sistem	učinek endotelina
celice	- mitogeno
krvne žile	- neposredna vazokonstrikcija
kardiovaskularni sistem	- vazokonstrikcija koronarnih žil, - pozitivno inotropno in kronotropno delovanje
ledvica	- zmanjšana glomerulna filtracija in ledvični pretok plazme, - vazokonstrikcija aferentne in eferentne arteriole (42)
respiratorni sistem	- bronhokonstrikcija, - povečana gibljivost cilij (43)
jetra	- regulacija pretoka po sinusoidah (44)
CŽS	- vazokonstrikcija cerebralnih arterij, - zmanjšano izločanje prolaktina, - povečano izločanje gonadotropinov, RH, tireotropina in vazopresina (45)

1.3.5.1. Učinki endotelina na reproduktivni sistem

- **MATERNICA** – ET ima pomemben vpliv na kontraktilnost miometrija in parakrine funkcije maternice ter mitogeno delovanje na celice (46).
- **JAJCEVOD** – ET_B receptorji se nahajajo pretežno v epitelijskih celicah jajcevoda in vaskularnih endotelijskih celicah, ET_A receptorji pa so pretežno zastopani v mišičnih plasteh jajcevoda. ET-1 iz folikularne tekočine in epitelijskih celic ima pomembno vlogo pri motiliteti jajcevoda prek vzburjanja ET_A in/ali ET_B receptorjev (47).
- **OVARIJ** – endotelini so pomembni pri uravnavanju številnih funkcij, kot so folikulogeneza, steroidogeneza, zorenje oocitov, ovulacija in funkcije rumenega telesca. ET_A in ET_B receptorji so enakomerno porazdeljeni v ovariju. Po aktivaciji povzročijo fiziološko nasprotujoče si odzive, a je hkratna aktivacija obeh tipov receptorjev potrebna za urejeno delovanje ET na ovarije. Zaradi prisotnosti obeh tipov receptorjev na ovariju, endotelin uravnava ovulacijo tako, da deluje kot njen sprožilec z vezavo na ET_A receptor; z vezavo na ET_B receptor pa ovulacijo zaključí. Pri ovulaciji je pomembna konstrikcija ovarija, katera je inducirana z vezavo ET-2 na ET_A receptor, ki je hkrati tudi pomemben iniciator luteolize (48). Aktivacija ET_B receptorja je nujna za omejitev oziroma prekinitev ovulacije, saj se ob njegovem antagonizmu poveča stopnja ovulacij in velikost rumenega telesca (teh je tudi številčno več). Neusklajena aktivacija receptorjev rezultira v napakah z endotelinom reguliranih bioloških procesov, česar posledica je med drugim tudi pojav policističnih ovarijev (48, 49).

1.3.6. DOLOČANJE PROTEINOV

Za identifikacijo proteinov uporabljamo imunokemijske metode (Preglednica V), pri katerih izkoriščamo interakcije specifičnih protiteles z eno antigensko determinanto oz. epitopom. Tovrstne metode odlikujejo visoka specifičnost in občutljivost ter možnosti kvalitativne in kvantitativne določitve nizkih koncentracij proteinov neposredno v bioloških vzorcih (50).

Preglednica V: Pregled imunokemijskih metod, ki se uporabljajo za določanje proteinov.

<i>imunokemijska metoda</i>	<i>lastnosti</i>
1. PRECIPITACIJSKE METODE	<ul style="list-style-type: none"> - reakcija protitelesa-antigeni - območje ekvivalentnih koncentracij - slabo topna oborina - enojna (potuje samo Ag/samo Ab) ali dvojna (difundirajo hkrati Ag in Ab) - linearne ali radialne (odvisno od smeri potovanja) - npr. dvojna imunodifuzija, imunoelektroforeza (50).
2. RADIOIMUNSKA METODE	<ul style="list-style-type: none"> - radioaktivno označeni reagenti - izotopi - scintilacijski tekočinski števeci - za α in β sevalce - kristalni števeci - za γ sevalce - kompetitivne - količina izotopa omejena, tekmujeta za vezavo označeni in neoznačeni reagent - nekompetitivne - en reagent v prebitku - meriš količino, ki reagira/ostane - npr. radioimunosorpcijska metoda, radioalergosorpcijska metoda, imunoradiometrijska metoda, Farrova reakcija (50).
3. ENCIMSKO IMUNSKA METODE	<ul style="list-style-type: none"> - protitelesa in encime uporabljamo ločeno ali v povezavi v isti reagent - enaki principi reakcijskih vezav in dinamike kot za radioimunske - encim kovalentno vezan na protitelo - testi v serologiji / imunohistokemiji - npr. ELISA, immunoblot, črtna imunska metoda (50, 51).
4. PROTEINSKO PIVNANJE	<ul style="list-style-type: none"> - prenos proteinov na membrano - s kapilarnim vlekrom ali električnim tokom - blotting; - imunokemijska detekcijska metoda - western blot - točkovni prenos - dot blot - ne ločujemo z elektroforezo; nanos neposredno na membrano (52).

Določanje endotelina – izmed imunokemijskih metod, ki se uporabljajo za določanje proteinov, se za določanje endotelina najpogosteje uporabljajo encimsko imunske metode, katere so se uporabile tudi pri pridobivanju rezultatov naše raziskave za diplomsko delo.

2. NAMEN DELA

Povišane vrednosti endotelina so povezane s poškodbo endotelija in so že bile potrjene pri obolenjih, ki vključujejo endotelijske disfunkcije. Glede na to predvidevamo, da so koncentracije endotelina povišane tudi v primeru PCOS, kar je bilo že predhodno nakazano v mnogih literaturnih virih (53, 54, 55).

Namen diplomskega dela je s pomočjo statističnih testov ovrednotiti eksperimentalno pridobljene rezultate in odkriti nove povezave med plazemskim nivojem endotelina in pojavnostjo PCOS pri ženskah. S tem bi lahko prispevali h kakovostnejši obravnavi pacientov ter točnejši postavitvi individualizirane diagnostične ocene obravnavanih preiskovank.

S pravilnim tolmačenjem laboratorijskih rezultatov klinične preiskave in vrednotenjem laboratorijskih testov bi lahko vplivali na vzdrževanje in povrnitev zdravja bolnic.

V diplomski nalogi torej želimo ugotoviti, v kolikšnem odstotku se bo koncentracija endotelina odražala v spremenjeni koncentraciji pri bolnicah s PCO glede na zdravo kontrolno skupino.

V ta namen bo raziskava obsegala naslednje stopnje:

- z imunokemijskim testom (ELISA) se bo vsem preiskovankam izmerilo plazemske koncentracije endotelina;
- z različnimi statističnimi izračuni bomo ovrednotili eksperimentalno pridobljene rezultate na celotni preiskovani skupini;
- glede na prisotnost PCO, ugotovljene z ultrazvočnim ginekološkim pregledom, bomo vzorec razdelili na kontrolno skupino in obolele (ženske s prisotnim PCO) ter s statističnimi testi ugotavljali, ali so v koncentraciji endotelina signifikantno značilne razlike med skupinama;
- ovrednotili bomo občutljivost in specifičnost testa s pomočjo določitve mejne vrednosti koncentracije endotelina v kontrolni skupini, saj referenčne vrednosti ne poznamo.

3. METODE IN MATERIALI

3.1. OPIS VZORCEV

Merjenje plazemske koncentracije ET-1 se izvaja z encimskoimunskim testom BI-20052 ENDOTHELIN (1-21) ELISA (Biomedica GmbH, Dunaj, Avstrija) z analizatorjem PersonalLab™ Adaltis (56). Sveže odvzeti periferni venski krvi se takoj doda EDTA, položi na led in centrifugira ter nato shrani pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V primeru shranjevanja vzorcev za daljši čas, pa jih je potrebno shraniti pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (56). Izvedba ELISE ni priporočljiva v primeru lipemičnih in hemoliziranih vzorcev, saj bi lahko prišlo do interferenc trigliceridov, bilirubina in hemoglobina (57), zaradi česar se je pri delu z vzorci potrebno izogibati ponavljajočemu odtajevanju in zamrzovanju (56).

3.2. ELISA

Encimsko imunski test ELISA (*ang. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) se je razvil na osnovi imunoradiometrijske metode in je ena izmed najbolj uporabljenih metod za določevanje antigenov ali specifičnih protiteles v testiranih vzorcih. Naenkrat lahko na kvalitativen ali kvantitativen način testiramo veliko število vzorcev. Pri ELISA uporabimo encim, konjugiran s protitelesom, ki reagira z brezbarvnim substratom in tvori topen ter obarvan produkt, katerega merimo spektrofotometrično (52). Uporabnost in zanesljivost testa ELISA se lahko med različnimi izvedbami in proizvajalci zelo razlikuje – vprašljiva je predvsem analitska specifičnost, saj se na primer pri pospešenih izvedbah poveča tudi nespecifična vezava zaradi povišane reakcijske temperature in višjih koncentracij (50, 58).

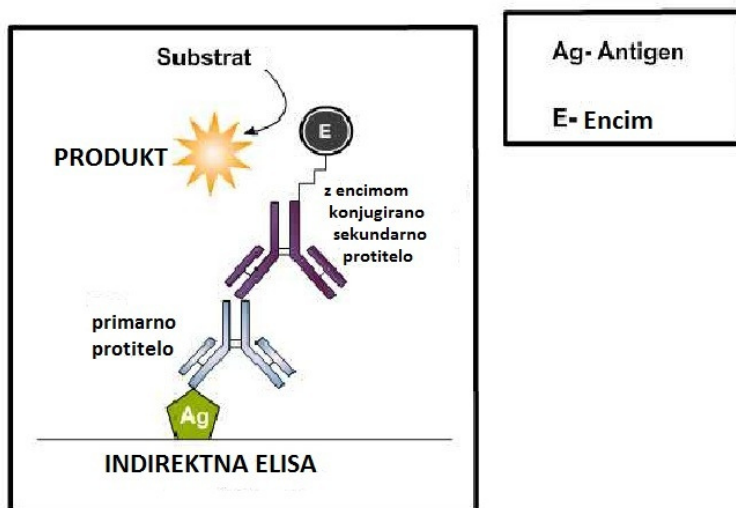
3.2.1. Princip metode

Test ELISA temelji na specifični interakciji antigen (protein) – protitelo. Iz rezultatov spektrofotometričnih meritev se pripravi umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protiteles ali antigena, iz katere se lahko razbere neznano koncentracijo v vzorcu. Za določevanje prisotnosti protiteles v vzorcu uporabimo indirektni test ELISA, kadar pa določamo prisotnost antigena v vzorcu, uporabimo metodo sendvič ELISA (51).

Indirektna ELISA:

Vdolbinice mikrotitrne plošče prekrijemo z antigenom in dodamo vzorec, v katerem določamo prisotnost primarnega protitelesa. Po njegovi reakciji z vezanim antigenom

speremo nevezana protitelesa. Vežana protitelesa določujemo z dodajanjem z encimom konjugiranega sekundarnega antiizotipskega protitelesa, ki se veže s primarnim protitelesom. Ko speremo prosta sekundarna protitelesa, dodamo še substrat za encim in dobimo obarvan produkt reakcije (Slika 7), kateremu izmerimo absorbanco v posebnem, v ta namen pripravljenem spektrofotometru (51, 52).

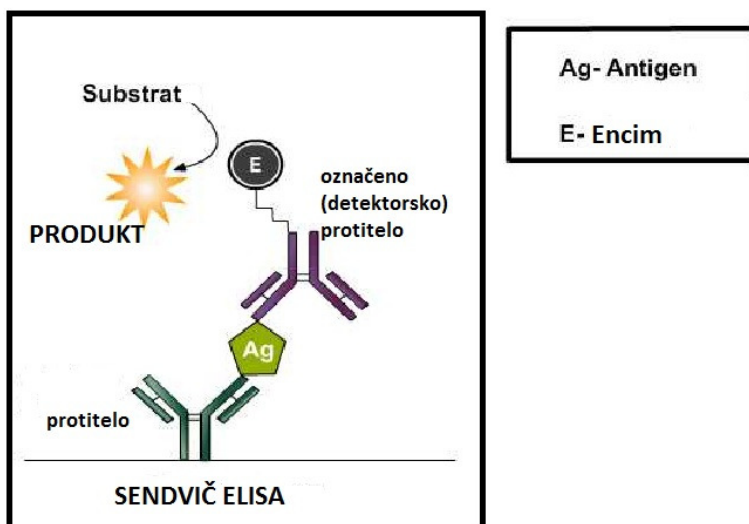


Slika 7: Določevanje protiteles z indirektnim testom ELISA. (59)

Sendvič ELISA:

Kvantitativno določevanje antigena, ki ima več epitopov, lahko izvedemo z t.i. metodo sendvič ELISA. Uporabljamo dve različni monoklonski protitelesi, specifični za antigen, na katerem prepoznata dva različna epitopa (51). Imunska reakcija poteka v dveh stopnjah – najprej v vdolbinico mikrotitrne plošče neposredno vežemo prvo specifično protitelo, ki v izbranem vzorcu selektivno veže le antigen, ki nas zanima. Nevezana protitelesa speremo in dodamo vzorec, ki vsebuje antigen. Protitelo z veliko afiniteto do antigena prispeva k boljši občutljivosti testa. Ko antigen reagira z vezanimi protitelesi, speremo vdolbinico in dodamo z encimom konjugirano sekundarno protitelo, ki je specifično za drug epitop na antigenu – pustimo, da reagira z vezanim antigenom in nato speremo nevezano sekundarno protitelo. Sledi dodatek substrata in nastanek obarvanega produkta reakcije, kateremu merimo absorbanco s spektrofotometrom (tako kot pri indirektni ELISA metodi) (50, 52).

Tovrstna ELISA metoda je bila uporabljena pri določanju koncentracije ET-1 v plazmi bolnic s PCOS in je prikazana na Sliki 8 (56).



Slika 8: Kvantitativno določevanje antigena z metodo sendvič ELISA. (60)

3.2.2. Priprava reakcijskih zmesi

Pred izvedbo testa se pripravi ustrezne raztopine:

- STD (Standard, bel pokrovček): liofiliziran sintezni humani ET-1 v humani plazmi (0-10 fmol/ml) raztopiti z 0,5 ml destilirane vode pri sobni temperaturi (18-26 °C) in 30 minut dobro pretresati (56).
- CTRL (Kontrola, rumen pokrovček): liofiliziran sintezni humani ET-1 v humani plazmi (točna koncentracija po raztopitvi je bila navedena na nalepki) raztopiti z 0,5 ml destilirane vode pri sobni temperaturi (18-26 °C) in 30 minut dobro pretresati (56).
- WASHBUF (pufer za izpiranje): koncentriran pufer raztopiti v razmerju 1:20 z destilirano vodo (50 ml koncentrata + 950 ml destilirane vode). Kristali v koncentriranem pufru so se raztopili pri sobni temperaturi. Pufer je stabilen pri 2-8 °C do izteka roka uporabe navedenega na nalepki (56).
- ET-STOCK (zaloga endotelina, rdeč pokrovček): liofiliziran sintezni humani ET-1 v humani plazmi (točna koncentracija po raztopitvi je bila navedena na nalepki - npr. 10 fmol/L) bi uporabili za direktno merjenje endotelina v supernatantu celične kulture (če bi imeli vzorce celične kulture). Pripravili bi raztopino v 2 ml mediju celične kulture pri sobni temperaturi (18-26 °C) in 30 minut dobro pretresali (56).

Pripravljene raztopine STD, CTRL in ET-STOCK so stabilne pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izteka roka uporabe navedenega na nalepki. Vse raztopine so morale ostati brezbarvne, vse dokler se jih ni začelo uporabljati na mikrotitrski plošči, in pri vseh se je potrebno izogibati ponavljajočemu se odtajevanju in zamrzovanju. Vse tekoče komponente so vsebovale 0,1 % Proclin 300 kot konzervans, ki je sicer netoksičen pri koncentracijah, kot so bile uporabljane v primeru našega kompleta, a lahko povzroča alergijske reakcije na koži, zato se je potrebno izogibati stikom s kožo in očesi. Pri delu je potrebna pozornost, da se ne zameša zamaškov in pokrovčkov različnih reagentov ali uporabi reagente različnih serij (56).

Pri delu se je uporabilo še raztopine navedene v Preglednici VI, ki so že bile pripravljene za uporabo (56).

Preglednica VI: Raztopine že pripravljene za uporabo pri izvedbi testa.

detektorsko protitelo	monoklonsko mišje anti-ET protitelo, zelen pokrovček
CONJ - konjugat	anti mišje IgG protitelo -HRPO, oranžen pokrovček
STOP	raztopina za zaustavitev reakcije, bel pokrovček
SUB - substrat	moder pokrovček

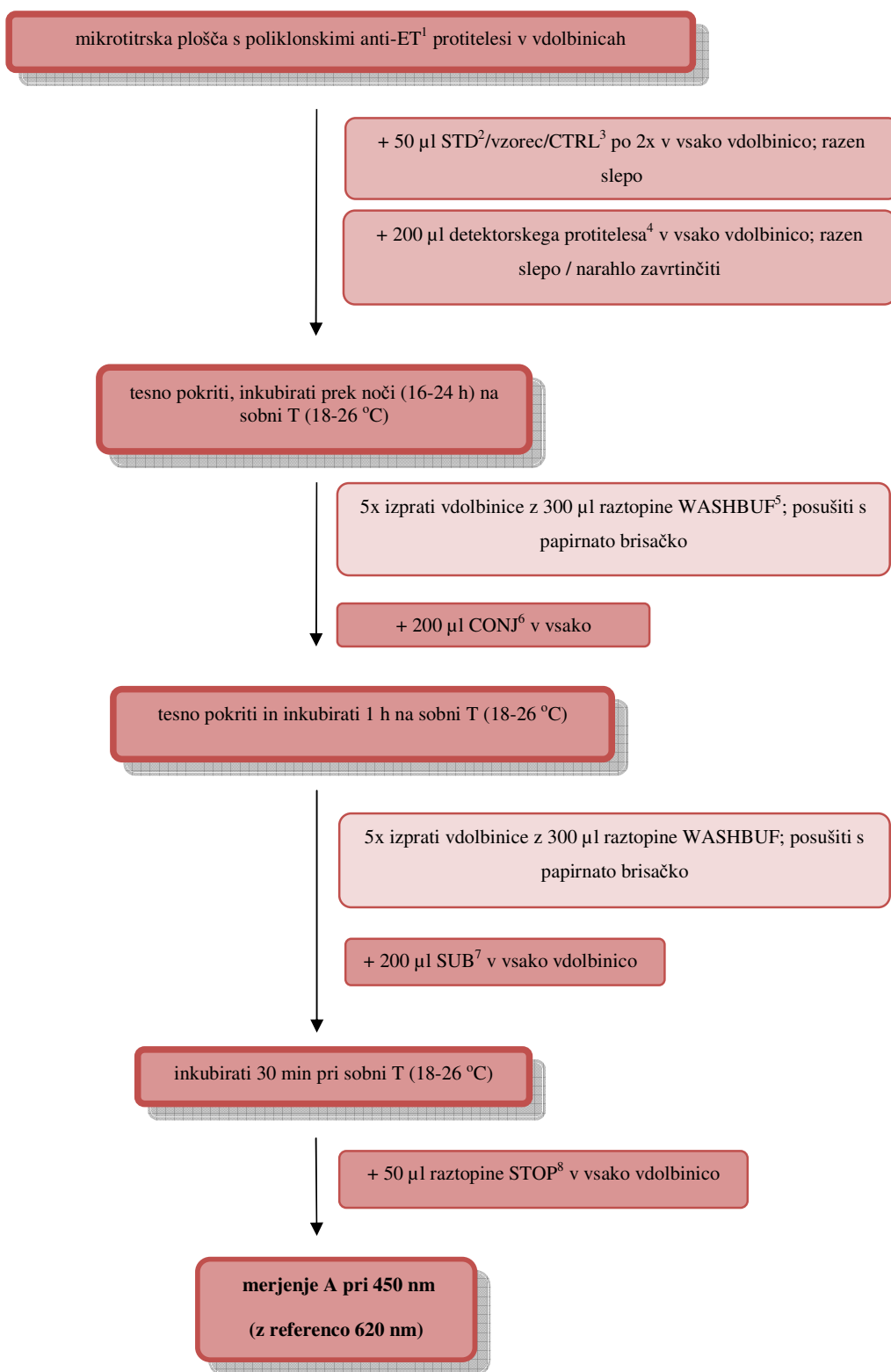
3.2.3. Priprava vzorcev

Pred izvedbo testa je bilo potrebno vzorce dobro pretresti; v primerih kjer jih je bilo potrebno razredčiti, pa se je uporabila 0,9 % raztopina NaCl.

Vedno se je uporabljalo čisto delovno haljo in rokavice; ker pa gre za testne komponente humanega izvora, so bile predhodno testirane s tretjo generacijo testov za HIV-Ab in HBsAg, in so bile negativne (56).

3.2.4. Potek dela

Pred izvedbo testa so bili vsi reagenti in vzorci shranjeni na sobni temperaturi ($18-26\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na priloženem obrazcu protokola se je označilo mesto pozicije BLANK (Slepa) / STD / vzorec / CTRL (56). Test se je izvajal z analizatorjem Personal LabTM Adaltis. Potek dela na mikrotitrski plošči je nazorno prikazan na Shemi 2.



Shema 2: Načrt dela na mikrotitrski plošči pri izvedbi testa ELISA. (¹anti-ET – monoklonsko mišje detekcijsko protitelo; ²STD – standard; ³CTRL – kontrola; ⁴detektorsko protitelo – monoklonsko mišje anti-ET protitelo; ⁵WASHBUF – pufer za izpiranje; ⁶CONJ – konjugat; ⁷SUB – substrat; ⁸STOP – raztopina za zaustavitev reakcije).

3.2.5. Značilnosti testa

- referenčni podatki: v primeru 70 vzorcev je mediana 0,26 fmol/ml; vsak laboratorij naj vzpostavi svoje referenčne podatke;
- meritveno območje: 0-10 fmol/ml;
- volumen vzorca: 50 µl EDTA plazme, seruma, urina, sline ali celične kulture;
- meja zaznavnosti: (0 fmol/ml + 3SD): 0,02 fmol/ml (minimalna meja detekcije predstavlja analitično občutljivost);
- čas inkubacije: preko noči/ 1 h/ 30 min
- navzkrižna reaktivnost: ET-1 (1-21): 100 %, ET-2 (1-21): 100 %, ET-3 (1-21): <5%, proendotelin (1-38): <1%, proendotelin (22-38): <1%.

V vzorcih normalne človeške plazme je prisotnost ET-2 ocenjena na manj kot 20 % vrednosti ET-1, ET-3 pa na 50 % vrednosti ET-1 (56).

3.2.6. Natančnost testa

Pri ugotavljanju natančnosti metode sta pomembni tako ponovljivost v dnevu kot ponovljivost med dnevi (Preglednica VII):

- a) ponovljivost v dnevu: preverjamo kako se rezultati meritev enega vzorca razlikujejo pri večih ponovitvah, ki jih naredimo v enem dnevu, in kakšna so odstopanja. Pri manjših koncentracijah ET-1 v vzorcu je koeficient variacije malenkost večji kot pri višjih koncentracijah ET-1 v vzorcu – pri manjših koncentracijah ET-1 so torej nekoliko večja odstopanja med vzorci, pri višjih koncentracijah pa so manjša odstopanja med vrednostmi;
- b) ponovljivost med dnevi: ker vsak dan v laboratoriju niso isti pogoji, preverjamo kako se rezultati vzorca razlikujejo med sabo v različnih dneh. Tudi v tem primeru imamo približno enak koeficient variacije (majhen) – to pomeni, da se med različnimi dnevi vrednosti bistveno ne razlikujejo in ni nobenih motenj, ki bi lahko spremenile rezultat (56).

Preglednica VII: Prikaz ponovljivosti v dnevu/med dnevi (56).

	ponovljivost v dnevu (N=18)		ponovljivost med dnevi (N=24)	
povprečna vrednost (fmol/ml)	2,02	7,01	3,80	0,80
standardna deviacija	0,08	0,21	0,20	0,04
koeficient variacije	4 %	3 %	6 %	5 %

3.3. ANALIZATOR Personal Lab™

Vse analize so opravljene na analizatorju Personal Lab™ proizvajalca Adaltis, v skladu z navodili za uporabo. Personal Lab™ je popolnoma avtomatiziran imunološki analizator z dvema mikrotitrskima ploščama. Je majhen, nehrupen in zanesljiv namizni analizator, v katerem so združili obsežna strokovna znanja in številne informacije o različnih napravah.

Celotni postopek je sestavljen iz dveh delov:

- instrumentalni del, ki vsebuje vse komponente za vzorčenje,
- sistem upravljanja, ki vsebuje programsko opremo za upravljanje s podatki in funkcijami, ki jih instrument izvaja (61).

Sestava posamezne delovne postaje v analizatorju Personal Lab™:

1. Vzorčna delovna postaja:

vzorci so identificirani s čitalcem črtnih kod ("*CCD Bar Code Reader*"). V uporabi so različna stojala za epruvete – število epruvet v enem stojalu je odvisno od njihovih premerov (premer 12 – 16 mm, višina 55 – 100 mm). Hkrati lahko analizira od 50 do 96 vzorcev - odvisno od izbranega stojala.

2. Ohišje ploščice:

ohišje ploščice je namenjeno za hkratno obdelavo dveh mikrotitrskih ploščic in lahko izvaja vertikalno stresanje, katerega jakost in periodo določi izvajalec testa. Med inkubacijo sta ploščici nameščeni v dve ločeni komori, ki sta termično izolirani pri temperaturi, katero določi izvajalec testa (najmanj 5 °C ali $\pm 30\text{ °C} \pm 45\text{ °C}$).

3. Sistem pipetiranja:

pipetiranje izvaja ena robotska roka, ki je korak za korakom vodena prek motorja in nadzorovana tako z optičnim kot mehanskim senzorjem. Odsotnost navzkrižne reaktivnosti zaradi prenosa je zagotovljena z avtomatsko zamenjavo nastavkov za enkratno uporabo in izpiranjem kovinske igle.

Instrument je opremljen s senzorji – za polimerne nastavke za enkratno uporabo ima PLS senzor ("*Pneumatic Level Sensor*") ter detektorski sistem za strdke. Igla za vzorce pa je opremljena z nivojskim senzorjem, ki prepreči, da igla ne seže do dna, in prepreči globoko vstavljanje tekočine, kar izključi prenos med vzorci.

Analizator Personal LabTM izvaja avtomatsko predhodno redčenje vzorcev, standardov in kontrol; v primeru neustreznih volumnov tekočin izvajalca testa opozori zvočno in z napisom.

4. Pralnik:

pralnik je opremljen z šestnajstcevnno/igelno glavo, od katerih je osem cevi namenjenih nanašanju raztopin, osem cevi pa za aspiracijo. Izpiranja so programirana s strani operaterja in se razlikujejo v ciklih, volumnu, času namakanja in tlaku.

- Obseg pranja: nastavljen od 100 do 2000 ml,
- število ciklov: od 1 do 9, namakanje,
- čas pranja: nastavljen od 1 s do 3 min,
- tlak: nastavljen.

5. Fotometer:

sistem omogoča hitro odčitavanje s fotometrom, ki je lahko nastavljen na vertikalno odčitavanje ali odčitavanje v razponu – za vertikalno odčitavanje lahko izbiramo med enojnim, dvojnimi ali trojnimi žarkom, medtem ko za odčitavanje v razponu, aparatura samodejno pretvori vrednosti absorbance, zaznane pri različnih valovnih dolžinah. Nameščeni so naslednji filtri:

- običajni predvideni filtri: 405, 450, 492, 550 in 620 nm,
- optični filtri: pri drugih valovnih dolžinah (400-700 nm); do največ osem filtrov.

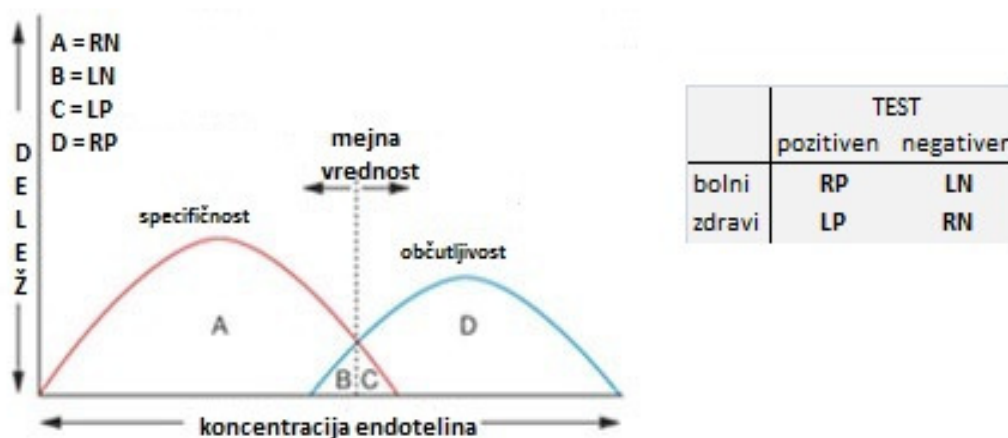
6. Programska oprema:

program omogoča preprosto uporabo analizatorja tako za kvalitativne kot kvantitativne analize in podpira dobro laboratorijsko prakso, kar pomeni, da se izvaja spremljanje kontrole kakovosti ter vodenje dnevnika opravil – npr. spremembe aplikacij, rutinski zagoni, ugotavljanje in odpravljanje napak ipd (61, 62).

3.4. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

I. Diagnostično metodo smo ovrednotili z izračunom njene občutljivosti in specifičnosti (Slika 9):

- **OBČUTLJIVOST:** je razmerje oseb s pozitivnim rezultatom testa v odnosu do vseh oseb, ki so resnično bolne (resnično pozitivni in lažno negativni). Označuje sposobnost testa, da zazna bolezen. Večje število lažno negativnih pomeni pomanjkanje občutljivosti.
- **SPECIFIČNOST:** je razmerje oseb z negativnim rezultatom testa v odnosu do vseh, ki so resnično brez bolezni (resnično negativni in lažno pozitivni). Označuje sposobnost testa, da zazna odsotnost bolezni. Večje število lažno pozitivnih pomeni pomanjkanje specifičnosti (63).



Slika 9: Prikaz mejne vrednosti, občutljivosti in specifičnosti analita. (RN – resnično negativni; LN – lažno negativni; LP – lažno pozitivni; RP – resnično pozitivni).

II. Za izračun statističnih parametrov smo uporabljali program SPSS 17.0 for Windows, proizvajalca SPSS Inc., ZDA. Najprej smo z One Sample Kolmogorov - Smirnovim testom preverili normalnost porazdelitve spremenljivk, kar smo ovrednotili s p vrednostjo ($p > 0,05$; to je 95 % verjetnost). Glede na normalnost porazdelitve smo se odločali za različne teste za ugotavljanje korelacij med posameznimi spremenljivkami.

Statistični testi, katere smo uporabili za ovrednotenje naših rezultatov:

1. NEPARAMETRIČNI TESTI:

Namenjeni so predvsem za preizkušanje neparametričnih hipotez, ki se tičejo funkcijske oblike neznanega porazdelitvenega zakona. Za več neodvisnih vzorcev so neparametrični testi uporabni za določitev, če se vrednosti določene spremenljivke razlikujejo v dveh ali več skupinah. Uporabnost neparametričnih testov je mnogo širša, saj zajemajo manj stroge predpostavke, in so preprostejše ter bolj robustne metode, v primerjavi s parametričnimi testi.

- **TEST KOLMOGOROV** – je uporaben pri zveznih porazdelitvah in to najbolj zanesljivo v primeru velikih vzorcev. Pod imenom One-Sample Kolmogorov-Smirnov test je vgrajen v program SPSS in se uporablja za testiranje ali je porazdelitev normalna, eksponentna, enakomerna ali Poissonova.
- **PEARSONOV HI-KVADRAT TEST** – je uporaben tako pri zveznih kot pri diskretnih porazdelitvah v primeru velikih vzorcev. Pearsonova χ^2 statistika je mera ujemanja, ki temelji na razlikah frekvenc (ker so včasih razlike pozitivne, drugič pa negativne, mera upošteva kvadrato razlik frekvenc, nikoli se ne računa na odstotkih ali deležih).
- **KRUSKAL – WALLIS TEST** – enofaktorska analiza variance z rangi, ki testira ničelno domnevo, da več neodvisnih vzorcev izhaja iz enake populacije. Ne predpostavlja normalne porazdelitve (obratno kakor ANOVA) in je dobra izbira, ko uporabljamo ordinalne spremenljivke (64, 65).

2. ENOFAKTORSKA ANALIZA VARIANCE (ONE – WAY ANOVA):

Preizkušanje domneve o enakosti aritmetičnih sredin iz več populacij (skupin). Gre za razširitev preizkusa razlike med dvema aritmetičnima sredinama iz dveh populacij na podlagi neodvisnih vzorcev. ANOVA je relativno robusten postopek, uporaben za numerične spremenljivke (66).

3. LOGISTIČNA REGRESIJA:

Spada v okvir posplošenih linearnih modelov in je najbolj splošen statistični model za reševanje problemov, pri katerih ima odvisna spremenljivka binomsko porazdelitev, neodvisne spremenljivke pa so lahko opisne in/ali numerične (67).

4. REZULTATI

Iz naših meritev smo dobili plazemske koncentracije endotelina, s katerimi smo prišli do končnih rezultatov in ugotovitev.

4.1. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN OVREDNOTENJE SKUPINE

Na Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana so bile napotene pacientke, ki so bile glede na rezultate predhodnih pregledov in parametrov razvrščene v skupino bolnic (s PCO na UZ) ter kontrolno skupino. V analizo je bilo vključenih 63 preiskovank – v skupino bolnic (skupina 1) je bilo vključenih 9 pacientk, v kontrolno skupino (skupina 0) pa 54 preiskovank. Prikaz plazemskih koncentracij endotelina in starost preiskovank vključenih v raziskavo se nahajata v Prilogi 1.

V diplomski nalogi smo opravili ločene analize tako za ženske s policističnimi ovariji na UZ sliki kot za tiste z zdravimi ovariji. Tam, kjer je bilo smiselno, pa smo obe skupini preiskovank obravnavali kot enovito celoto.

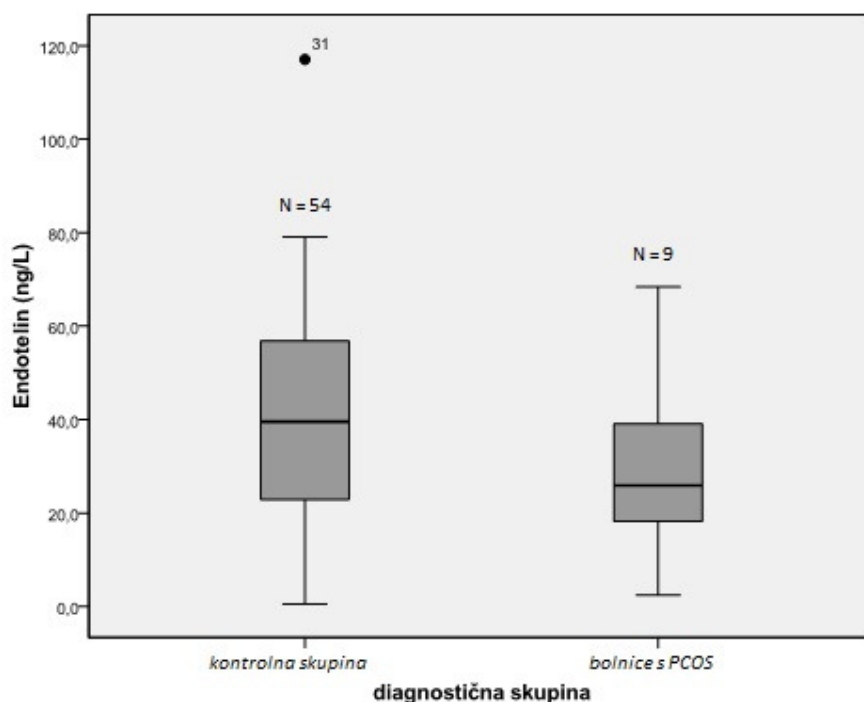
Rezultate smo analizirali in statistično ovrednotili s pomočjo programa SPSS 17.0 for Windows (68), s katerim smo izvedli testiranje hipotez, neparametrične teste (Nonparametric Tests), analizo variance (One – Way Anova) ter logistično regresijo (Logistic Regression). Glede na izbrani parameter smo medsebojno primerjali skupine, v katere so bile razdeljene preiskovanke (pacientke). Pri vseh statističnih testih smo upoštevali stopnjo značilnosti 0,05. Na koncu smo izračunali še občutljivost in specifičnost metode ter s tem ovrednotili diagnostični test.

Pred začetkom statistične obdelave rezultatov smo preverili prisotnost osamelcev, ki bi lahko motili nadaljnjo analizo. Porazdelitev rezultatov za koncentracijo endotelina v kontrolni skupini (skupina 0) in skupini bolnic (skupina 1) smo prikazali grafično, in sicer s kvartilnim diagramom (*ang. Box plot*).

Iz grafičnega prikaza kvartilov (Graf 1) lahko razberemo, da je v kontrolni skupini prisotna osamela vrednost, ki odstopa od ostalih. Vrednost osamelca v nadaljnji statistični obravnavi nismo upoštevali. Za to preiskovanko lahko sklepamo, da ima mogoče neko endokrinopatijo, ki vpliva na povišanje ravni endotelina v krvi. Glede ne toliko višjo

koncentracijo endotelina, v primerjavi z ostalimi vrednostmi, lahko tudi sklepamo na morebitno napako pri meritvi (izvedbi metode) ali na prisotnost ostalih faktorjev, ki vplivajo na povišane vrednosti endotelina.

Iz grafične predstavitve obeh vzorcev se vidi, v kakšnem razponu se porazdeljujejo podatki posamezne skupine: osrednja črta označuje mediano, robovi okvirja označujejo spodnji in zgornji kvartil, medtem ko ročaji okvirja predstavljajo najnižjo in najvišjo ekstremno vrednost posamezne spremenljivke. Območje znotraj okvirja predstavlja interkvartilno področje oziroma kvartilni razmik, s katerim pridobimo podatek o razpršenosti podatkov (69).



Graf 1: Porazdelitev rezultatov za koncentracijo endotelina v obeh skupinah preiskovank. (*N* = število preiskovank).

Za diagnostično skupino 0 lahko razberemo, da ima zgornjo ekstremno mejo, rob zgornjega kvartila, mediano in rob spodnjega kvartila pri višjih koncentracijah endotelina, v primerjavi z kvartilnim diagramom za diagnostično skupino 1. Diagnostična skupina 1 ima le spodnjo ekstremno mejo pri nekoliko višji koncentraciji endotelina kot diagnostična

skupina 0, a to ni bistveno pomembno. Številčni prikaz podatkov je v naslednjem poglavju (Preglednici XI in XII).

4.1.1. Statistično vrednotenje celotnega vzorca

4.1.1.1. Deskriptivna statistika

V tem delu bomo opisali splošne lastnosti vzorca žensk s sumom na prisotnost PCOS, saj z deskriptivno statistiko opišemo glavne značilnosti zbranih podatkov. Deskriptivno statistiko lahko uporabimo tako za kvalitativne kot za numerične spremenljivke. Iz Preglednice VIII lahko razberemo glavne statistične značilnosti posameznih spremenljivk, in sicer: število preiskovank, območje, najmanjše in največje vrednosti, povprečne vrednosti in standardne deviacije. Visok SD kaže na to, da je značilna velika variabilnost v meritvah med posameznicami (69).

Preglednica VIII: Rezultati deskriptivne statistike posameznih spremenljivk.

	N	Območje	Najnižja vrednost	Najvišja vrednost	Povprečna vrednost	Standardna deviacija
Endotelin (ng/L)	62	78,600	0,500	79,100	37,519	21,425
Starost (leta)	62	34,300	16,000	50,300	30,979	6,768

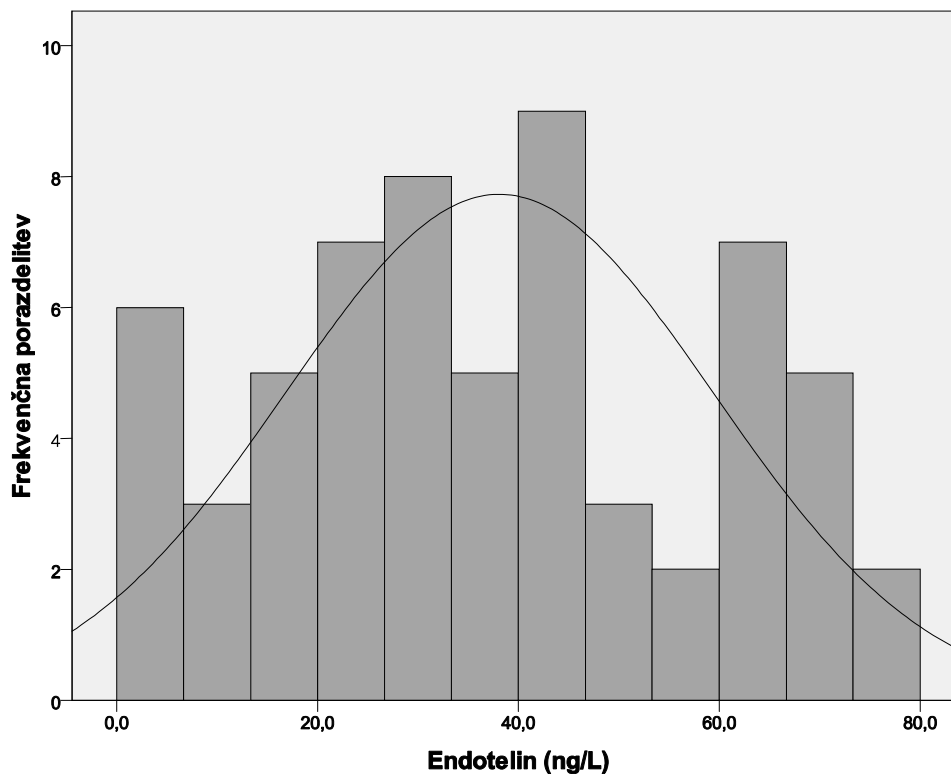
Raziskava je zajela 62 preiskovank, katere lahko razdelimo po starostnih razredih in dobimo starostno porazdelitev preiskovank, ki je prikazana v Preglednici IX.

Preglednica IX: Starostna porazdelitev skupine preiskovank.

starost (leta)	N (št. preiskovank)	delež v vzorcu (%)
< 25	13	20,97
25 - 35	35	56,45
35 - 45	13	20,97
> 45	1	1,61

4.1.1.2. Frekvenčna porazdelitev

Frekvenčna porazdelitev je razvrstitev enot v skupine po vrednostih ene spremenljivke opazovanega pojava. Frekvenčna porazdelitev izboljša preglednost podatkov, če ima spremenljivka veliko število vrednosti, pri čemer mora biti posamezna vrednost razvrščena v samo en razred. Na Grafu 2 je prikazana odvisnost frekvenčne porazdelitve od koncentracij endotelina za celotni vzorec (70).



Graf 2: Histogram frekvenčne porazdelitve v odvisnosti od koncentracij endotelina.

Iz frekvenčne porazdelitve celotnega vzorca po diagnozi (kontrolna skupina = 0; ženske s PCO na UZ sliki = 1) lahko razberemo, da kontrolna skupina predstavlja 85,5 % našega vzorca, medtem ko bolnice oziroma ženske s PCO predstavljajo zgolj 14,5 % naše preiskovane skupine (Preglednica X).

Preglednica X: Prikaz frekvenčne porazdelitve celotnega vzorca po diagnozi.

	Frekvenca	Odstotek (%)
Kontrolna skupina	53	<u>85,50</u>
Ženske s PCO na UZ	9	<u>14,50</u>
Skupaj	62	100,0

4.1.2. Statistično vrednotenje skupin 0 in 1

Vzorec smo pred nadaljnjimi statističnimi obravnavami razdelili na dve skupini:

- diagnoza 0: ženske z zdravimi ovariji na UZ (kontrolna skupina),
- diagnoza 1: ženske s policističnimi ovariji (bolnice).

4.1.2.1. Deskriptivna statistika

Najprej smo želeli ovrednotiti splošne lastnosti posamezne skupine preiskovank, zato smo naredili deskriptivno statistiko za obe skupini in dobili naslednje podatke (Preglednici XI in XII): število preiskovank v posamezni skupini, povprečne vrednosti in standardne deviacije, najvišje in najnižje vrednosti ter vrednosti kvartilov.

Preglednica XI: Deskriptivna statistika za skupino z diagnozo 0.

	N	Povprečna vrednost	Standardna deviacija	Najnižja vrednost	Najvišja vrednost	Kvartili		
						25%	50% (Mediana)	75%
Endotelin (ng/L)	53	38,826	21,076	0,500	79,100	22,650	38,650	55,500
Starost (leta)	53	31,083	6,990	16,000	50,300	26,800	31,600	34,300

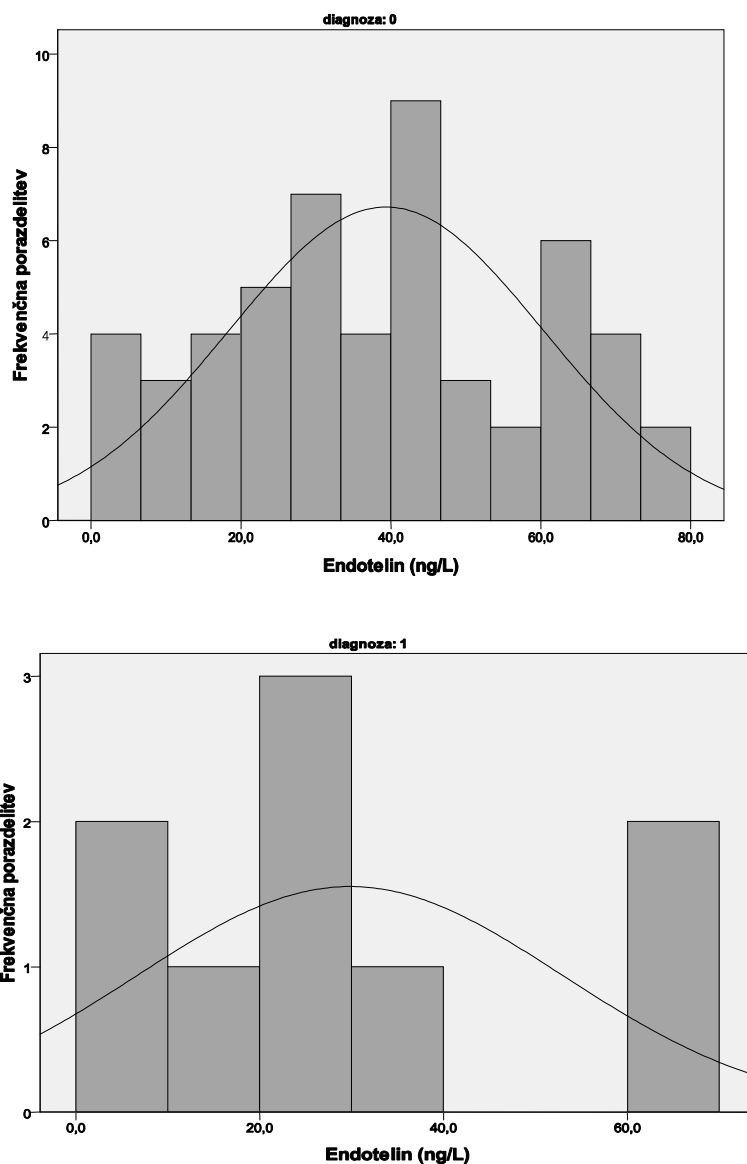
Preglednica XII: Deskriptivna statistika za skupino z diagnozo 1.

	N	Povprečna vrednost	Standardna deviacija	Najnižja vrednost	Najvišja vrednost	Kvartili		
						25%	50% (Mediana)	75%
Endotelin (ng/L)	9	29,822	23,123	2,400	68,400	10,550	25,900	50,200
Starost (leta)	9	30,367	5,590	23,500	38,900	25,050	29,900	35,350

Iz rezultatov deskriptivne statistike lahko razberemo višjo povprečno vrednost koncentracije endotelina za kontrolno skupino, kar ni v skladu z našimi pričakovanji. Za ugotovitev, ali je razlika v koncentraciji endotelina med skupinama statistično značilna ali pa je takšna porazdelitev vrednosti le stvar naključja, smo naredili statistične teste, ki so opisani v naslednjem poglavju.

4.1.2.2. Frekvenčna porazdelitev

Kot v primeru vrednotenja celotnega vzorca smo naredili frekvenčno porazdelitev v odvisnosti od koncentracij endotelina tudi v primeru razdeljenega vzorca, kar je prikazano na Grafu 3. Histograma nakazujeta normalnost frekvenčne porazdelitve podatkov, katero smo preverili s statističnimi testi, ki sledijo v naslednjem poglavju. V primeru normalne distribucije podatkov logaritmiranje vrednosti, z namenom pridobivanja Gaussove krivulje, ni potrebno.



Graf 3: Prikaz frekvenčne porazdelitve v odvisnosti od koncentracije endotelina glede na diagnostično skupino. Prvi graf prikazuje diagnostično skupino 0, drugi graf pa diagnostično skupino 1.

4.2. STATISTIČNI TESTI

4.2.1. Statistični testi celotnega vzorca

4.2.1.1. *Neparametrični testi*

Za ugotavljanje, če se starost preiskovank in izmerjene koncentracije endotelina v celotni skupini porazdeljujejo normalno smo uporabili Kolmogorov–Smirnov test za testiranje normalnosti porazdelitve (Preglednica XIII). Ničelna hipoteza tu predpostavlja, da se spremenljivki porazdelujeta normalno (71). Iz Preglednice lahko razberemo, da tako starost kot koncentracije endotelina sledijo normalni porazdelitvi, saj je izračunana stopnja značilnosti v obeh primerih več kot 0,05 ($p_{\text{konc.endotelina}} = 0,666$ in $p_{\text{starost}} = 0,682$).

Iz preglednice rezultatov Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve lahko razberemo še naslednje podatke: število preiskovank, povprečne vrednosti, standardne deviacije in najbolj odstopajoče razlike vrednosti posamezne spremenljivke.

Preglednica XIII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve starosti preiskovank in koncentracij endotelina.

		Endotelin (ng/L)	Starost (leta)
N		62	62
Parametri normalnosti porazdelitve ^{a,b}	Povprečna vrednost	37,519	30,979
	Standardna deviacija	21,425	6,768
Najbolj odstopajoče razlike	absolutne	0,092	0,091
	pozitivne	0,075	0,091
	negativne	-0,092	-0,064
Stopnja značilnosti (dvostransko tveganje)		0,666	0,682

a. Test pokaže normalnost porazdelitve.

4.2.1.2. *Povezanost med spremenljivkami*

Opravili smo tudi test povezanosti med koncentracijo endotelina in diagnozo preiskovank s pomočjo Pearsonovega koeficienta korelacije in dobili recipročno korelacijo med spremenljivkama (Preglednica XIV; Pearsonov koeficient = -0,149). Pearsonov koeficient korelacije meri korelacijsko linearno povezanost med dvema spremenljivkama in lahko zavzema vrednosti v intervalu [-1, 1]. Pozitivna vrednost Pearsonovega koeficienta pomeni, da se z večanjem vrednosti prve spremenljivke povečuje tudi vrednost druge

spremenljivke, medtem ko negativna povezanost med spremenljivkama pomeni, da se z večanjem vrednosti prve zmanjšuje vrednost druge spremenljivke (64).

Preglednica XIV: Prikaz Pearsonovega koeficienta korelacije med koncentracijo endotelina in diagnozo preiskovank.

		Endotelin (ng/L)	diagnoza
Endotelin (ng/L)	Pearsonov koeficient korelacije	1	<u>-0,149</u>
	p		0,247
	N	62	62
diagnoza	Pearsonov koeficient korelacije	<u>-0,149</u>	1
	p	0,247	
	N	62	62

4.2.2. Statistični testi skupin 0 in 1

4.2.2.1. *Neparametrični testi*

Tudi v primeru razdelitve vzorca na dve diagnostični skupini smo preverili normalnost porazdelitve starosti preiskovank in koncentracij endotelina. V obeh primerih smo uporabili Kolmogorov–Smirnov test za testiranje normalnosti porazdelitve. Ničelna hipoteza pravi, da spremenljivki sledita normalni porazdelitvi.

V primeru diagnostične skupine 0 je izračunana stopnja značilnosti več kot 0,05 tako za starost kot za koncentracijo endotelina ($p_{\text{konc.endotelina}} = 0,777$ in $p_{\text{starost}} = 0,687$), zato velja, da ničelne hipoteze ne moremo zavreči in spremenljivki sledita normalni porazdelitvi (Preglednica XV).

Preglednica XV: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve starosti preiskovank in koncentracij endotelina v diagnostični skupini 0.

		Endotelin (ng/L)	Starost (leta)
N		53	53
Parametri normalnosti porazdelitve ^{a,b}	Povprečna vrednost	38,826	31,083
	Standardna deviacija	21,076	6,990
Najbolj odstopajoče razlike	absolutne	0,091	0,098
	pozitivne	0,065	0,098
	negativne	-0,091	-0,076
Stopnja značilnosti (dvostransko tveganje)		<u>0,777</u>	<u>0,687</u>

a. Test pokaže normalnost porazdelitve.

b. diagnostična skupina 0

Tudi v primeru diagnostične skupine 1 je izračunana stopnja značilnosti več kot 0,05 tako za starost kot za koncentracijo endotelina ($p_{\text{konc.endotelina}} = 0,956$ in $p_{\text{starost}} = 0,994$), zato velja, da tudi v tem primeru ne moremo zavreči ničelne hipoteze in spremenljivki sledita normalni porazdelitvi (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve starosti preiskovank in koncentracij endotelina v diagnostični skupini 1.

		Endotelin (ng/L)	Starost (leta)
N		9	9
Parametri normalnosti porazdelitve ^{a,b}	Povprečna vrednost	29,822	30,367
	Standardna deviacija	23,123	5,590
Najbolj odstopajoče razlike	absolutne	0,171	0,142
	pozitivne	0,171	0,129
	negativne	-0,136	-0,142
Stopnja značilnosti (dvostransko tveganje)		<u>0,956</u>	<u>0,994</u>

a. Test pokaže normalnost porazdelitve.

b. diagnostična skupina 1

4.2.2.2. z-test/t-test

S pomočjo z-testa smo želeli preveriti kako vpliva prisotnost policističnih ovarijev na koncentracijo endotelina. Ker imamo neenakomeren vzorec, večji od 30, smo uporabili z-test (ki je v primeru velikih vzorcev enak t-testu, kateri se sicer uporablja za manjše vzorce). Ker program SPSS nima možnosti izvedbe z-testa, smo uporabili t-test. S to metodo smo preverili razlike med aritmetičnima sredinama dveh neodvisnih vzorcev. Ničelna hipoteza predvideva enakost aritmetičnih sredin (72). Iz Preglednice XVII smo razbrali, da so razlike med skupinama nastale slučajno, saj je verjetnost ($p = 0,247$) večja od 0,05 in ničelne hipoteze ne moremo zavreči.

Preglednica XVII: t-test dveh neodvisnih vzorcev.

		t	df	p	povprečna vrednost razlik	st.deviacija razlik
Endotelin (ng/L)	Domneva enakih varianc	1,169	60	<u>0,247</u>	9,004	7,701

4.2.2.3. Enofaktorska analiza variance (One – Way Anova)

Analizo variance med ženskami s PCO in kontrolno skupino ter vpliv na koncentracijo endotelina smo lahko naredili, saj smo v predhodno narejenem Kolmogorov-Smirnovem testu ugotovili normalnost porazdelitve vzorca. Ničelna hipoteza pravi, da sta ne glede na prisotnost policističnih ovarijev povprečni koncentraciji endotelina med skupinama enaki (65, 66). Iz rezultatov enofaktorske analize variance (Preglednica XVIII) smo razbrali, da med tema skupinama diagnoz ni signifikantno značilne razlike v koncentraciji endotelina, saj je stopnja značilnosti večja kot 0,05 ($p = 0,247$), torej ničelne hipoteze nismo zavrgli.

Preglednica XVIII: Analiza variance koncentracije endotelina.

	Vsota kvadratov	df	Povprečna vrednost kvadratov	F	Stopnja značilnosti
Med skupinama	623,758	1	623,758	<u>1,367</u>	<u>0,247</u>
Znotraj skupin	27376,359	60	456,273		
skupaj	28000,117	61			

Po pričakovanjih dobimo pri ANOVI enako p vrednost kot pri z-testu. ANOVO smo naredili kljub temu, da imamo le dva vzorca, ker smo želeli dobiti vrednost F.

F vrednost nam pove razmerje varianc med skupinami glede na varianco znotraj skupin. Ko se stopnja značilnosti približuje vrednosti 1, se vrednost F manjša, kar potrjuje, da se povprečja skupin ne razlikujejo statistično značilno.

4.2.3. LOGISTIČNA REGRESIJA

Parametre, ki bi lahko korelirali z razvrstitvijo preiskovank v posamezno diagnostično skupino, smo ugotavljali s pomočjo statistične analize z logistično regresijo. Logistična regresija spada med posplošene linearne modele in se uporablja za reševanje problemov, pri katerih ima odvisna spremenljivka binomsko porazdelitev, neodvisne spremenljivke pa so lahko opisne in/ali številske. Je oblika regresije, ki omogoča napoved dihotomne kategorične spremenljivke s prediktorji, ki so kategorične ali zvezne spremenljivke. Metoda ne predpostavlja normalnih porazdelitev in enakih varianc neodvisnih spremenljivk v skupinah. Uporabimo jo v primerih, ko nas zanima dejanska verjetnost pripadnosti neke enote eni ali drugi skupini in ko ugotavljamo kateri parametri značilno vplivajo na izid ter ali je njihov vpliv pozitiven ali negativen.

Enačba, parametri in rezultati logistične regresije

Enačba logistične regresije: $P(Y) = 1/(1+e^{-Z})$

$$Z = (B_0 + B_1X_1 + \dots + B_iX_i)$$

P(Y) je verjetnost, da se zgodi dogodek Y

X_i je prediktorski parameter.

Odvisna spremenljivka (izid) je bil podatek o razvrščenosti preiskovank v posamezno diagnostično skupino, neodvisni spremenljivki oziroma prediktorska parametra pa koncentracija endotelina in starost (67, 73).

Najprej smo dobili tabelo, iz katere smo razbrali število primerov oziroma meritev iz naših rezultatov, ki so bili uporabljeni tudi za statistično analizo z linearno regresijo (Preglednica XIX).

Preglednica XIX: Povzetek primerov za statistično analizo z logistično regresijo.

		N	Odstotek
Izbrani primeri	Vključeni v analizo	62	100,0
	Manjkajoči primeri	0	0,0
	Skupaj	62	100,0
Izločeni primeri		0	0,0
Skupaj		62	100,0

V Preglednici XX je prikazana opredelitev posameznih primerov pri vrednotenju z logistično regresijo. Razberemo lahko, da kontrolna skupina obsega 85,5% celotnega vzorca, kar predstavlja osnovno stopnjo vseh možnosti odločanja (najboljša strategija v tem primeru bi bila, da za vse primere predvidimo, da spadajo v diagnostično skupino 0 – v tem primeru bi bilo naše sklepanje pravilno v 85,5%).

Preglednica XX: Prikaz splošnega odstotka vzorca, ki se je uporabil za nadaljnje izračune.

	Opazovani	Predvideni		Popravljen odstotek
		diagnoza		
		0	1	
Korak 0	0	53	0	100,0
	1	9	0	0,0
	Splošni odstotek			85,5

- Konstanta ja vključena v model.
- Mejna vrednost je 0,500.

V Preglednici XXI so prikazani parametri, ki se uporabijo v enačbi pri izračunu konstante, ki je vključena v model v Koraku 0; v Preglednici XXII pa parametri, ki se ne vključijo v enačbo pri izračunu konstante v Koraku 0.

Preglednica XXI: Parametri vključeni v enačbo.

		B ⁽¹⁾	S.E. ⁽²⁾	Wald ⁽³⁾	df	p	β ⁽⁴⁾
Korak 0	Konstanta	-1,773	0,361	24,187	1	0,000	0,170

⁽¹⁾B je ocena koeficienta regresije posameznega prediktorskega parametra, ki pove, kako prediktorski parameter vpliva na izid. B je izračunan po metodi ocenjevanja največjega verjetja, ki išče takšno vrednost koeficienta, ki najbolj poveča logaritem verjetja (LL). Parametri s pozitivnim koeficientom regresije so pozitivno korelirani z izidom, tisti z negativnim koeficientom pa negativno.

⁽²⁾S.E. je standardna napaka (*ang. Standard error*) za konstanto.

⁽³⁾Wald je hi-kvadrat test, s katerim testiramo ničelno hipotezo, ki pravi, da je konstanta enaka 0. Ta hipoteza je zavrnjena, ker je p vrednost manjša od kritične p vrednosti ($p < 0,05$).

⁽⁴⁾ β vrednost dobimo iz razmerja med številom preiskovank v diagnostični skupini 1 napram kontrolni skupini ($\beta = 9/53$).

β je proporcionalna sprememba razmerij med verjetnostjo, da se bo dogodek zgodil ($P(Y)$) in verjetnostjo, da se dogodek ne bo zgodil ($1 - P(Y)$), ki nastane, ko se vrednost prediktorskega parametra spremeni za eno enoto. Tako kot vrednost B, tudi β uporabimo za ocenjevanje vpliva posameznega predikcijskega parametra:

- če je vrednost β manjša od 1 je neodvisna spremenljivka v pozitivni korelaciji z odvisno spremenljivko,
- če je vrednost β večja od 1 je neodvisna spremenljivka v negativni korelaciji z odvisno spremenljivko.

če je vrednost β enaka 0, med spremenljivkama ni korelacije (67).

Preglednica XXII: Parametri, ki niso vključeni v enačbo v Koraku 0

			Rezultat	df	p
Korak 0	Spremenljivke	Starost (leta)	0,088	1	0,767
		Endotelin (ng/L)	1,381	1	0,240
	Splošna statistika		1,687	2	0,430

Sledi Korak 1, ko se v vse izračune vključijo vrednosti posameznih parametrov za neodvisni spremenljivki (Preglednica XXIII).

Preglednica XXIII: Vrednosti neodvisnih spremenljivk

Korak 1 ^(a)		B ⁽¹⁾	S.E.	df	p	$\beta^{(2)}$
	Starost (leta)	-0,029	0,056	1	0,605	0,972
	Endotelin (ng/L)	-0,022	0,018	1	0,218	0,978
	Konstanta	-0,130	1,903	1	0,946	0,878

(a) Spremenljivke vnesene v model v Koraku 1: starost (leta), Endotelin (ng/L).

Pri Koraku 1 smo izvedli test Hipoteze 0, ki pravi, da vključitev prediktorskih parametrov k temu modelu ne vpliva na izid testa. Z uporabo Hi-kvadrat testa smo dobili p-vrednost

večjo od 0,05 ($p = 0,431$) na podlagi česar ničelne hipotezo ne moremo ovreči (Preglednica XXIV).

Preglednica XXIV: Prikaz HI-kvadrat in p vrednosti koeficientov modela.

		HI-kvadrat	df	p
Korak 1	Model	1,682	2	0,431

Preverili smo tudi korelacije med spremenljivkami in dobili rezultate, ki so prikazani v Preglednici XXV. Med starostjo in koncentracijo endotelina lahko razberemo pozitivno korelacijo (korelacija = 0,158).

Preglednica XXV: Prikaz vrednosti korelacij med spremenljivkami.

		Konstanta	Starost (leta)	Endotelin (ng/L)
Korak 1	Konstanta	1,000	-0,937	-0,435
	Starost (leta)	-0,937	1,000	0,158
	Endotelin (ng/L)	-0,435	0,158	1,000

Koeficienti logistične regresije se lahko uporabljajo tudi za oceno obetov (razmerje verjetnosti, da se dogodek zgodi, z verjetnostjo, da se dogodek ne zgodi) za vsako od neodvisnih spremenljivk v modelu.

4.3. DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Pri določanju diagnostične občutljivosti in specifičnosti je potreben izračun referenčnega območja iz referenčnih vrednosti. Po definiciji mednarodne federacije za klinično kemijo (IFCC) so referenčne vrednosti tiste vrednosti, za katere je navedena populacija (za koga) in metodologija izdelave (kako). Ustvarjene so z analizo bioloških vzorcev večjega števila referenčnih oseb, pri katerih ne moremo potrditi bolezni, ki bi lahko vplivala na spremembo laboratorijske preiskave. Pri izračunu referenčnega območja gre vzeti v obzir morebitne vplive analitske metode, lokalne populacijske posebnosti, predanalitsko fazo (standardizirani odvzemi) in biološke dejavnike (74).

Vzorec naše raziskave je premajhen, da bi lahko govorili o referenčni vrednosti, in ker ta še ni bila določena, smo preračunali mejno vrednost koncentracije endotelina v kontrolni skupini. Ta vrednost je veljavna in uporabna le v dotični raziskavi.

4.3.1. Določitev mejne vrednosti koncentracije endotelina (ang. »cut-off value«)

Mejne vrednosti koncentracije endotelina smo izračunali z uporabo podatkov (Preglednica XXVI), pridobljenih iz testiranja zdravih preiskovank (kontrolna skupina). Iz prejšnjih izračunov smo že ugotovili, da se porazdelitev podatkov v kontrolni skupini bistveno ne razlikuje od normalne porazdelitve ($p > 0,05$), na podlagi česar smo lahko izračunali mejne vrednosti (Graf 4).

Formuli za izračun spodnje in zgornje mejne vrednosti:

$$\text{Spodnja meja [ENDOTELIN, ng/L]} = m - t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD$$

$$\text{Zgornja meja [ENDOTELIN, ng/L]} = m + t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD$$

m = povprečna vrednost spremenljivke,

$t(0,975, n-1)$ = kritična t vrednost pri enostranskem tveganju s prostostno stopnjo $n-1$,

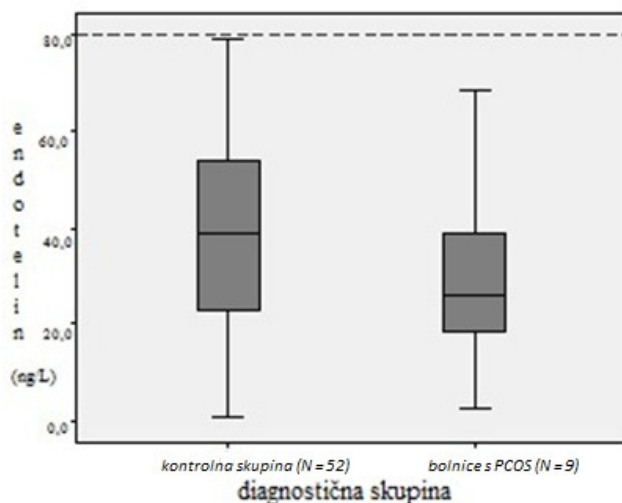
n = število preiskovancev v vzorcu,

SD = standardna deviacija.

Preglednica XXVI: Podatki za izračun spodnje in zgornje mejne vrednosti.

povprečje (m)	standardna deviacija (SD)	$t(0,975; 52)$	n
38,826	21,076	2,009	53

Z uporabo podatkov iz zgornje preglednice, dobimo negativno vrednost za spodnjo mejo, kar praktično ni verjetno, zato ta izračun ne upoštevamo. Za določitev mejne vrednosti, ki določa ali je test pozitiven ali negativen se uporablja vrednost zgornje meje, ki ob uporabi podatkov kontrolne skupine znaša 81,57 ng/L.



Graf 4: Kvartilni diagram – primerjava porazdelitve rezultatov za koncentracijo endotelina kontrolne skupine in diagnostične skupine 1. Izračunana mejna vrednost (81,57 ng/L) je označena z črtkano črto. ($N = \text{število preiskovank}$).

Iz kvartilnega diagrama je razvidno, da niti ekstremne vrednosti posamezne diagnostične skupine ne dosegajo mejne vrednosti.

4.3.2. Občutljivost in specifičnost glede na zdrave preiskovanke

Občutljivost in specifičnost endotelina kot diagnostičnega označevalca smo izračunali glede na kontrolno skupino zdravih preiskovank. Iz primerjave vrednosti deskriptivnih statistik med obema diagnostičnima skupinama smo ugotovili, da je povprečna vrednost kontrolne skupine večja od povprečne vrednosti PCOS bolnic.

Na osnovi mejne vrednosti 81,57 ng/L smo rezultate razvrstili na resnično pozitivne, resnično negativne, lažno pozitivne in lažno negativne (Preglednica XXVII).

Preglednica XXVII: Število pozitivnih in negativnih testov glede na diagnozo (*RP* – resnično pozitiven test pri ženskah s PCO na UZ; *RN* – resnično negativen test pri zdravi preiskovanki; *LP* – lažno pozitiven test pri zdravi preiskovanki; *LN* – lažno negativen test pri ženski s PCO na UZ).

	pozitiven test	negativen test
diagnostična skupina 0	LP = 0	RN = 53
diagnostična skupina 1	RP = 0	LN = 9

Diagnostično specifičnost in občutljivost smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$\text{Diagnostična občutljivost [\%]} = \frac{RP \times 100}{RP + LN} \quad \text{Diagnostična specifičnost [\%]} = \frac{RN \times 100}{RN + LP}$$

Diagnostična specifičnost je pri mejni vrednosti koncentracije endotelina 100 %, občutljivost pa 0 %. Torej je delež zdravih, z negativnim testom 100%, medtem, ko je delež bolnih s pozitivnim testom 0 % - kar kaže na pičel diagnostični pomen določanja koncentracije endotelina pri PCOS bolnicah. Z nižanjem mejne vrednosti bi lahko pridobili na občutljivosti, a to bi posledično zmanjšalo specifičnost (63). Za izračun občutljivosti in specifičnosti je potrebno poznavanje dejanskega stanja oseb glede na preučevano bolezen. Z uporabo referenčnih diagnostičnih metod, ki so zelo blizu pravemu stanju izračunamo oba parametra. V našem primeru je to ultrazvočna slika jajčnikov, kjer smo ugotavljali prisotnost PCO.

Da bi izvedeli, kolikšni sta občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih, smo izvedli ROC analizo. Vrednosti celotnega vzorca (obeh skupin skupaj) smo razdelili na več mejnih vrednosti. Pri vsaki mejni vrednosti smo izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost. Na podlagi teh podatkov smo narisali ROC krivuljo. Površina pod ROC krivuljo predstavlja verjetnost, da bo klasifikator (koncentracija endotelina) pravilno ločil pozitivne od negativnih primerov (bolnice od kontrol). Klasifikator torej predstavlja verjetnost, da bo pripisal višji rang naključno izbrani bolnici s PCOS kot naključno izbrani osebi iz kontrolne skupine. Površino (AUC) pod ROC krivuljo zato povezujemo z natančnostjo klasifikatorja (Preglednica XXVIII). Pri izvedbi ROC analize podatke rangiramo, vrednosti za AUC pa se gibljejo med 0 in 1 (Graf 5).

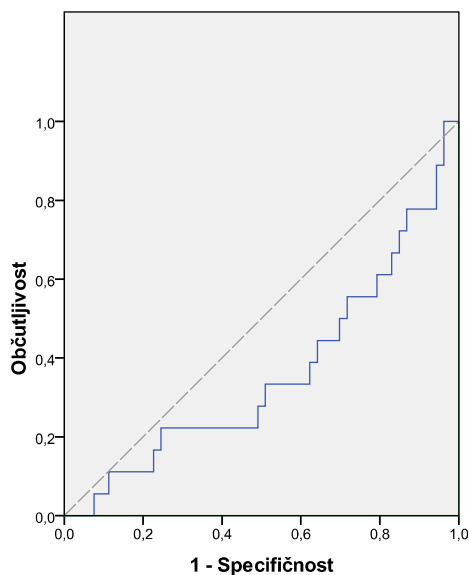
V Prilogi 2 so prikazane vrednosti za občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih. Prikazane mejne vrednosti so preračunane tako, da najmanjšo mejno vrednost dobimo, ko od najnižje izmerjene vrednosti odštejemo 1, najvišjo mejno vrednost pa tako, da k najvišji izmerjeni vrednosti prištejemo 1. Vse vmesne mejne vrednosti pa dobimo iz povprečne vrednosti dveh zaporednih meritev (75).

Preglednica XXVIII: Analiza ROC za koncentracijo endotelina.

AUC	p ^a	95% interval zaupanja	
		spodnja meja	zgornja meja
0,373	0,227	0,168	0,579

a. Ničelna hipoteza; resnično območje = 0.5

Na podlagi verjetnosti (0,373) lahko zaključimo, da večje koncentracije endotelina glede na kontrolno skupino ne predstavljajo večje verjetnosti za prisotnost PCOS. Koncentracija endotelina v skupini žensk s potrjenimi PCO na UZ se statistično značilno ne razlikuje od koncentracije endotelina kontrolne skupine, saj je p vrednost večja od 0,05 ($p = 0,227$).



Graf 5: ROC krivulja za endotelin (PCOS/kontrola). (modra črta - ROC krivulja, črtkana črta - diagonala, razdeli ROC prostor na grafu).

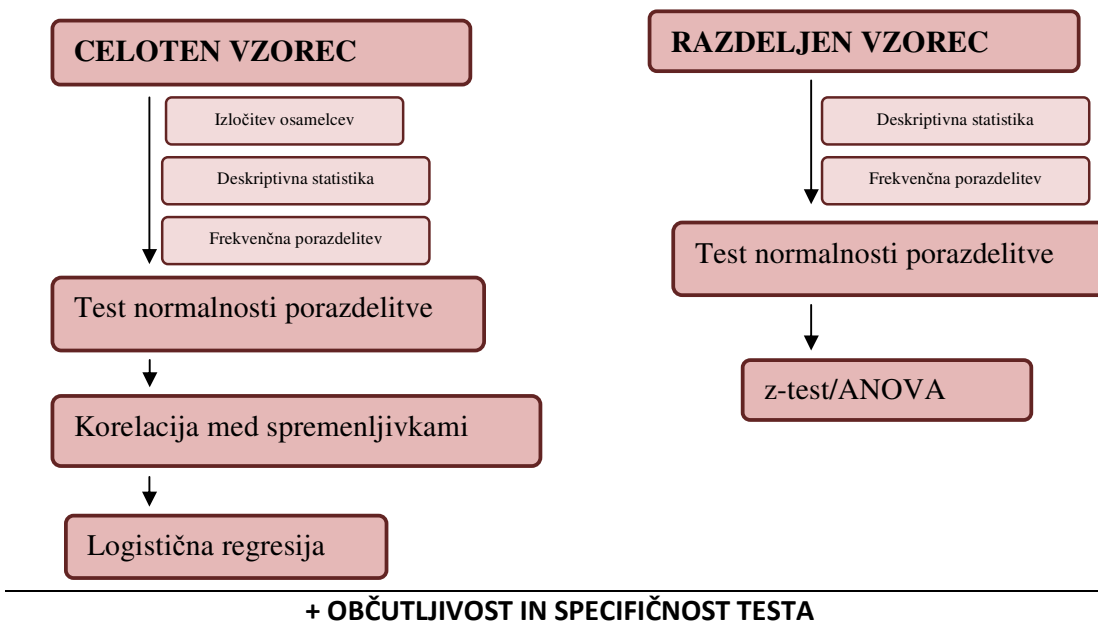
5. RAZPRAVA

ET-1, kot najmočnejši trenutno poznan vazokonstriktor, predstavlja zanimiv protein za raziskovanje njegovih učinkov na različne organe in organske sisteme. Na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana se že nekaj časa ukvarjajo z ugotavljanjem pomena ET-1 kot diagnostičnega označevalca za različna obolenja. V sodelovanju z Ginekološko kliniko Ljubljana so se odločili preveriti tudi njegovo povezavo z zelo heterogenim sindromom PCO. Literaturni viri (53, 54, 55) predhodno že narejenih kliničnih študij dokazujejo povišane vrednosti ET-1 pri ženskah s PCOS (ne glede na njihov ITM) v primerjavi s kontrolno skupino.

Endotelini so pomembni pri uravnavanju številnih funkcij ovarijskega sistema, v katerem so enakomerno porazdeljeni endotelinski receptorji. Zaradi tega sklepajo, da neusklajena aktivacija endotelinskih receptorjev lahko rezultira v napakah z endotelinom reguliranih bioloških procesov, česar posledica je med drugim tudi pojav policističnih ovarijev.

Plazemskim vzorcem zdravih žensk in žensk s potrjenim PCOS smo izmerili koncentracijo omenjenega potencialnega diagnostičnega označevalca. Testiranja so bila izvedena z encimsko-immunskim testom ELISA.

Statistično vrednotenje smo zastavili po prikazanem načrtu dela (Shema 3).



Shema 3: Načrt statističnega vrednotenja rezultatov.

5.1. VREDNOSTI PLAZEMSKE KONCENTRACIJE ENDOTELINA – CELOTNA SKUPINA

Plazemske koncentracije ET-1 v krvi 63-ih preiskovank smo statistično analizirali kot enovito celoto, nato pa še razdeljeno na kontrolno skupino in skupino bolnic. Pred izvedbo statističnih testov smo preverili prisotnost osamelcev, zaradi česar smo eno meritev izključili iz nadaljnjih raziskav. Za to vrednost (izrazito povišana koncentracija endotelina) sklepamo, da je prišlo bodisi do napake pri meritvi oz. izvedbi testa bodisi ima bolnica neko endokrinopatijo, ki znatno poviša koncentracijo endotelina.

Z deskriptivno statistiko smo dobili splošne lastnosti celotne skupine preiskovank. Iz rezultatov smo lahko razbrali še vrednost območja za posamezno spremenljivko, kar predstavlja razliko med najvišjo in najnižjo vrednostjo. Območje je merilo razpršenosti spremenljivke, je pa zelo neobčutljivo na variabilnost.

S Kolmogorov-Smirnov testom smo določili porazdelitev rezultatov v skupini. Rezultati se porazdeljujejo po normalni distribuciji. Standardna deviacija je zelo visoka, kar nakazuje veliko razpršenost podatkov, zaradi česar smo se odločili še za izvedbo logistične regresije, s katero smo želeli ugotoviti vpliv parametrov na odvisno spremenljivko. Pri interpretaciji rezultatov smo ugotovili, da niti starost niti koncentracija endotelina ne vplivajo statistično značilno na razvrščenost preiskovank v posamezno diagnostično skupino.

5.2. VREDNOSTI PLAZEMSKE KONCENTRACIJE ENDOTELINA – SKUPINA 0 in 1

V drugem delu smo primerjali rezultate med dvema diagnostičnima skupinama.

Diagnostična skupina 0 je kontrolna skupina, v katero je bilo vključenih 53 preiskovank. Vse preiskovanke so imela predhodni ginekološki ultrazvočni pregled in na njihovih ovarijih niso bile ugotovljene nikakršne anomalije. Z deskriptivno statistiko smo dobili splošne značilnosti kontrolne skupine. Naredili smo tudi izračun kvartilov, pri čemer nam vrednost 1. kvartila pove, da je 25 % vrednosti spremenljivke nižjih in 75 % vrednosti spremenljivke višjih od te koncentracije; 2. kvartil je v bistvu mediana – razdeli vzorec na dva enaka dela, tako je polovica vrednosti nižjih in polovica vrednosti višjih od te koncentracije; 3. kvartil pa pove, da je 75 % vrednosti nižjih in 25 % vrednosti višjih od te koncentracije.

Starostna struktura diagnostične skupine 0 se dokaj ujema s starostno strukturo celotnega vzorca, saj diagnostična skupina 0 zajema večinski odstotek le-tega.

V diagnostično skupino 1 je bilo vključenih 9 preiskovank, ki so se po ginekološkem ultrazvočnem pregledu, na katerem so jim ugotovili PCO, strinjale z vključitvijo v raziskavo. Tudi v tem primeru smo najprej pridobili splošne značilnosti skupine s pomočjo deskriptivne statistike.

S Kolmogorov-Smirnov testom smo določili porazdelitev rezultatov v obeh diagnostičnih skupinah. Ugotovili smo, da se rezultati porazdeljujejo po normalni distribuciji.

Glavni namen naše raziskave je bila primerjava koncentracij endotelina med diagnostičnima skupinama. Ob pregledu vrednosti deskriptivnih statistik smo opazili, da so rezultati med obema skupinama zelo primerljivi. Izkazalo se je, da ne obstaja statistično značilna razlika med obema skupinama, kar ni bilo po naših pričakovanjih.

Ker imamo dva neodvisna vzorca, smo z z-testom in ANOVO potrdili, da se koncentracija endotelina med obema skupinama ne razlikuje statistično značilno. Na osnovi tega lahko rečemo, da test ELISA ne loči med zdravimi in ženskami s PCOS. Razlog je lahko v nenatančnosti in netočnosti metode, saj konkretno za našo raziskavo nismo uspeli pridobiti podatkov o ponovljivosti v dnevu oziroma med dnevi.

Pri interpretaciji rezultatov statističnih analiz moramo upoštevati vse, kar bi lahko potencialno vplivalo nanje, npr:

- neenakomernost naših diagnostičnih skupin, saj je kontrolna skupina bistveno večja kot skupina bolnic,
- iz podatkov lahko razberemo, da je kontrolna skupina obsegala širši starostni razpon preiskovank kot skupina bolnic,
- spremembe v koncentraciji endotelina so lahko posledice raznih fizioloških stanj, saj je prisoten v številnih tkivih, zato zgolj z meritvijo ET nikakor ne bi mogli potrditi PCOS (potrebne so še dodatne preiskave obolelih),
- pilotno študijo izvajamo z namenom izboljšanja načrta raziskave, zato je pravilna interpretacija rezultatov ključnega pomena za izvedbo nadaljnjih raziskav.

Za potrditev pomena endotelina v diagnostiki PCOS bi vsekakor bile potrebne še dodatne raziskave, bodisi na večjem številu preiskovank bodisi z drugo imuno-kemijsko metodo, kar bi omogočilo lažjo interpretacijo rezultatov testiranja.

5.3. Občutljivost in specifičnost testa

V tretjem sklopu statističnih analiz smo izračunali učinkovitost metode za določanje plazemske koncentracije endotelina. V prvem koraku smo diagnostično specifičnost in občutljivost določili glede na kontrolno skupino zdravih preiskovank. Na podlagi rezultatov kontrolne skupine smo najprej izračunali mejne vrednosti koncentracije endotelina, pri čemer smo za spodnjo referenčno vrednost dobili negativno vrednost (kar praktično ni možno, zato je nismo upoštevali), za zgornjo referenčno vrednost pa smo dobili vrednost 81,57 ng/L. Na podlagi tega smo rezultate opredelili kot resnično pozitivne, resnično negativne, lažno pozitivne in lažno negativne ter izračunali specifičnost in občutljivost.

Diagnostično uporabnost endotelina smo opredelili še z analizo ROC. Površina pod krivuljo (AUC) je bila majhna, iz česar lahko zaključimo, da sem ELISA test ne more ločiti zdravih preiskovank od bolnic. Pri interpretaciji grafa si lahko pomagamo tudi z diagonalo, saj ROC krivulja pod njo nakazuje slabega klasifikatorja. Uporaba meritev koncentracije endotelina, po naših rezultatih, ne pripomore k diagnostiki PCOS, saj med diagnostičnima skupinama ni statistično značilnih razlik v koncentraciji endotelina ($p > 0,05$).

Medicinski laboratorij mora zagotoviti tako visoko kakovost in konzistentnost celotne svoje dejavnosti kot tudi zanesljivost in klinično relevantnost pridobljenih podatkov. Zanesljivost rezultatov je odvisna od zagotavljanja kakovosti znotraj laboratorija, kakovosti uporabljenih reagentov, standardov, kontrol, komercialnih kitov ter analitskih sistemov ter od zagotavljanja kakovosti predanalitske faze znotraj laboratorija in zunaj njega. Pri tolmačenju laboratorijskih rezultatov je potrebno vzeti v obzir biološko neponovljivost človeških vzorcev, ki je največji vir variabilnosti pri laboratorijskih meritvah. Biološka neponovljivost vzorcev je pomembna tudi za razumevanje značilnosti glede sprememb rezultatov ponovnih testiranj pri isti osebi in širše razumevanje kakovosti testov.

Primerjava naših ugotovitev z drugimi raziskavami:

S statistično obdelavo podatkov pri bolnicah s PCOS nismo potrdili nakazane povezave med povišano plazemsko koncentracijo endotelina in pojavnostjo PCO. Predvidevamo lahko, da sam ET-1 nima večje vloge pri nastanku PCOS.

Diamanti-Kandarakis in sodelavci so v vzorcu grških deklet, s podobno starostjo in ITM, določili povezavo med aktivnimi vnetnimi dejavniki in endotelijsko disfunkcijo ter njihovo povezavo z metabolnimi in hormonskimi motnjami značilnimi za PCOS. Ugotovili so povezavo vnetnih dejavnikov s pojavnostjo PCOS ter statistično značilno višjo koncentracijo ET-1 pri PCOS bolnicah kot v kontrolni skupini. S podrobnejšo analizo so ugotovili pozitivno korelacijo ET-1 s prostim androgenim indeksom ter negativno korelacijo s koncentracijo SHBG (54). Pri italijanski študiji ugotavljanja zgodnje vaskularne disfunkcije mladih deklet s PCOS so prišli do enakih ugotovitev glede ET-1 (55). Ugotovitve naše raziskave torej niso primerljive s tistimi iz literature.

Naše ugotovitve smo primerjali tudi z meritvami, kjer so določali pomen ET-1 v povezavi z drugimi obolenji. V prvi raziskavi so ugotavljali razliko v plazemski koncentraciji ET-1 med bolniki z osteoporozo (moški in ženske) in kontrolno skupino, saj je bil vpliv ET-1 na kostno remodelacijo že dokazan. Med skupinama preiskovancev ni bilo statistično značilnih razlik. Povprečna vrednost koncentracije ET-1 za kontrolno skupino je v tej raziskavi bistveno višja ($99,56 \pm 56,6$ ng/L) od naše povprečne vrednosti (76). Pri neki drugi študiji pa so ugotavljali pomen citokinov, ET-1 in tkivnih bazofilcev na pojav preeklampsije, za katero so značilne tako lokalne kot sistemske spremembe v ravnovesju citokinov ter pojav endotelijске disfunkcije (77). Naredili so primerjavo med nosečnicami s preeklampsijo, zdravimi nosečnicami in kontrolno skupino. Tudi v tem primeru niso bile potrjene statistično značilne razlike v koncentraciji ET-1 med skupinami. Povprečna vrednost koncentracije ET-1 za kontrolno skupino je v tej raziskavi bistveno manjša ($14,65 \pm 1,81$ ng/L) v primerjavi z zgoraj opisano raziskavo in tudi v primerjavi z našo raziskavo.

Iz tega lahko sklepamo, da se pri študijah na ljudeh zelo težko izognemo številnim dejavnikom, ki lahko vplivajo na koncentracijo ET-1, kot so: teža, višina, ITM, spol, starost, način življenja, hormonske spremembe, psihični in fizični stres. V obzir bi bilo potrebno vzeti tudi široko pojavnost ET-1 v številnih tkivih in spremembe koncentracije pri različnih motnjah/obolenjih, ki jih lahko imajo preiskovanci.

6. SKLEP

Namen diplomskega dela je bila opredelitev diagnostičnega pomena meritev plazemskih koncentracij endotelina pri PCOS bolnicah.

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Na osnovi primerjave rezultatov med obema diagnostičnima skupinama smo ugotovili, da plazemski test ELISA ne loči med ženskami s prisotnimi PCO in ženskami z zdravimi ovariji.
- Ker referenčna vrednost za endotelin še ni bila določena, smo uporabnost testa za razločevanje med zdravimi preiskovankami in PCOS bolnicami preverili s pomočjo določitve mejne vrednosti kontrolne skupine.
- Boljšo reprezentativnost zaključkov bi dobili, če bi raziskavo razširili na večje število bolnic in primerjali imuno-kemijsko metodo ELISA s katero drugo metodo merjenja endotelina v plazmi (npr. z metodo kemiluminiscence).
- Smiselno bi bilo določiti mejno vrednost na večjem številu zdravih preiskovancev in narediti raziskavo na približno enako velikih diagnostičnih skupinah z ujemajočo se starostno strukturo (s tem bi tudi pridobili na sami statistični teži raziskave).
- Zaradi številnih patofizioloških stanj, ki spremljajo PCOS bolnice, bi bilo smiselno pri raziskavi upoštevati veliko heterogenost skupine pacientk.
- Smiselno bi bilo upoštevati široko pojavnost endotelina v številnih tkivih ter spremembe koncentracije pri različnih obolenjih, zaradi česar bi pri raziskavi kazalo vzeti v obzir vse morebitne moteče metodološke in biološke dejavnike, ki poleg patofizioloških stanj vplivajo na sestavo bioloških tekočin. Metodološki dejavniki so lahko predanalitski (odvzem vzorca), analitski (analiza vzorca) ali poanalitski (tolmačenje rezultatov), biološki dejavniki pa so lahko dolgotrajni (genski, dejavniki tveganja, ciklični ritmi) ali kratkotrajni (življenjski slog – prehranjevanje, psihofizična aktivnost, čas in način odvzema ter transport vzorca).
- Smiselno bi bilo upoštevati problematiko pridobivanja večjega števila vzorcev in njihovo biološko neponovljivost ter posledičen vpliv na spremljanje bolezni.
- V naši raziskavi je bil vzorec preiskovank premajhen, da bi lahko z gotovostjo potrdili rezultate raziskave.

7. LITERATURA

1. Borko E, Takač I: Ginekologija, 2. dopolnjena izd., Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola, Maribor, 2006: 25-28, 35-41.
2. Monga A, Dobbs S: Gynaecology by ten teachers, 19th edition, Hodder Arnold, London, 2011: 43-45.
3. Kocijančič A: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 8-21, 256.
4. Levy MN, Stanton BA, Koepfen BM: Berne & Levy principles of physiology, 4th edition, Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006: 647-60, 699-11, 724-46.
5. <http://www.training.seer.cancer.gov/anatomy/reproductive/female/ovaries.html> [25.4.2012]
6. http://www.en.wikipedia.org/wiki/Menstrual_cycle [25.4.2012]
7. Kobal B: Nevroendokrini kontrola reprodukcije. Zbornik Na stičiščih psihiatrije in ginekologije, 2000: 36-45. (<http://www.pb-begunje.si/Osnova/file.php?id=395&db=prisonke> [25.4.2012]).
8. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P: Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 2009; 7: 40.
9. Balen A: The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. *Best practice & research, Clinical obstetrics & gynaecology* 2004; 18: 685-706.
10. <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh26-4/274-281.htm> [25.4.2012]
11. Studen KB, Preželj J, Kocjan T, Pfeifer M: Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdravniški vestnik* 2009; 78: 129-35.
12. Lee JY, Baw C-Kun, Gupta S, Aziz N, Agarwal A: Role of oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Current Women's Health Reviews* 2010; 6: 96-107.
13. Hart R, Hickey M, Franks S: Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best practice & research, Clinical obstetrics & gynaecology* 2004; 18: 671-83.
14. Hu Z, Wang Y, Qiao J, Li M, Chi H, Chen X: The role of family history in clinical symptoms and therapeutic outcomes of women with polycystic ovary syndrome. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2010; 108: 35-9.
15. Malik-Aslam A, Reaney MD, Speight J: The suitability of polycystic ovary syndrome-specific questionnaires for measuring the impact of PCOS on quality of life in clinical trials. *Value in health: the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research* 2010; 13: 440-6.
16. Reckelhoff JF: Polycystic ovary syndrome: androgens and hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1220-1.
17. Dewailly D: Definition and significance of polycystic ovaries. *Baillière's clinical obstetrics and gynaecology* 1997; 11: 349-68.
18. Atiomo W, Pearson S, Shaw S, Prentice A, Dubbins P: Ultrasound criteria in the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Ultrasound in Medicine and Biology* 2000; 26: 977-80.
19. <http://www.drthchang.com.au/docs/PCOS.pdf> [25.4.2012]
20. Fraser IS, Kovacs G: Current recommendations for the diagnostic evaluation and follow-up of patients presenting with symptomatic polycystic ovary syndrome. *Best practice & research, Clinical obstetrics & gynaecology* 2004; 18: 813-23.
21. Laivuori H, Kaaja R, Rutanen EM, Viinikka L, Ylikorkala O: Evidence of high circulating testosterone in women with prior preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1998; 83: 344-7.
22. Lanham MSM, Lebovic DI, Domino SE: Contemporary medical therapy for polycystic ovary syndrome. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 2006; 95: 236-41.
23. Setji TL, Brown AJ: Polycystic ovary syndrome: diagnosis and treatment. *The American journal of medicine* 2007; 120: 128-32.
24. Ribič-Pucelj M, Tomažević T, Vogler A, Vrtačnik-Bokal E, Drobnič S, Zorn B, Meden-Vrtovec H: Kirurško zdravljenje policističnih jajčnikov pri neplodnih bolnicah. *Zdravstveni Vestnik* 2003; 72: 101-4.
25. Farquhar CM: The role of ovarian surgery in polycystic ovary syndrome. *Best practice & research, Clinical obstetrics & gynaecology* 2004; 18: 789-802.
26. http://www.danaise.com/laparoscopic_surgery_7-5.htm [25.4.2012]

27. Pentz I: Sindrom policističnih jajnika. *Medicus* 2010; 19: 5-11.
28. Thiboutot D: New treatments and therapeutic strategies for acne. *Archives of family medicine* 2000; 9: 179-87.
29. Balen A: Polycystic ovary syndrome — a systemic disorder? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; 17: 263-274.
30. Moran LJ, Hutchison SK, Meyer C, Zoungas S, Teede HJ: A comprehensive assessment of endothelial function in overweight women with and without polycystic ovary syndrome. *Clinical science* 2009; 116: 761-70.
31. King J: Polycystic ovary syndrome. *Journal of midwifery & women's health* 2006; 51: 415-22.
32. Ehrmann D, Liljenquist D, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN: Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006; 91: 48-53.
33. Wild R: Dyslipidemia in PCOS. *Steroids* 2012; 77: 295-9.
34. Chang RJ: A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 2004; 191: 713-7.
35. Compeer MG, Suylen DPL, Hackeng TM, De Mey JGR: Endothelin-1 and -2: two amino acids matter. *Life sciences* 2012; 6-11.
36. Inoue a, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 2863-7.
37. Masaki T: Historical review: Endothelin. *Trends in pharmacological sciences* 2004; 25: 219-24.
38. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T: The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 14954-14959.
39. Masaki T: The endothelin family: an overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000; 35: 3-5.
40. Terry J. Openorth, Jinshyun R. Wu-Wong KS: Endothelin-converting enzymes. *The FASEB Journal* 1992; 2653-2659.
41. Simonson MS, Wang Y, Herman WH: Nuclear signaling by endothelin-1 requires Src protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271: 77-82.
42. Vignon-zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N: Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sciences* 2012; (<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.026> [26.3.2012])
43. DWP H, Henry P, Goldie R: Endothelin and the respiratory system. *TiPS* 1993; 14: 29-32.
44. Yang-Te T, Lin H-C, Yang MC-M, Fa-Yuah L, Ming-Chih H, Ling-Sheng C, Shou-Dong L: Plasma endothelin levels in patients with cirrhosis and their relationships to the severity of cirrhosis and renal function. *Journal of Hepatology* 1995; 23: 681-688.
45. Lee ME, De la Monte SM, Ng SC, Bloch KD, Quertermous T: Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 1990; 86: 141-7.
46. Queen T: Endothelin expression in the uterus. *Science* 1995; 53: 209-214.
47. Sakamoto M, Sakamoto S, Kubota T, Aso T, Azuma H: Localization and role of endothelin-1 and endothelin receptors in the human fallopian tube. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7: 1057-63.
48. Meidan R, Levy N: Endothelin-1 receptors and biosynthesis in the corpus luteum: molecular and physiological implications. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 287-298.
49. Ko C: Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology* 2005; 147: 1770-1779.
50. Božič B, Raščan Mlinarič I: *Imunologija v farmaciji, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 80-1.*
51. Božič B: *Laboratorijska diagnostika avtoimunskih motenj in preobčutljivosti, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002: 52-7.*
52. Vozelj M: *Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2001: 112-3.*
53. Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I: Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86: 4666-4673.
54. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Piperi C, Protogerou A, Katsikis I, Paterakis T, Lekakis J, Panidis D: Inflammatory and endothelial markers in women with polycystic ovary syndrome. *European Journal of Clinical Investigation* 2006; 36: 691-697.

55. Orio F, Palomba S, Cascella T, De Simone B, Di Biase S, Russo T, Labella D, Zullo F, Lombardi G, Colao A: Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89: 4588-93.
56. Biomedica: Endothelin - enzyme immunoassay for the quantitative determination of human endothelin (1-21) in serum, EDTA plasma, urine, saliva and cell culture supernatants, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Dunaj.
57. http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf [13.5.2012]
58. Wisdom BG: Enzyme-immunoassay. *Clinical Chemistry* 1976; 22: 1243-55.
59. <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=69&sim=721&cnt=1> [13.5.2012]
60. <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=69&sim=699&cnt=1> [13.5.2012]
61. <http://www.adaltis.net/content/product/instruments/personalLAB/default.aspx> [15.5.2012]
62. Adaltis S.r.l.: Personal LAB™ fully automated 2 microplates analyzer, Rim 2011, Ref: BR01008 V2.2.
63. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/emšf-Socialna_farmacija/Predavanja/SF6_-_Odločitvena_analiza.pdf [20.5.2012]
64. Košmelj K: *Uporabna statistika*, 2. izdaja, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2007: 35-48, 118, 177-187.
65. Adamič Š: *Temelji biostatistike*, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1989.
66. Bewick V, Cheek L, Ball J: Statistics review 9: one-way analysis of variance. *Critical care* 2004; 8: 130-6.
67. http://stari.bf.uni-lj.si/statistika/logisticna_regresija_1.pdf [20.5.2012]
68. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/d-Farmaceutvska_informatika/SPSS_navodila.pdf [23.5.2012]
69. http://mp.feri.uni-mb.si/osebna/lesnjak/STA_ITK/p_1.pdf [25.5.2012]
70. http://www.fu.uni-lj.si/personal/Zigaa/Bolonja-visokosolski/STAT_Frekv_SPLET.pdf [25.5.2012]
71. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html> [28.5.2012]
72. <http://www.le.ac.uk/bl/gat/virtualfc/Stats/ttest.html> [28.5.2012]
73. Press SJ, Wilson S: Choosing between logistic regression and discriminant analysis. 2007; 73: 699-705.
74. Solberg HE: The IFCC recommendation on estimation of reference intervals, the RefVal program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2004; 42: 710-714.
75. <http://www.medcalc.org/manual/roc-curves.php> [29.5.2012]
76. Muratli H, Celebi L, Hapa O, Bicimoglu A: Comparison of plasma endothelin levels between osteoporotic, osteopenic and normal subjects. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2005; 6: 49.
77. Noyan T, Kulusari A, Kamaci M: Serum mast cell tryptase, eosinophil cationic protein, endothelin-1 and cytokine levels in preeclampsia and healthy pregnancy. *Turkish Journal of Biochemistry* 2009; 34: 19-24.

8. PRILOGA

8.1. PRILOGA 1: Prikaz plazemskih koncentracij endotelina in starosti preiskovank.

Meritve pri ženskah s potrjenimi PCO na UZ, so obarvane temneje.

št. vzorca	endotelin (ng/L)	starost (leta)
1	0,5	31,1
2	11,8	37,9
3	10,4	16,9
4	30,4	39,4
5	18,2	32,5
6	25,6	33,7
7	39,1	23,5
8	46,4	35,5
9	46,6	32,6
10	42,4	37,1
11	54,2	19,2
12	29,6	29,9
13	52,8	41,9
14	64,1	28,9
15	69,6	29,6
16	65,2	40,2
17	38,1	33,3
18	62,0	33,8
19	68,4	26,2
20	66,8	24,7
21	66,4	33,2
22	45,5	34,7
23	65,5	23,2
24	74,3	19,6
25	19,5	39,9
26	53,1	27,7
27	66,8	33,9
28	62,4	31,6
29	61,3	28,6
30	71,2	16,0
31	28,0	43,1
32	6,4	29,9
33	28,5	24,9
34	40,4	16,1
35	38,9	33,1
36	117,1	30,6
37	56,8	27,3
38	37,1	33,1
39	0,7	33,7
40	27,5	24,7
41	25,9	31,6
42	26,9	31,9
43	79,1	28,3
44	30,8	26,3
45	2,4	23,9
46	46,2	29,6
47	1,9	29,9

48	2,9	38,2
49	46,4	30,3
50	40,9	24,7
51	22,3	50,3
52	19,5	41,2
53	24,9	33,6
54	8,2	25,7
55	20,6	38,9
56	40,2	38,8
57	22,4	30,5
58	22,9	28,2
59	33,5	32,7
60	32,0	23,3
61	49,7	35,9
62	15,6	31,5
63	18,5	33,2

8.2 PRILOGA 2: Občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih.

Mejna vrednost	Občutljivost	1 - Specifičnost
-0,500	1,000	1,000
0,600	1,000	0,981
1,300	1,000	0,962
2,150	1,000	0,943
2,650	0,889	0,943
4,650	0,778	0,943
7,300	0,778	0,925
9,300	0,778	0,906
11,100	0,778	0,887
13,700	0,778	0,868
16,900	0,778	0,849
18,350	0,667	0,849
19,000	0,667	0,830
20,050	0,667	0,792
21,450	0,556	0,792
22,350	0,556	0,774
22,650	0,556	0,755
23,900	0,556	0,736
25,250	0,556	0,717
25,750	0,556	0,698
26,400	0,444	0,698
27,200	0,444	0,679
27,750	0,444	0,660
28,250	0,444	0,642
29,050	0,444	0,623
30,000	0,333	0,623
30,600	0,333	0,604

31,400	0,333	0,585
32,750	0,333	0,566
35,300	0,333	0,547
37,600	0,333	0,528
38,500	0,333	0,509
39,000	0,333	0,491
39,650	0,222	0,491
40,300	0,222	0,472
40,650	0,222	0,453
41,650	0,222	0,434
43,950	0,222	0,415
45,850	0,222	0,396
46,300	0,222	0,377
46,500	0,222	0,340
48,150	0,222	0,321
51,250	0,222	0,302
52,950	0,222	0,283
53,650	0,222	0,264
55,500	0,222	0,245
59,050	0,222	0,226
61,650	0,111	0,226
62,200	0,111	0,208
63,250	0,111	0,189
64,650	0,111	0,170
65,350	0,111	0,151
65,950	0,111	0,132
66,600	0,111	0,113
67,600	0,111	0,075
69,000	0,000	0,075
70,400	0,000	0,057
72,750	0,000	0,038
76,700	0,000	0,019
80,100	0,000	0,000