

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA TIŠLER

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITENI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA TIŠLER

VPLIV RAZLIČNIH POSTOPKOV ZUNAJTELESNE OPLODITVE
NA KONCENTRACIJO STEROIDNIH HORMONOV V KRVI

THE IMPACT OF DIFFERENT IN VITRO FERTILIZATION
PROCEDURES ON THE CONCENTRATION OF STEROID
HORMONES IN THE BLOOD

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih označevalcev pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, ki je sprejel mentorstvo, si vzel čas zame in mi s strokovnimi nasveti pomagal pri nastajanju diplomske naloge.

Hvala sošolki Ani Robar za iskreno prijateljstvo, medsebojno pomoč in vse tiste prijetne urice v času študija.

Hvala tebi, draga mami, ker si mi omogočila študij, za tvoje razumevanje in spodbudo.

Hvala tudi tebi, Dušan, za potrpežljivost, optimistične poglede in ker nikoli ne nehaš verjeti vame.

Najlepša hvala vsem, ki so mi pomagali priti do cilja.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Mateja Tišler

Ljubljana, januar 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO PREGLEDNIC.....	III
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO GRAFOV	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
 1 UVOD	1
1.1 NEPLODNOST	1
1.1.1 Definicija	1
1.1.2 Vzroki ženske neplodnosti	1
1.1.3 Diagnostika.....	2
1.1.4 Zdravljenje	3
1.2 OPLODITEV Z BIOMEDICINSKO POMOČJO (OBMP).....	4
1.2.1 Zgodovina postopkov OBMP.....	4
1.2.2 Metode OBMP	5
1.2.2.1 IUI (intrauterina inseminacija).....	5
1.2.2.2 ICSI (neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice).....	5
1.2.2.3 IVF-ET (in vitro fertilizacija s prenosom zarodkov)	5
1.2.3 Zapleti postopkov OBMP.....	7
1.3 JAJČNA CELICA V POSTOPKU OBMP	8
1.3.1 Fiziologija jajčnika	8
1.3.2 Menstruacijski cikel	9
1.3.3 Jajčni folikel	10
1.3.4 Jajčna celica.....	11
1.3.4.1 Zgradba jajčne celice	11
1.3.4.2 Zrelost jajčnih celic	13
1.3.5 Oploditev	14
1.3.6 Ocena kakovosti zarodkov in oploditve	14
1.4 NARAVNI IN SPODBUJEN POSTOPEK ZTO	15
1.4.1 Naravni postopek ZTO.....	16
1.4.1.1 Modificiran naravni postopek ZTO	17
1.4.2 Spodbujen postopek ZTO.....	17
1.4.2.1 Pregled uporabe protokolov spodbujanja ovulacije na Ginekološki kliniki v Ljubljani	18
1.4.2.2 Zmerna oblika zunajtelesne oploditve	18
1.4.2.3 Konvencionalna zunajtelesna oploditev	18
1.5 SPOLNI HORMONI	19
1.5.1 Mehanizem delovanja spolnih hormonov	20
1.5.2 Progesteron.....	21
1.5.2.1 Sinteza progesterona	21

1.5.2.2	Učinki progesterona	22
1.5.3	Estradiol	23
1.5.3.1	Sinteza estrogenov	23
1.5.3.2	Metabolizem estrogenov	24
1.5.3.3	Učinki estrogenov	24
2	NAMEN DELA.....	26
3	MATERIALI in METODE	27
3.1	PROGESTERON.....	27
3.1.1	Princip metode.....	27
3.1.2	Reagenti.....	27
3.1.3	Vzorci	28
3.1.4	Umerjanje aparature	29
3.1.5	Postopek testa.....	29
3.1.6	Kontrola kakovosti	29
3.1.7	Opis kemiluminiscenčne imunološke metode	29
3.1.8	Rezultati	30
3.1.9	Pričakovane vrednosti	30
3.1.10	Specifične karakteristike analizatorja LIAISON.....	31
3.2	ESTRADIOL.....	35
3.2.1	Princip metode.....	35
3.2.2	Reagenti.....	35
3.2.3	Vzorci	36
3.2.4	Umerjanje aparature	37
3.2.5	Postopek testa.....	37
3.2.6	Kontrola kakovosti	37
3.2.7	Opis modificirane kemiluminiscenčne imunološke metode	38
3.2.8	Rezultati	38
3.2.9	Redčenje vzorcev	39
3.2.10	Pričakovane vrednosti	39
3.2.11	Specifične karakteristike analizatorja LIAISON.....	39
4	REZULTATI.....	44
4.1	OVREDNOTENJE SKUPINE	44
4.1.1	Serumske koncentracije vzorcev v naravnem postopku ZTO	45
4.1.2	Serumske koncentracije vzorcev v spodbujenem postopku ZTO	46
4.2	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	51
5	RAZPRAVA	59
5.1	VREDNOSTI SERUMSKE KONCENTRACIJE PROGESTERONA IN ESTRADIOLA	59
5.2	RAZLIKE MED NARAVNIMI IN SPODBUJENIMI CIKLUSI V SERUMSKI KONCENTRACIJI PROGESTERONA IN ESTRADIOLA	60
6	SKLEP	62
7	LITERATURA	63

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Terminologija postopkov ZTO.....	16
Preglednica II:	Vrednosti za določanje referenčnega območja analizatorja za progesteron	31
Preglednica III:	Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti.....	32
Preglednica IV:	Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti.....	32
Preglednica V:	Rezultati meritev vzorcev za določanje točnosti	33
Preglednica VI:	Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti.....	33
Preglednica VII:	Rezultati meritev vzorcev za določanje specifičnosti	35
Preglednica VIII:	Vrednosti za določanje referenčnega območja analizatorja za estradiol	39
Preglednica IX:	Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti.....	40
Preglednica X:	Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti.....	40
Preglednica XI:	Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti.....	40
Preglednica XII:	Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti.....	41
Preglednica XIII:	Rezultati meritev vzorcev za določanje specifičnosti	41
Preglednica XIV:	Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti.....	43
Preglednica XV:	Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracije progesterona v naravnem postopku.....	52
Preglednica XVI:	Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracije estradiola v naravnem postopku.....	52
Preglednica XVII:	Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracij progesterona v spodbujenem postopku.....	53
Preglednica XVIII:	Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracij estradiola v spodbujenem postopku	54
Preglednica XIX:	Rezultati t-testa za testiranje dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni porazdelitvi.....	54
Preglednica XX:	Rezultati Mann-Whitney testa za testiranje dveh neodvisnih vzorcev, ki ne sledita normalni porazdelitvi	55

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primer obolenja PCO.....	2
Slika 2:	Ciklične spremembe izločanja hormonov	3
Slika 3:	Shema postopka ICSI	5
Slika 4:	Prikaz različnih možnosti postopkov zunajtelesne oploditve.....	7
Slika 5:	Menstruacijski cikel.....	10
Slika 6:	Shema strukture jajčnika in različnih stadijev v razvoju foliklov	11
Slika 7:	Zrelo rumeno telesce	12
Slika 8:	Zrela jajčna celica, ki je obdana s celicami granuloze	13
Slika 9:	Shema jajčne celice, pridobljene za postopek zunajtelesne oploditve	14
Slika 10:	Aspiracija blastomere iz zarodka.....	15
Slika 11:	Zarodek tri dni in zarodek (blastocista) pet dni po oploditvi	15
Slika 12:	Ultrazvok jajčnih foliklov, pridobljenih v spodbujenem postopku ZTO	17
Slika 13:	Shema dvoceličnega sistema steroidogeneze	20
Slika 14:	Progesteron	21
Slika 15:	Metabolizem progesterona	22
Slika 16:	Estradiol.....	23
Slika 17:	Metabolizem estrogenov.....	24
Slika 18:	Analizator LIAISON	27
Slika 19:	Shema sendvič kemiluminiscenčne imunološke metode.....	30
Slika 20:	Komplet reagentov (integral).....	36
Slika 21:	Princip modificirane kemiluminiscenčne metode	38

KAZALO GRAFOV

Graf 1:	Razporeditev koncentracij progesterona v naravnem in spodbujenem ciklusu	56
Graf 2:	Razporeditev koncentracij estradiola v naravnem in spodbujenem ciklusu.....	56
Graf 3:	Prikaz meritev progesterona v naravnem ciklusu glede na referenčno vrednost ..	57
Graf 4:	Prikaz meritev estradiola v naravem ciklusu glede na referenčno vrednost	57
Graf 5:	Prikaz meritev progesterona v spodbujenem ciklusu glede na referenčno vrednost	58
Graf 6:	Prikaz meritev estradiola v spodbujenem ciklusu glede na referenčno vrednost..	58

POVZETEK

Zanositev je kompleksen proces, ki ga znanost še ni natančno raziskala, vseeno pa poznamo poglavite stopnje, ki so pogoj za uspešnost tega procesa. V primeru nezmožnosti zanositve v določenem času govorimo o neplodnosti. Neplodnost se povečuje med drugim tudi zaradi današnjega življenjskega sloga, zaradi katerega odlagamo nosečnost v čedalje poznejše obdobje.

Ena od možnosti zdravljenja neplodnosti je zdravljenje z metodami asistirane reprodukcije oziroma oploditve z biomedicinsko pomočjo. Najpogosteji način teh metod je zunajtelesna oploditev, ki jo opravljamo z jajčnimi celicami pridobljenimi v naravnih in spodbujenih ciklusih. Nadzorovano hiperstimulacijo uporabljamo, ker na ta način povečamo število pridobljenih jajčnih celic. Zaradi določenih zapletov, ki so povezani s stimulacijo jajčnikov, je v zadnjem času oživilo zanimanje za naravni postopek. Določanje koncentracije steroidnih hormonov v krvi je pomembno pri obeh postopkih, saj je prav koncentracija hormonov v krvi poleg ustrezne velikosti foliklov merilo za zrelost foliklov.

V diplomski nalogi smo se zato odločili, da bomo primerjali serumske koncentracije steroidnih hormonov ter na ta način opredelili dva različna postopka zunajtelesne oploditve. Zanimale so nas povprečne koncentracije hormonov in ali se te statistično razlikujejo. V skupino naravnega ciklusa je bilo vključenih 48 patientk, v skupino spodbujenega ciklusa pa 31 patientk. S pomočjo kemiluminiscenčne metode smo pri obeh skupinah izmerili serumske koncentracije progesterona in estradiola. Na podlagi statistične obdelave zbranih podatkov smo potrdili dejstvo, da so vrednosti hormonov v naravnem ciklusu nižje kot v spodbujenem ciklusu. Povprečna vrednost progesterona v naravnem ciklusu je 5.7 nmol/L, v spodbujenem ciklusu pa 14.9 nmol/L. Za estradiol je povprečna vrednost 2.1 nmol/L v naravnem ciklusu in 2.8 nmol/L v spodbujenem ciklusu. Pokazali smo, da obstaja statistično značilna razlika med vrednostmi progesterona in estradiola izmerjenimi v spodbujenem ciklusu v primerjavi s tistimi, izmerjenimi v naravnem ciklusu. Ugotovili smo tudi, da je dopolnilna metoda merjenja steroidnih hormonov v krvi poleg ultrazvočne preiskave bistvenega pomena pri ugotavljanju zrelosti foliklov.

ABSTRACT

Conception is a complex process which the science has not yet researched carefully, but we still know the basic stages which represent a prerequisite for the success of this process. When conception does not occur during a specified time, this is referred to as infertility. Infertility is increasing, which is also due to modern lifestyle that brings people to delay pregnancy to a later and later period.

One of the infertility treatment options is treatment with methods of assisted reproduction or medically assisted procreation. The most common method is in vitro fertilization, which is done with egg cells obtained in natural and stimulated cycles. Controlled hyperstimulation is used since it increases the number of egg cells obtained. Due to certain complications associated with ovarian stimulation, there has lately been more interest to revive the natural procedure. Determining the concentration of steroid hormones in the blood is important in both processes, since the concentration of hormones in the blood together with the appropriate follicle size represents the criterion for the maturity of the follicles.

In the thesis we have therefore decided to compare serum concentrations of steroid hormones and thus identify two different procedures of in vitro fertilization. We were interested in the average concentrations of hormones and whether they were statistically different. There were 48 patients included in the natural cycle group and 31 patients in the group of stimulated cycle. Serum concentrations of progesterone and estradiol were measured in both groups, using the chemiluminescent method. On the basis of statistical processing of the collected data, we confirmed the fact that hormone levels in a natural cycle are lower than in a stimulated cycle. The average value of progesterone in a natural cycle was 5.7 nmol/L, and in a stimulated cycle 14.9 nmol/L. The average value of estradiol was 2.1 nmol/L in a natural and 2.8 nmol/L in a stimulated cycle. We have shown that there is a statistically significant difference between progesterone and estradiol levels measured in stimulated cycles compared with those measured in natural cycles. We have also found that the complementary method of measuring steroid hormones in the blood in addition to ultrasound examination is essential in determining the maturity of follicles.

SEZNAM OKRAJŠAV

OKRAJŠAVA	POMEN
FSH	folikle stimulirajoči hormon (follicle stimulating hormone)
LH	luteinizirajoči hormon (luteinizing hormone)
PRL	prolaktin (prolactin)
GnRH	gonadotropin sproščajoči hormon (gonadotrophin-releasing hormone)
OHSS	sindrom ovarijske hiperstimulacije (ovarian hyperstimulation syndrome)
IVF-ET	zunajtelesna oploditev s prenosom zarodka (in vitro fertilization-embryo transfer)
IUI	intrauterina inseminacija (intrauterine insemination)
ICSI	neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice (intra cytoplasmic sperm injection)
IGF	inzulinu podoben rastni faktor (insulin-like growth factor)
EGF	epidermalni rastni faktor (epidermal growth factor)
TGF	transformirajoči rastni faktor (transforming growth factor)
HCG	humani horiontski gonadotropin (human chorionic gonadotrophin)
HMG	humani menopavzni gonadotropin (human menopausal gonadotrophin)
GH	rastni hormon (growth hormone)
rFSH	rekombinantni folikle stimulirajoči hormon (recombinant follicle stimulating hormone)
cAMP	ciklični adenozinmonofosfat (cyclic adenosine monophosphate)
PRA, PRB	progesteronska receptorja (progesterone receptors)
ER α , ER β	estrogenska receptorja (estrogen receptors)
17 β -HSD	17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza (17Beta-Hydroxysteroid dehydrogenase)
CLIA	kemiluminiscenčna imunološka metoda (chemiluminescence immunoassay)
RLU	relativne luniniscenčne enote (relative luminiscence units)

1 UVOD

1.1 NEPLODNOST

1.1.1 Definicija

Najpogostejsa definicija neplodnosti je odsotnost zanositve po 12 mesecih rednih, nezaščitenih spolnih odnosov. Neplodnost prizadene približno 50-80 milijonov ljudi po svetu, rezultati študij v evropskih državah pa kažejo, da:

- 4 % parov, ki si želijo otroka, ostane brez naraščaja;
- 4-6 % parov ne uspe spočeti drugega otroka;
- 10-16 % parov ima izkušnje z zdravljenjem primarne neplodnosti;
- 6-17 % parov ima izkušnje z zdravljenjem sekundarne neplodnosti;
- približno 15 % populacije pride v rodnem obdobju življenja po medicinski nasvet zaradi neplodnosti (1).

Problem torej ni zanemarljiv.

1.1.2 Vzroki ženske neplodnosti

- Neprehodni ali odstranjeni jajcevodi (so zlasti posledica pogostih vnetij; zaradi pomanjkljive peristaltike ali pomanjkljive propustnosti za semenčice ali jajčece niso sposobni opravljati svoje funkcije).
- Endometriozra (bolezen, pri kateri se endometrijske žleze s stromo pojavljajo tudi zunaj maternične votline; vzroki so hormonski, genetski in imunološki; vpliva tudi okolje).
- Nerazvita ali prirojeno deformirana maternica (zanositev je možna, pogosto je to vzrok za spontane splave ali prezgodnje porode).
- Vnetje maternične sluznice (ugnezditve oplojenega jajčeca ni mogoča).
- Nepravilno delovanje jajčnika (lahko gre za obolenje policističnih jajčnikov (PCO), ki onemogoča sprostitev jajčnih celic v jajcevodu; lahko je prisotna motnja s strani višje ležečih centrov (hipofiza, hipotalamus), zaradi katerega v jajčniku ne dozorevajo jajčne celice ali pa jih sploh ni; lahko pa gre za prenehanje delovanja jajčnikov pred 37. letom starosti zaradi genetske nepravilnosti-mutacije kromosoma).
- Imunski vzroki (nastajanje protiteles v organizmu, ki onemogočajo gibanje semenčic ali prodor semenčice skozi ovojnico jajčne celice; lahko gre za protitelesa proti jajčni celici, npr. zoni peludici).

- Psihološki vzroki (stresne situacije in psihična napetost, ki preko oslabljenega osrednjega živčevja povzročijo neuravnovešeno delovanje jajčnikov in s tem izostanek ovulacije).
- Nezdrav način življenja (kajenje, prekomerno uživanje alkohola, zdravil in mamil) (2, 3, 4).

Reprodukтивno funkcijo lahko torej prizadenejo različne pridobljene ali prirojene motnje, ki spremenijo tako anatomske razmere kot normalno delovanje reproduktivnega sistema.



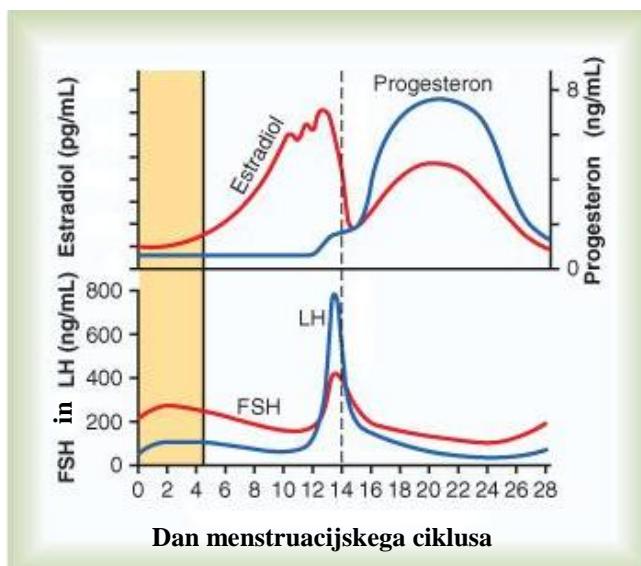
Slika 1: Primer obolenja PCO (2)

1.1.3 Diagnostika

Z diagnostičnimi postopki za ugotavljanje morebitnih vzrokov neplodnosti pričnemo takoj, ko par poišče pomoč. Če je ženska starejša od 35 let, priporočamo obravnavo že po 6 mesecih rednih, nezaščitenih spolnih odnosov, sicer pa v skladu z definicijo neplodnosti.

Pri neplodnem paru opravimo preiskave, s katerimi ocenimo, ali pride do odlaganja semenčic v nožnico in če so semenčice sposobne potovanja po maternici in jajcevodih. Ugotovimo tudi, ali v jajčniku nastajajo jajčne celice, ki so sposobne, da se oplodijo, in ali lahko tiste, ki so oplojene, potujejo v maternico in se tam tudi ugnezdi.

Z metodo laparoskopije lahko ocenimo obliko in prehodnost jajcevodov, položaj in kakovost jajčnikov. Histeroskopija je endoskopska preiskava za pregled maternične votline. Stanje ocenimo tudi z merjenjem bazalne temperature, preiskavo maternične sluznice in rentgenskim slikanjem maternice in jajcevodov. S preiskavo vsebnosti hormonov FSH, LH in PRL preverimo funkcionalne značilnosti spolnih žlez, po potrebi preiskave dopolnimo s preiskavami drugih hormonov (5).



Slika 2: Ciklične spremembe izločanja hormonov (6)

Neplodni par vedno obravnavamo kot biološko celoto in preiskave opravljamo pri obeh hkrati. Vzroki za neplodnost so približno v 30 % pri ženskah, v 30 % pri moških, v 25 % pri obeh, pri ostalih 15 % pa gre za idiopatsko ali nepojasnjeno neplodnost (2, 5).

Moška neplodnost predstavlja danes samostojno ali v povezavi z drugimi vzroki dokaj visok odstotek vseh vzrokov neplodnosti. Lahko je prirojena ali pridobljena. Najpomembnejša preiskava za odkrivanje moške neplodnosti je preiskava kakovosti semenskega izliva ali spermogram (2, 5).

1.1.4 Zdravljenje

Pomembno je, da dobro poznamo možne vzroke neplodnosti, saj le tako lahko pravilno izberemo diagnostične postopke in ne nazadnje tudi zdravljenje neplodnosti. Zdravljenje lahko obsega le terapijo s hormoni, ki jo pogosto kombiniramo s kirurškimi posegi na jajcevodih, jajčnikih ali maternici pri ženski in s kirurškimi posegi na semenovodih ali modih pri moškem. Za postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo se odločimo šele, če so vse predhodne aktivnosti zdravljenja neuspešne. Pomembno je upoštevati tudi faktor uspešnosti, kar pomeni, da mora ženska imeti vsaj en delajoč jajčnik, maternico, zdravo maternično sluznico, biti mora telesno in duševno zdrava in v starosti, ki je primerna za rojevanje (do 42 let) (2, 5).

1.2 OPLODITEV Z BIOMEDICINSKO POMOČJO (OBMP)

Slovenija se po številu otrok, rojenih po spočetju z OBMP na število prebivalcev, uvršča med razvitejše evropske države, saj je odstotek v evropskem povprečju 1.5 %. Po dostopnosti OBMP (število opravljenih postopkov na 1000 žensk, starih med 15-42 let) je Slovenija v evropskem povprečju (3.9 ciklusa). Po deležu otrok, ki se rodijo iz postopkov OBMP, pa se Slovenija uvršča celo na prvo mesto v Evropi. Rezultati so posledica našega zakona, ki dovoljuje oploditev vseh jajčnih celic in zamrzovanje vseh preostalih vitalnih zarodkov (7, 8).

1.2.1 Zgodovina postopkov OBMP

Osnove postopkov asistirane reprodukcije segajo v obdobje Leeuwenhoeka, ki je leta 1678 prvi videl semenčice. Imenoval jih je »animalcule« in takoj ugani njihov pomen. Spallanzani iz Pavie je leta 1784 opravil prvo uspešno osemenitev psice, ki je povrgla tri zdrave mladiče. O prvi uspešni osemenitvi pri ljudeh je poročal škotski kirurg dr. Johan Hunter leta 1790, prvi članek o umetni osemenitvi pa je objavil Dickinson leta 1920 v American Journal of Obstetrics and Gynecology. Leta 1890 je Walter Heape objavil prvo poročilo o uspešni oploditvi in prenosu zarodka pri zajcih, prvo z dokazi podprtlo poročilo pa Min Chuh Chang šele leta 1959 (5).

Leta 1978 se je po rojstvu Louise Brown, prvega otroka, spočetega zunaj materinega telesa, začelo obdobje uspehov pri zdravljenju neplodnosti pri ljudeh. Metoda je imela zelo nizko uspešnost v času rojstva prvega dojenčka (0.5 %), šele kasneje je postala uspešnejša (30-40 %). Merjeno s stopnjo spočetij na en cikel je celo presegla spontano spočetje v kateremkoli reproduktivnem obdobju življenja (5, 1).

V Sloveniji so leta 1982 na Ginekološki kliniki v Ljubljani ustanovili skupino za zunajtelesno oploditev, oktobra 1984 pa sta se po prvem uspešno izvedenem postopku rodili dvojčici, spočeti izven materinega telesa.

Prelomnemu letu 1978 je sledil hiter razvoj na vseh področjih, ki so kakorkoli povezana s humano reprodukcijo. Postopke je treba vseskozi izpopolnjevati in odkrivati nove načine za selekcijo najboljših gamet in zarodkov. To velja še danes, saj je rojstvo zdravega otroka s pomočjo postopka oploditve z OBMP odvisno od številnih znanih in manj znanih dejavnikov.

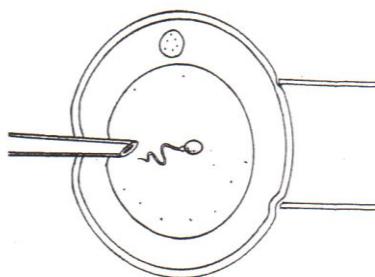
1.2.2 Metode OBMP

1.2.2.1 IUI (intrauterina inseminacija)

Gre za umetno osemenitev, pri kateri pripravljeno seme partnerja ali darovalca vnesemo v maternico s posebnim katetrom. Najpogosteje indikacije za IUI so idiopatska neplodnost, motnje ovulacije, blaga endometriozna, blage do zmerne spremembe kvalitete semena in motnje vnosa semenčic v阴道 ob odnosu. IUI naredimo v spodbujenem ciklusu. Postopek po potrebi ponavljamo štirikrat, spodbujanje pa sproti prilagajamo učinkom v prejšnjih poskusih (5). Večplodna nosečnost je najpomembnejši zaplet sicer uspešnega postopka IUI, nastane pa zaradi dozorevanja večjega števila foliklov po spodbujanju ovulacije. Pojavljanje večplodnih nosečnosti lahko omejimo s skrbno pripravo žensk pred postopkom in dobro kontroliranim spodbujanjem ovulacij (9).

1.2.2.2 ICSI (neposredni vnos semenčice v citoplazmo jajčne celice)

ICSI imenujemo tudi mikromanipulacija. Uporabljamo ga predvsem za zdravljenje hujših oblik moške neplodnosti in za zdravljenje parov z nizkim odstotkom oploditve v prejšnjih postopkih zunajtelesne oploditve s prenosom zarodkov. Bistvo postopka ICSI je, da v vsako jajčno celico mikroinjiciramo po eno semenčico in se s tem izognemo preprekam, ki jih semenčice zaradi slabe kakovosti ne bi prešle (zona peludica, membrana jajčne celice). Postopek izvedemo s stekleno pipeto s pomočjo hidravličnega mikromanipulatorja (2).



Slika 3: Shema postopka ICSI (10)

1.2.2.3 IVF-ET (In vitro fertilizacija s prenosom zarodkov)

Ena izmed najpogostejših metod za zdravljenje neplodnosti je zunajtelesna oploditev s prenosom zarodkov, ki jo na kratko imenujemo tudi ZTO. V bistvu gre za posnemanje dogajanja v jajcevodu. Indikacije za postopek so tubarni vzrok neplodnosti, endometriozna, hormonski vzroki neplodnosti, vse oblike moške neplodnosti, idiopatska neplodnost in genetski vzrok neplodnosti. Metoda ZTO obsega:

- Hormonsko spodbujanje jajčnikov

ZTO izvajamo z jajčnimi celicami, ki jih pridobimo v naravnih ali spodbujenih ciklusih. Spodbujevalce ovulacije uporabljamo zaradi razvoja več foliklov in s tem razvoja več jajčnih celic. V naravnem ciklusu v spolni zrelosti vsak mesec dozori le ena jajčna celica, ki se ob ovulaciji sprosti iz jajčnika (2, 10).

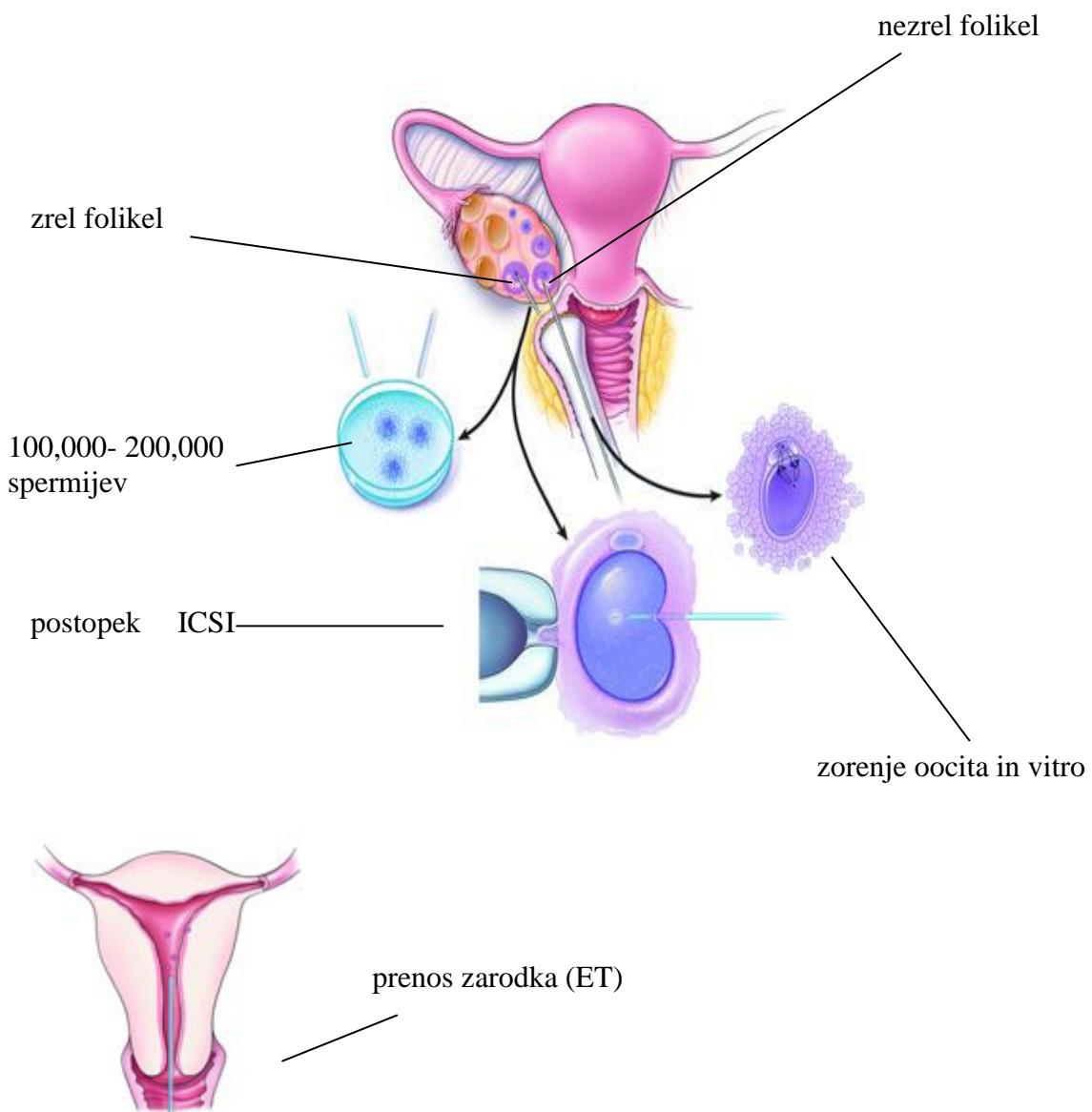
- Izsrkjanje (aspiracija) jajčnih celic

Zadnja stopnja zorenja poteka od 32 do 36 ur. V tem času izvedemo postopek ultrazvočne aspiracije (punkcije) jajčnih celic, ki poteka v lokalni anesteziji. Z iglo na ultrazvočni sondi predremo steno nožnice in izsesamo jajčne celice iz foliklov v jajčniku. V vsakem punktatu pod stereomikroskopom poiščemo jajčne celice. Te dobro speremo v gojišču, jim obrežemo kumulus in 1 ali 2 jajčni celici skupaj prenesemo v 1 mL svežega gojišča v epruveti. Gojišče vsebuje različne organske in anorganske snovi, ki omogočajo življenje jajčne celice, njen oploditev in razvoj zarodka. Pri ženski ob punkciji pridobimo povprečno 8 jajčnih celic, pri katerih je zelo pomembna kakovost. Naravno degeneriranih in nezrelih je približno 15 odstotkov pridobljenih jajčnih celic (2).

- Laboratorijski postopek zunajtelesne oploditve

Po pridobitvi jajčnih celic izvedemo laboratorijski postopek zunajtelesne oploditve. V vsako epruveto z jajčnimi celicami 2-4 ure po aspiraciji dodamo ustrezno količino predhodno pripravljenih semenčic. Semenčica se pripravi na oploditev s tremi fiziološkimi procesi: kapacitacijo, hiperaktivacijo in akrosomsko reakcijo. V procesu kapacitacije pride do sprememb v lipidni zgradbi membrane semenčic, odstrani se holesterol in pri semenčicah se pojavi tudi hiperaktivno gibanje. Pri hiperaktivaciji se spremeni gibanje, pri akrosomski reakciji pa se iz akrosomskih veziklov sprostijo encimi za razgradnjo kumulusa, da semenčica lahko prodre do jajčne celice (2).

Nato sledi inkubacija preko noči pri 37° C in v 5 % CO₂. V inkubatorju 24 ur po inseminaciji pregledamo, ali so jajčne celice oplojene. Sledi ocena oploditve jajčnih celic, ocena kakovosti zarodkov ter vnos zarodkov v maternico s pomočjo plastičnega katetra in kanile (2).



Slika 4: Prikaz različnih možnosti postopkov zunajtelesne oploditve (11)

1.2.3 Zapleti postopkov OBMP

Najpogostejši zaplet postopkov OBMP je sindrom ovarijske hiperstimulacije (ovarian hyperstimulation syndrome - OHSS). Gre za edini resen zaplet pri uporabi zdravil za spodbujanje jajčnikov in sprožitev ovulacije. Pojavlji se prevelik odziv jajčnikov na hormonsko spodbujanje. Posledično zaradi povečane kapilarne prepustnosti pride do izliva telesnih tekočin v tretji prostor, čemur sledi hipovolemija, hemokoncentracija in možnost razvoja tromboembolije. OHSS povzroča bolečine in napihljenost bolnice, stanje se odraža z nizkim tlakom in zmanjšanim centralnim venskim tlakom. Če je OHSS nezdravljen, je smrtno nevaren (2, 12).

1.3 JAJCNA CELICA V POSTOPKU OBMP

1.3.1 Fiziologija jajčnika

V jajčniku potekata dve pomembni fiziološki dejavnosti, rast in dozorevanje spolnih celic ter sinteza hormonov. Hormoni, ki nastajajo v jajčniku, so po večini ženski hormoni: estrogeni (estradiol, estron in estriol) in progesteron, poleg tega pa nastaja v jajčniku tudi manjša količina moških spolnih hormonov ali androgenov. Glavni androgen v reproduktivnem obdobju je androstendion, drugi najpomembnejši pa je testosteron (2, 13).

Na proces steroidogeneze v jajčniku vplivajo gonadotropni hormoni - folikle stimulirajoči hormon (FSH), luteinizirajoči hormon (LH) in prolaktin (PRL). Po sestavi so glikoproteini, ki se vežejo na ustrezne receptorje na površini celic. Hipotalamus z izločanjem hormona gonadoliberina ali gonadotropin sproščajočega hormona (GnRH) nadzira izločanje dveh gonadotropnih hormonov iz sprednjega režnja hipofize (FSH in LH). GnRH je dekapeptid, ki se izloča iz nevronov in se preko portalnega obtoka pretaka iz hipotalamus v hipofizo (2, 10).

Raven gonadotropnih hormonov je poleg aktivnosti hipotalamus odvisna tudi od cirkulirajočih hormonov. Glavni nevrotransmiterji, ki sodelujejo pri uravnavanju izločanja GnRH, so kateholamini (serotonin, melatonin in endogeni opiat) (2, 10, 12).

FSH spodbuja zorenje folikla, nastanek FSH in LH receptorjev, pospešuje izločanje estradiola in nastanek hormonov (steroidogeneza) v rumenem telescu in spreminja učinek lokalnih dejavnikov. LH spodbuja steroidogenezo v celicah teke in uravnava izločanje androgenov iz celic teke, ki jih celice granuloze uporabljajo za sintezo estrogenov. LH sproži ovulacijo, vzpodbuja in ohranja delovanje rumenega telesca in sodeluje pri dogajanjih lokalnih dejavnikov. PRL ima širše biološke učinke. Vpliva na laktacijo, učinkuje na reproduktivni sistem in sodeluje pri uravnavanju metaboličnih procesov (2, 10, 14, 15, 16).

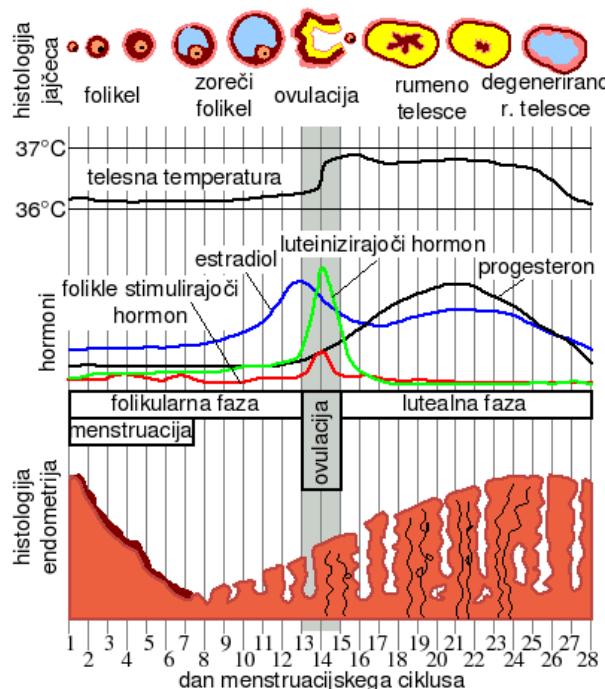
V jajčniku se tvorijo še drugi hormoni, ki lahko pospešujejo ali zmanjšujejo učinke FSH in LH. Številne raziskave so dokazale vlogo proteinov, imenovanih rastni faktorji, ki uravnavajo prenos FSH signala. Rastni faktorji imajo verjetno zelo pomembno vlogo pri izbiri vodilnega folikla. Najpomembnejši med njimi so:

- **Inzulinu podoben rastni faktor** (insulin-like growth factor-IGF): IGF-I tvorijo celice granuloze, IGF-II tvorijo celice teke in granuloze. Stimulirajo proliferacijo celic granuloze ter tvorbo progesterona in inhibina.
- **Epidermalni rastni faktor** (epidermal growth factor-EGF): inhibira aktivnost gonadotropinov, saj zavira pomnoževanje receptorjev za FSH na celicah granuloze.

- **Transformirajoči rastni faktorji** (transforming growth factors-TGF): spreminja tvorbo aktivina in inhibina.
- **Inhibin** se tvori v celicah granuloze. Inhibin B je hormon majhnih foliklov. Tvori se do 7. dne ciklusa, nato njegova koncentracija upada. Sodeluje pri determinaciji dominantnega folikla. Inhibin A doseže pomembno koncentracijo le v lutealni fazi ciklusa, ko spodbudi celice teke k tvorbi androgenov. Selektivno zavira sproščanje FSH iz hipofize.
- **Aktivin** deluje nasprotno kot inhibin. Stimulira izločanje FSH in poveča število receptorjev za GnRH.
- **Folistatin** proizvajajo celice granuloze. Zmanjšuje aktivnost aktivina (17).

1.3.2 Menstruacijski cikel

Normalna menstruacija je posledica periodičnega luščenja sekretorno spremenjene maternične sluznice in jo uravnava medsebojna povezava med hipotalamusom, hipofizo in ovarijskim. Menstruacijski ciklus se začne, ko nastopi menstruacija, to je prvi dan ciklusa. Zaradi nizke ravni estradiola in progesterona se maternična sluznica takrat odlušči in izloči. Hkrati je to tudi začetek folikularne faze. Razvoj foliklov v ciklusu se začne zaradi povečanega izločanja FSH iz hipofize, ki je odgovoren za folikularno fazo ovarijskega ciklusa. Z vrhom ravni LH in FSH se začne ovulacijska faza, kjer se 16-32 ur po začetku vrha sprosti zrelo in za oploditev sposobno jajče. V času vrha estradiol doseže najvišjo raven, nivo progesterona pa medtem začne naraščati. Med lutealno fazo se raven LH in FSH zmanjša, saj se zaradi povišanega nivoja progesterona v krvi v medsebojnem delovanju pojavi zaviralni učinek na hipotalamus in hipofizo, tako da izločanje LH začne upadati. Progesteron skupaj z estradiolom v lutealni fazi povzroča zadebelitev endometrija. Zaradi nizkega nivoja LH rumeno telesce kasneje začne propadati. Količina progesterona in estrogenov upade in začne se menstruacija. Znižanje koncentracije obeh hormonov pa je ponoven dražljaj za povečano izločanje FSH in posledično ponovno rast foliklov (2, 10, 18).

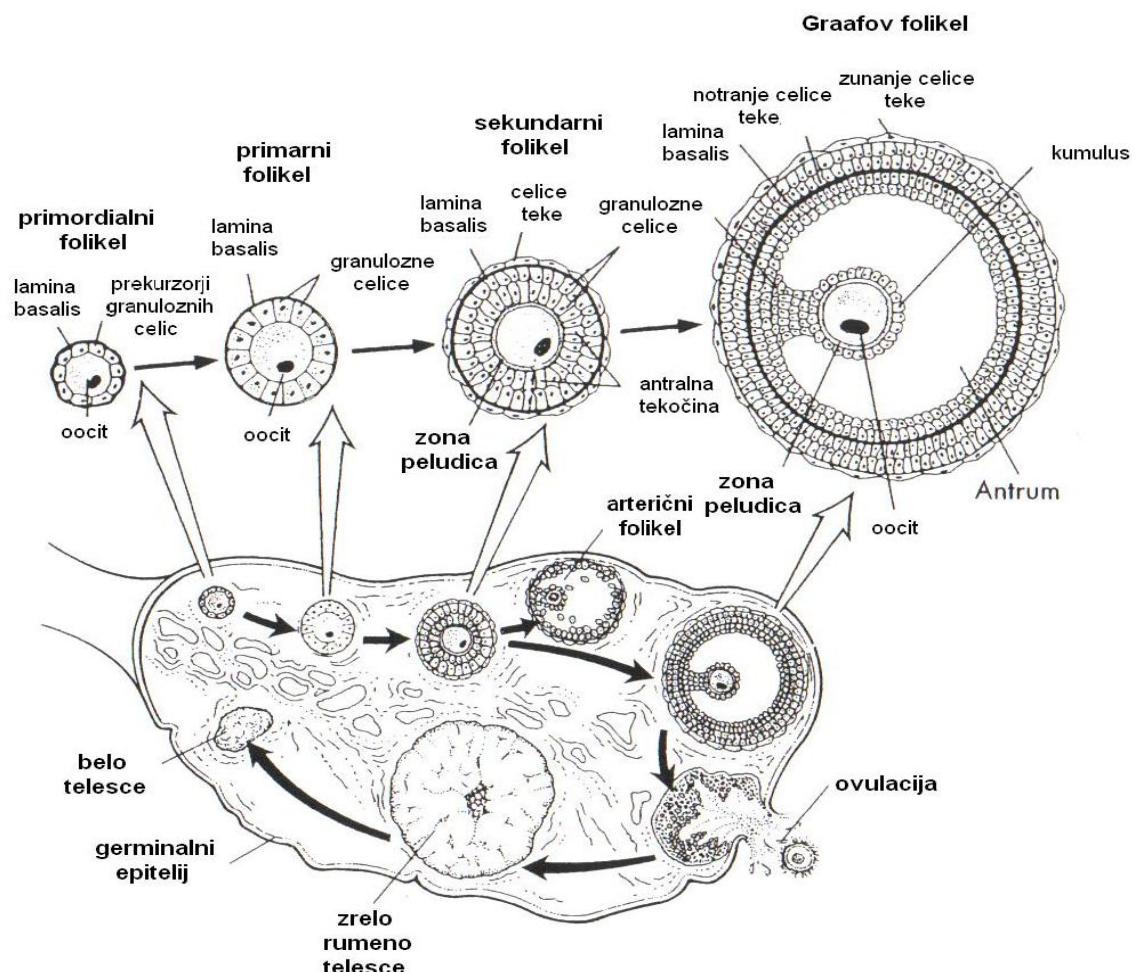


Slika 5: Menstruacijski cikel (19)

1.3.3 Jajčni folikel

Primarnih jajčnih celic ali primordialnih foliklov je okoli 5 milijonov in se razvijejo v prenatalnem obdobju. Primordialni folikli imajo po eno jajčno celico, ki jo obdaja plast ploščatih epitelijskih celic. Po rojstvu deklice število teh foliklov pada, po 37. letu je v jajčniku še približno 25000 foliklov. Dozoritev in ovulacijo dočaka približno 400 jajčnih celic, ostali tako imenovani artretični folikli, počasi propadejo, degenerirajo in izginejo. Folikel lahko zapade v atrezijo v kateremkoli stanju (2, 13, 14).

V reproduktivnem obdobju primordialni folikli postopoma zapuščajo mesto nastanka in se razvijejo naprej. Ti so v različnih razvojnih stopnjah (primarni, sekundarni in tercarni folikli). Z rastjo foliklov rastejo tudi jajčne celice. Enoslojna ovojnica foliklovih celic se množi in nastane večslojna plast zrnatih celic (granulozne celice). Rastoči folikli potrebujetejo gonadotropine, da dosežejo velikost za ovulacijo. Pri sekundarnem foliklu je epitelij s kuboidnimi celicami večplasten, pride do pojava foliklove tekočine med celicami epitelija. Foliklova tekočina vsebuje beljakovine, hormone, citokine, metabolite in toksine, ki nastajajo v celicah granuloze ali pridejo z difuzijo iz krvne plazme. Nekatere od teh snovi vplivajo na metabolizem folikla in so med drugim pomembne tudi za rast in dozorevanje jajčne celice. Poleg tega je vloga folikularne tekočine tudi v olajšanju transporta jajčne celice skozi folikel med ovulacijo (2, 10, 13).



Slika 6: Shema strukture jajčnika in različnih stadijev v razvoju foliklov (14)

Zrel jajčni folikel ima obliko mehurja, ki je vidna tudi s prostim očesom, in zavzema velik del jajčnika. Pomika se proti površini jajčnika ter boči njegovo površino navzven. To je terciarni, predovulatorni folikel ali Graafov folikel. V foliklu nastaja povečana količina androgenov in estrogenov (2, 10, 13).

FSH je edina snov, ki sproži razvojni proces ustvarjanja vodilnega folikla. Nobena druga snov ne more nadomestiti FSH, in vsak dejavnik, ki ovira prenos signala FSH-receptora, ga zavre ali pa samo spremeni ta proces, vodi v atrezijo folikla. Če snov okrepi prenos signala FSH, s tem pospeši proces in pride do ovulacije (14).

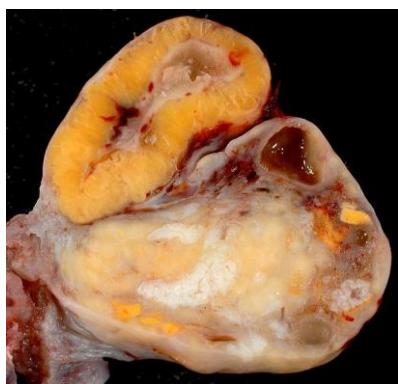
1.3.4 Jajčna celica

1.3.4.1 Zgradba jajče celice

Jajčno celico obdaja plazmalema ali oolema, okrog nje pa je zona peludica. To je fino progasta membrana, ki ščiti jajčno celico med prehodom skozi genitalni trakt in omogoča

vezavo semenčic med procesom oploditve (2). Ni še znano, ali jo izločajo foliklove celice ali tudi sam oocit. Sestavljajo jo predvsem pozitivni glikoproteini (13).

Med plazmalemo in zono peludico je perivitelinski prostor napolnjen s tekočino, ki vsebuje hranilne snovi, podobne jajčnemu rumenjaku. Vezivna stroma okoli folikularnega epitelija se v času razvoja preoblikuje in tvori žlezne celice (notranje celice teke), ki izločajo estrogene. Zunaj jo obdaja vezivno tkivo in gladke mišice (zunanje celice teke). Meja med tekalnima plastema ni jasno vidna, notranjo plast teka celic in granulozno plast pa ločuje tanka membrana (lamina basalis) (2, 13). V citoplazmi ali ooplazmi so glavni celični organeli (mitohondriji, Golgijev aparat in endoplazemski retikulum). Okoli ooleme so tudi druge plasti celic, ki se imenujejo cumulus oophorus (kumulus). Celice okrog oocita so žarkasto razporejene, zato notranjo plast celic kumulusa imenujemo corona radiata (korona). Celice kumulusa se s svojo mukozno površino držijo jajčne celice in tvorijo kompleks jajčna celica-korona-kumulus. Ta sloj celic običajno intenzivno raste in se radialno širi med dozorevanjem jajčne celice kot odziv na hormon HCG, dodan v postopku zunajtelesne oploditve, ali vrh hormona LH v naravnem ciklusu. Do ovulacije pride, ko folikel poči, iz njega izpade oocit, likvor pa se izlije. Oocit prestrežejo jajcevodove fimbrije. Celice več skladnega folikularnega epitelija in notranje teke tvorijo rumeno telesce (corpus luteum). Rumeno telesce je žleza z notranjim izločanjem, ki vsebuje rumeno barvilo lutein ter izloča progesteron in estrogene hormone, predvsem estradiol. V primeru oploditve se pod vplivom gonadotropinov rumeno telesce poveča in izloča več mesecev, dokler te vloge ne prevzame placenta. V nasprotnem primeru se rumeno telesce zaradi upadanja hormonov spremeni v brazgotinasto tvorbo ali belo telesce (corpus albicans) (2).



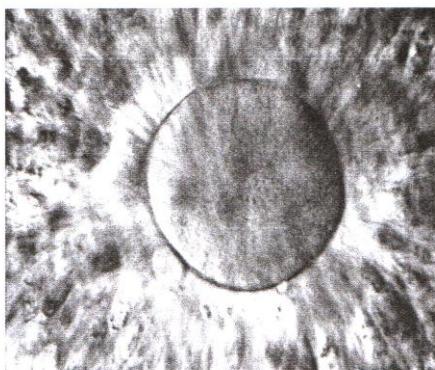
Slika 7: Zrelo rumeno telesce (20)

1.3.4.2 Zrelost jajčnih celic

Ob aspiraciji so jajčne celice v različnih razvojnih stopnjah. Zrelost ocenjujemo na podlagi videza celic korone radiate, kumulusa in celic granuloze. Celice granuloze so še posebej v pomoč pri oceni zrelosti jajčne celice, saj so pri zrelih jajčnih celicah običajno velike in dobro razpršene, pri nezrelih pa so majhne in zbite skupaj. Vseeno pa natančna povezava med celicami granuloze in stopnjo zrelosti jajčnih celic ni znana (2).

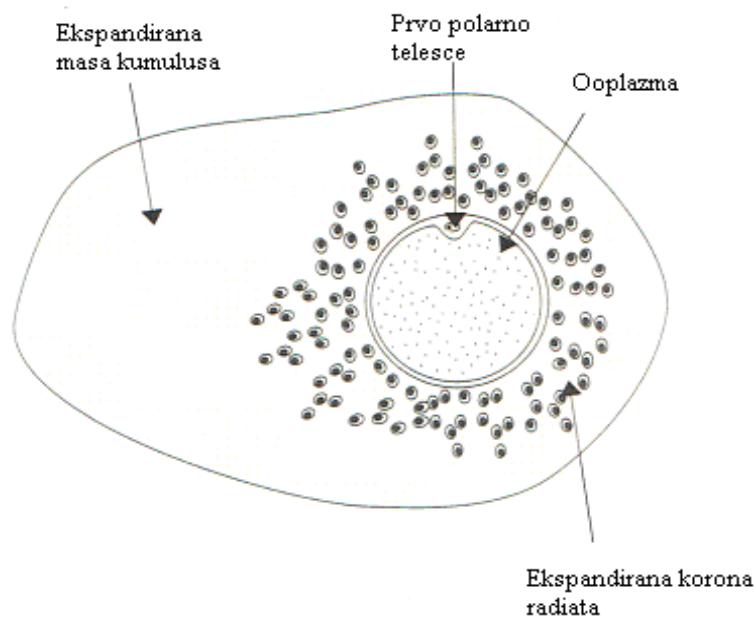
Ločimo različne razvojne stopnje:

- Metafaza II: so zrele jajčne celice, ki so sposobne takojšnje oploditve. Izločeno imajo prvo polarno telesce, obdane so s celicami kumulusa, ki je povečan in svetel. Korona radiata je žarkasto razporejena.
- Metafaza I: skoraj zrele jajčne celice, jedro je že razpadlo, nimajo izločenega prvega polarnega telesca. Morfološko so pravilne okrogle oblike, njihova citoplazma je svetla zrnata.
- Profaza I: nezrele jajčne celice z vidnim jedrom (germinalnim veziklom) in tudi jedrcem. So nepravilne oblike, imajo temnejši center in zrnato citoplazmo. Celice korone in kumulusa so kompaktne (2).



Slika 8: Zrela jajčna celica, ki je obdana s celicami granuloze (2)

Možno je, da so v punktatu folikularne tekočine tudi prezrele jajčne celice, ki imajo nepoškodovano polarno telesce, celic kumulusa pa skoraj nimajo več. Včasih pride do težjega razločevanja med zrelimi in prezrelimi jajčnimi celicami. Čas oploditve je močno povezan s kakovostjo ozioroma razvojno stopnjo jajčne celice (10).



Slika 9: Shema jajčne celice, pridobljene za postopek zunajtelesne oploditve (2)

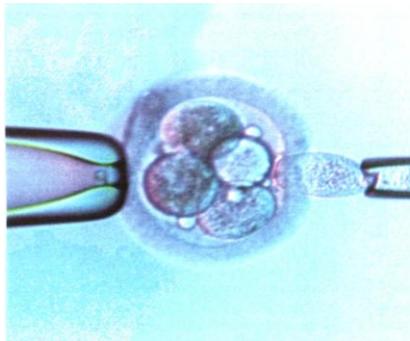
1.3.5 Oploditev

Oploditev je proces združevanja dveh visoko specializiranih celic, jajčeca in semenčice v zigoto. Številni spermiji lahko predrejo zono peludico, vendar navadno le eden vstopi v jajčno celico in jo oplodi. Stik semenčice z zono peludico povzroči pri semenčici akrosomsko reakcijo, pri čemer akrosomski vezikel sprosti encime za razgradnjo zone peludice, da semenčica lažje prodre do membrane jajčne celice. Glava semenčice se pritrdi na membrano jajčne celice, v celico pa vstopi v procesu, ki je podoben fagocitozi (13).

Oploditev fiziološko poteka v jajcevodu, kamor ovarij iztisne oocit. Zarodek nato pet dni potuje po jajcevodu in se implantira v sluznico maternice. Za oploditev v pogojih in vitro je dovolj, da je jajčna celica izpostavljena semenčicam 1 uro (13).

1.3.6 Ocena kakovosti zarodkov in oploditve

Kakovost zarodkov ocenjujemo na osnovi morfologije zarodkov. Ocenjujemo obliko celic (blastomer). Pogledamo tudi delež fragmentacije, saj prevelika fragmentacija ni zaželena, ker fragmenti zmanjšujejo možnost ugnezditve zarodka v maternici (2).

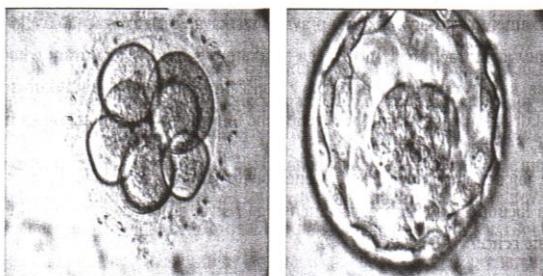


Slika 10: Aspiracija blastomere iz zarodka (10)

Ocenjevanje zarodkov na Ginekološki kliniki v Ljubljani poteka po Boltonu:

- Kakovost 1: zelo slaba kakovost zarodka, blastomere so slabo vidne, obilna fragmentacija
- Kakovost 2: slaba kakovost zarodka, blastomere so nepravilno oblikovane, prisotno je več fragmentacije
- Kakovost 3: povečana kakovost zarodka, blastomere so pravilno oblikovane, nekaj fragmentacije je prisotno
- Kakovost 4: zelo dobra kakovost zarodka, blastomere so pravilno oblikovane, fragmentacije ni (2).

Zarodke se shranjuje v inkubatorju, še isti dan pa izvedemo prenos zarodkov (ET).



Slika 11: Zarodek tri dni in zarodek (blastocista) pet dni po oploditvi (10)

1.4 NARAVNI IN SPODBUJEN POSTOPEK ZTO

Med pomembnejše dejavnike, ki vplivajo na uspešen izid postopkov ZTO, prištevamo spodbujanje ovulacije. Prva nosečnost s pomočjo ZTO je bila uspešna v naravnem postopku, ki pa so ga kasneje opustili. Zaradi takratnih laboratorijskih pogojev je bilo zapleteno napovedovati čas ovulacije, zato so bili poskusi ZTO v naravnem ciklusu mnogokrat neuspešni. V ospredje je prišla stimulacija ovulacije. Na tem področju je biološka znanost v zadnjih 30 letih doživel velik razvoj, kljub temu pa se je zaradi različnih razlogov v zadnjih

letih povrnilo zanimanje za oživitev naravnega postopka in zmernega spodbujanja v postopkih ZTO (21, 22).

Prav zaradi ponovne aktualnosti teh postopkov je skupina strokovnjakov iz International Society for Miled Aproaches in Assisted Reproduction (ISMAAR) sprejela novo terminologijo, ki je poenotila različne izraze (23).

Preglednica I: Terminologija postopkov ZTO

PRIPOROČLJIVA TERMINOLOGIJA	ZAMENJANA TERMINOLOGIJA
Naravni postopek ZTO	Nespodbujen, spontan postopek ZTO
Modificiran naravni postopek ZTO	Polovično naraven, kontrolirano naraven postopek ZTO
Zmerna oblika ZTO	Mehko, minimalno spodbujanje, prijazna ZTO
Konvencionalna oblika ZTO	Standardna, rutinska ZTO, kontrolirano spodbujanje jajčnikov ZTO

1.4.1 Naravni postopek ZTO

Naravni postopek ZTO je postopek, kjer sledimo izključno naravnemu menstruacijskemu ciklusu s pomočjo ultrazvoka, serumske koncentracije estradiola in urinskega LH (23). Primeren je za mlajše paciente z rednimi ciklusi in dobro kvaliteto semena.

Rast vodilnega folikla mora biti nadzorovana, aspiracijo pa izvedemo, ko je folikel dovolj velik in zrel (13). Cilj naravnega postopka je pridobitev ene same jajčne celice brez uporabe dodatnih zdravil. Pogosto zaradi teh zahtev ne dosegamo primerne stopnje nosečnosti, zato se postopek uporablja bolj poredko (2, 23). Rezultati 1000 naravnih IVF/ICSI ciklusov, opravljenih na Oddelku za reproduktivno ginekologijo in ginekološko endokrinologijo UKC Maribor, kažejo, da je bil delež porodov na ciklus paciente, mlajše od 36 let, 9 odstotkov, delež porodov pri starejših od 36 let pa 4 odstotke (24).

Po drugi strani pa ima naravni postopek številne prednosti: nižja cena, praktično nobene možnosti za mnogoplodno nosečnost, manjša telesna obremenitev, manjša bolečina pri odvzemu jajčne celice, enostavnejši postopek in varnost glede morebitnih zapletov (21).

Študija opravljena na Ginekološki kliniki v Ljubljani je pokazala, da je uspešnost ZTO v naravnem ciklusu pri ženskah, ki se zdravijo zaradi ženske neplodnosti in so mlajše od 36 let ter so imele manj kot 10 predhodnih postopkov ZTO s prenosom blastociste, enakovredna

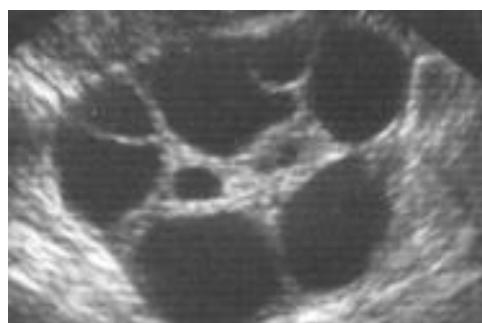
uspešnosti postopka ZTO v spodbujenem ciklusu (21).

1.4.1.1 Modificiran naravni postopek ZTO

Poznamo tudi modificiran naravni postopek ZTO. Gre za najpogosteje uporabljeno metodo naravnega postopka. Uporabljam ga pri ženskah, ki ne želijo vnašati hormonov, da bi pridobile večje število jajčnih celic, in pri ženskah, ki se slabo odzivajo na spodbujanje z gonadotropini. Postopek ponovno izvajamo med naravnim menstruacijskim ciklusom, nadzorujemo pa ga z ultrazvočnimi preiskavami in serumskimi koncentracijami estradiola ter LH. Ko zaznamo najugodnejše koncentracije estradiola in LH ter so izvidi UZ preiskave optimalni, dnevno vnašamo antagoniste gonadoliberinov vse do vnosa HCG, ki izzove popolno dozoritev jajčne celice (13, 23). Hkrati z antagonisti gonadoliberinov lahko vnašamo tudi gonadotropine v nizkih odmerkih (do 150 IE na dan) kot podporno zdravljenje zaradi padca FSH in za vzdrževanje folikla. Potrebna je tudi lutealna podpora s HCG in progesteronom. V primeru, da ne uporabimo antagonistov gonadoliberinov, se tudi tukaj uspešnost postopka zmanjša, saj prav z antagonisti gonadoliberinov odpravimo najpogostejši problem, to je nastanek spontanega vrha LH, kar ima za posledico prekinitve številnih postopkov (23).

1.4.2 Spodbujen postopek ZTO

Ovulacija je dogodek v menstruacijskem ciklusu, ki je natančno opredeljen z velikostjo jajčnega folikla ter s količinsko in časovno natančno opredeljenimi koncentracijami hormonov. Večje število jajčnih celic, ki jih dobimo v spodbujenih postopkih ZTO, potrebujemo, ker je lahko od več pridobljenih celic le ena takšna, ki ima možnosti za nadaljnji razvoj.



Slika 12: Ultrazvok jajčnih foliklov, pridobljenih v spodbujenem postopku ZTO (25)

1.4.2.1 Pregled uporabe protokolov spodbujanja ovulacije na Ginekološki kliniki v Ljubljani

Na Ginekološki kliniki v Ljubljani so za spodbujanje ovulacije najprej uporabljali kombinacijo humanega menopavznega gonadotropina (HMG) in humanega horionskega gonadotropina (HCG). Kasneje so v protokole uvedli tudi analoge GnRH, da bi dosegli boljšo kvaliteto celic z blokado prezgodnje luteinizacije foliklov zaradi vplivov endogenega LH. Analogom GnRH in gonadotropinom so pri ženskah z zelo slabo odzivnostjo jajčnikov dodajali še rastni hormon (GH). Dosegli so 23 % stopnjo nosečnosti na ciklus (21).

Napredek v stopnji nosečnosti v spodbujenem postopku ZTO je povzročila uporaba rekombinantnega FSH (rFSH) ter kombinacije rFSH z antagonistimi GnRH. Antagonisti GnRH za razliko od agonistov učinkujejo takoj (brez predhodnega spodbujanja proizvodnje FSH in LH), zato se uporablajo v enkratnem odmerku (ali 4-5 manjših odmerkikh), kar bistveno skrajša čas spodbujanja ovulacije. Stopnja nosečnosti na ciklus je tako bila 24 % pri uporabi rFSH in 25 % pri uporabi kombinacije z antagonistimi. Sodobni, izboljšani ter posledično tudi dražji pripravki za spodbujanje ovulacije so v nekaj letih bistveno nadgradili rezultate dela, zabeležili so kar 35% stopnjo nosečnosti na ciklus. Napredek v protokolih spodbujanja ovulacije je povezan prav z razvojem različnih pripravkov s pomočjo rekombinantne tehnologije. Dodati je treba tudi to, da na izbor protokola za spodbujanje ovulacije in vrsto zdravila vplivajo številni dejavniki: starost ženske, vzrok neplodnosti, telesna teža (koncentracija FSH in LH), tip menstruacijskega ciklusa, ultrazvočni izvid jajčnikov ter spremiogram partnerja (21, 23, 26).

1.4.2.2 Zmerna oblika zunajtelesne oploditve

Gre za metodo, kjer gonadotropine vnašamo v nizkih odmerkikh in/ali v krajsih postopkih, kjer istočasno uporabljammo antagoniste GnRH, ali ko uporabljammo oralne učinkovine (anti-estrogene, aromatazne inhibitorje) same ali v kombinaciji z gonadotropini. Za zorenje jajčnih celic tukaj uporabljammo HCG, za lutealno podporo pa HCG ali progesteron. Pri tem postopku pridobimo od 2-7 jajčnih celic (23).

1.4.2.3 Konvencionalna zunajtelesna oploditev

Po stari terminologiji gre za kontrolirano spodbujanje jajčnikov v postopku zunajtelesne oploditve. V uporabi je najpogosteje protokol spodbujanja s kombinacijo agonistov gonadoliberinov in visokih odmerkov gonadotropinov (150-450 IU na dan). Celotni odmerek gonadotropinov na postopek je višji, prav tako trajanje spodbujanja v primerjavi z zmernim spodbujanjem (23).

V prvi fazi postopka se v jajčniku izzove rast večjega števila jajčnih celic. Pacientka v tej fazi prejema hormonske injekcije humani menopavzni gonadotropin (HMG), analoge hormona GnRH ali rastni hormon (GH). Njihov učinek je treba nadzorovati z določanjem estradiola v krvi in z ugotavljanjem števila in velikosti jajčnih foliklov. Merilo za zrelost foliklov je zadostna koncentracija estradiola v krvi. Slednja je poleg velikosti jajčnih foliklov (premer vsaj 15 mm) kazalnik skorajšnje zrelosti jajčne celice. Popolno dozoritev jajčne celice pa dosežemo z vnašanjem hormonskih injekcij (HCG). To omogoča razvoj večjega števila jajčnih celic in hkrati možnost, da se jajčne celice oplodijo, pravilno delijo in razvijajo (2, 23). Takšni protokoli spodbujanja jajčnikov imajo številne slabosti, saj so dragi, dolgo trajajoči in obremenjujoči za patientke. Poleg ponavljanja zdravil so potrebni pogosti obiski zaradi nadzora samega postopka. Največja slabost klasičnih protokolov je večja možnost, da se razvije sindrom OHSS, velik problem pa je tudi shranjevanje nadštevilnih zarodkov, ki se jim pari odrečeo in jih ne želijo uporabiti (23, 24, 26).

Zaradi vseh teh razlogov se bo v prihodnosti zagotovo zgodil še večji premik k zmerni obliki ZTO ter k modificiranim naravnim postopkom ZTO. Pomisleki skeptikov temeljijo na bojazni, da bi se znižala stopnja nosečnosti, vendar je po drugi strani danes mnogo več znanja na področju spodbujanja jajčnikov in na področju laboratorijskih tehnik (21, 23, 27).

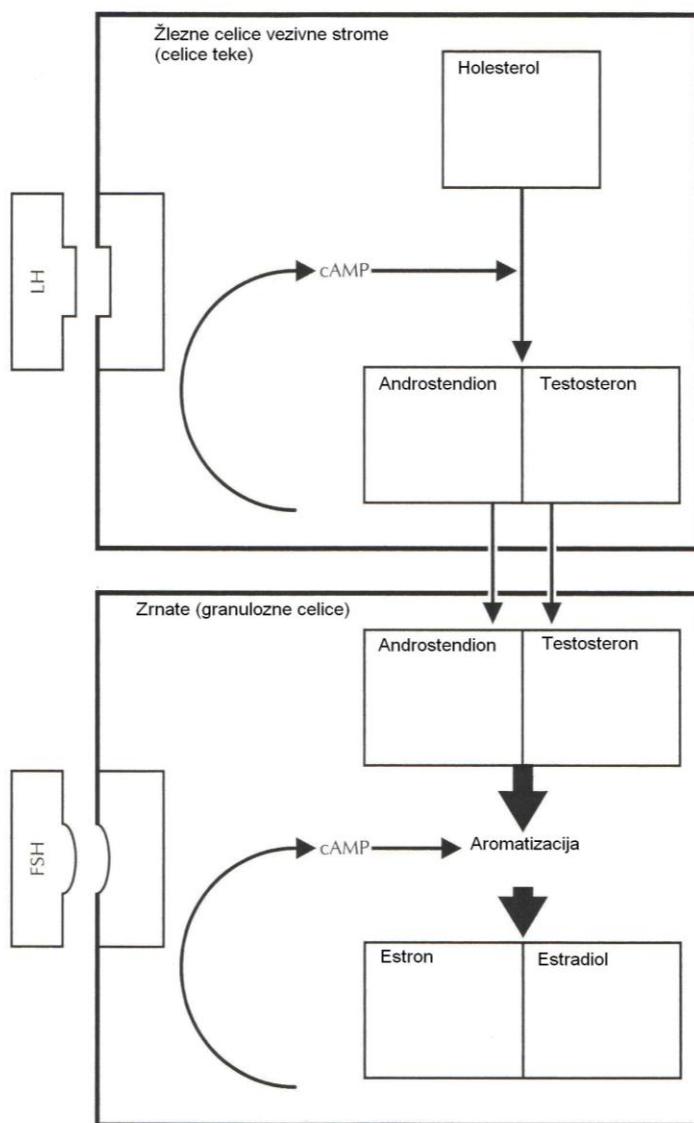
1.5 SPOLNI HORMONI

Z reprodukcijo so posredno ali neposredno povezani spolni hormoni, ki jih tvorijo ženske in moške spolne žleze, skorja nadledvičnice in posteljica. Glavne skupine spolnih hormonov so tri: gestageni, estrogeni in androgeni. Spolni hormoni so po zgradbi lipofilni steroidi. Po krvi se prenašajo vezani na vezalne beljakovine za spolne hormone, na albumine ali pa so prosti. Vezalne beljakovine olajšajo prenos spolnih hormonov, v ciljno celico pa lahko vstopajo le nevezani, prosto plavajoči hormoni. Poglavitni dejavnik, ki določa raven prosto krožečih spolnih hormonov, je serumska koncentracija vezalnih beljakovin. Stopnja vezave na vezalne beljakovine pa določa biološko razpoložljivost spolnih hormonov (12).

Prekurzor sinteze steroidnih hormonov je holesterol. Poznamo tako imenovan dvocelični sistem steroidogeneze, saj androgena hormona (androstendion in testosteron) vstopita v kapilarni krvni obtok v zunanjem sloju vezivne ovojnici, ki obdaja folikle, nato pa prestopita bazalno membrano in se v zrnatih celicah spremenita v estradiol. Androgeni nastajajo v stromi jajčnika in v teka celicah foliklov pod vplivom LH-ja. V folikularni fazi ciklusa se androgeni v granuloznih celicah spreminjačjo pod vplivom encima aromataze v estrogene. To pretvorbo pospešuje FSH, ki aktivira aromatazo (10, 14).

1.5.1 Mehанизem delovanja spolnih hormonov

Po vstopu v celico se nevezani spolni hormon veže na steroidni receptor, ki je v celičnem jedru. Progesteronski in estrogeni receptorji spadajo v naddružino jedrnih receptorjev, sem pa uvrščamo tudi receptorje tiroidnih hormonov, androgenov, steroidov nadledvične žleze, retinojske kisline in 25-dihidroksi vitamina D. Predstavniki te naddružine imajo podobno zgradbo (28, 29). Steroidni receptor spada v skupino od liganda odvisnih transkripcijskih dejavnikov, od katerih je odvisen biološki učinek spolnih hormonov. Kompleks hormon-receptor se veže na specifično regijo DNK, ki je blizu promotorja ciljnega gena, in stimulira ali povzroči transkripcijo DNK v m-RNK, ki se nato v citoplazmi prevede v beljakovino. Preko teh novih proteinov, ki delujejo avtokrino, parakrino in endokrino, se izraža biološki učinek spolnih hormonov (14).



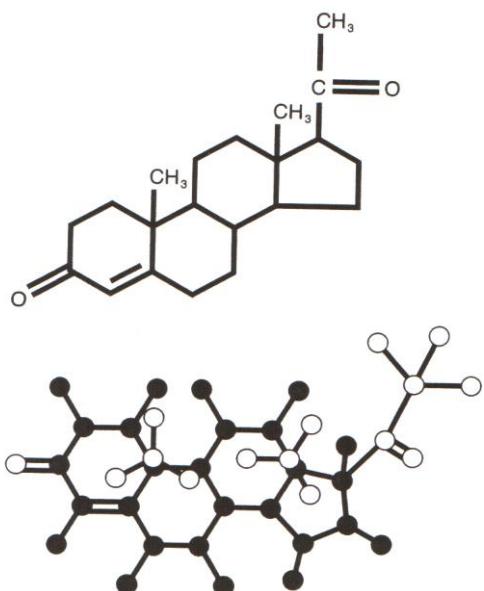
Slika 13: Shema dvočeličnega sistema steroidogeneze (14)

1.5.2 Progesteron

Progesteron (gestagen) je C-21 steroidni hormon. Sestavljen je iz štirih medsebojno povezanih cikličnih ogljikovodikov. Osnovna struktura vsebuje 6 centrov asimetrije, možnih je 64 izomerov molekule (28).

Človeški progesteronski receptorji (PR) obstajajo v več oblikah. Najbolj znani sta obliki PRA in PRB. Razlika je v 164 aminokislinah, obe pa sta produkt istega gena. PRB deluje kot transkripcijski aktivator genov, ki imajo zaporedje za vezavo progesteronskih receptorjev, PRA pa deluje enako ali pa nasprotuje delovanju PRB (28, 29).

Progesteron proizvajajo celice granuloze rumenega telesca, tvorijo ga tudi možgani, periferni živci in v času nosečnosti tudi posteljica (10). LH vpliva na pospešeno tvorbo rumenega telesca, po ovulaciji pa raven hormonov FSH in LH v krvi naglo pade. Razlog je v vplivu progesterona in estradiola na hipofizo z negativno povratno zvezo. V folikluarni fazi največ progesterona izhaja iz periferne konverzacije pregnenolona in pregnenolonsulfata, ki ju izloča nadledvičnica (15).

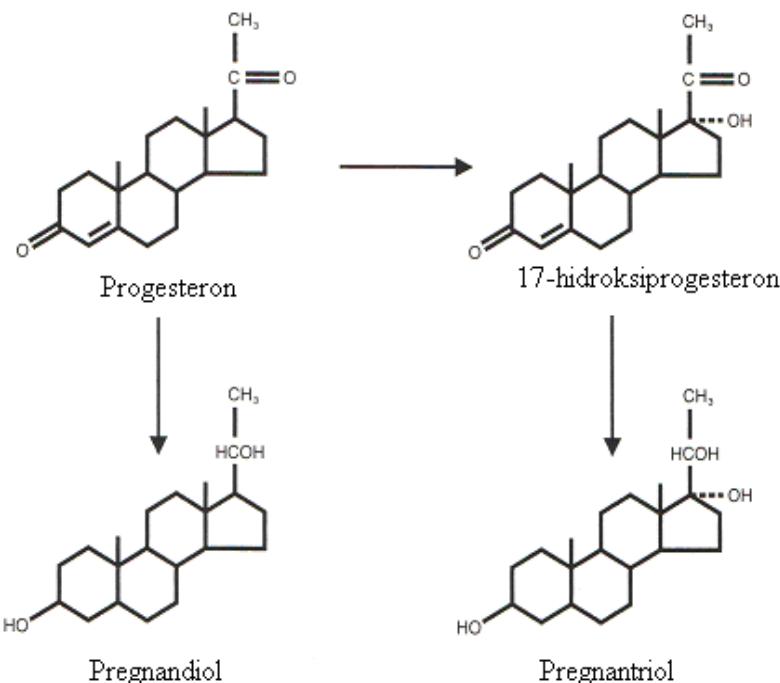


Slika 14: Progesteron (14)

1.5.2.1 Sinteza progesterona

V procesu sinteze se iz holesterola najprej sintetizira pregnenolon, iz njega pa s pomočjo encima 3β -hidroksisteroid dehidrogenaza hormon progesteron (28). Pretvorba gre naprej preko encima P450c17, kjer nastane 17-hidroksiprogesteron, ta pa se naprej s pomočjo istega encima pretvori v androstendion. Iz androstendiona nastane testosteron (encim 17β -hidroksisteroid dehidrogenaza) ali estron (encim P450 aromataza), iz testosterona pa lahko nastane še estradiol (encim P450 aromataza).

Skoraj ves progesteron se v jetrih razgradi v druge steroide, ki nimajo progesteronskega učinka. Glavni končni produkt razgradnje progesterona je pregnandiol.



Slika 15: Metabolizem progesterona (14)

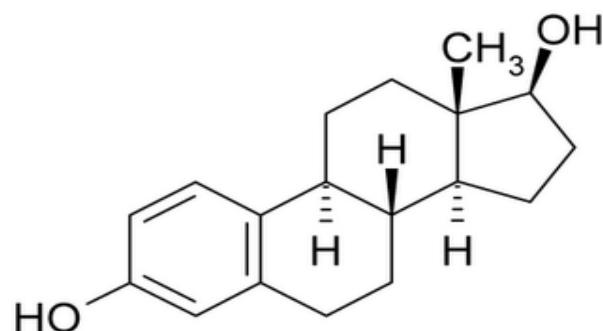
1.5.2.2 Učinki progesterona

Gestageni delujejo antiestrogeno, ker zmanjšajo število estrogenskih receptorjev, zavirajo mitotično aktivnost celic ter pospešijo presnovo estrogenov v manj aktivne oblike. Estrogeni po drugi strani zvišajo sintezo gestagenskih receptorjev ter na ta način okrepijo biološki učinek gestagenov, ki po negativni povratni zanki zavrejo estrogenske receptorje (14). Najpomembnejši vpliv progesterona je vpliv na sekrecijske spremembe v endometriju. Omogoči preobrazbo sluznice maternice v izločevalno stopnjo, zato njegovo vrednost ocenujemo okoli dvaindvajsetega dne menstrualnega ciklusa. Količino hormona določamo v krvi. Določanje progesterona v krvi (serumu) včasih izvedemo tudi takoj po ovulaciji. Za to se odločimo na podlagi neprimerno kratke lutealne faze ciklusa. Pri slednji je možnost za implantacijo zarodka slaba, zato podpiramo delovanje rumenega telesca z dajanjem progesterona ali progestagenov ali pa spodbujamo njegovo izločanje z dajanjem HCG-ja (10). Pod vplivom progesterona se endometrij zadebeli, postane prekravavljen in pripravljen za sprejem oplojenega jajčeca. Hormon vpliva tudi na razvoj režnjičev in alveolov dojke, ki so nujen pogoj za povečanje dojk. V zelo veliki količini progesteron lahko povečuje reabsorbcojo

natrija, klora in vode iz distalnih tubulov v ledvicah. Vzrok je v kompeticiji med progesteronom in aldosteronom, saj je progesteron predhodnik mineralkortikoida aldosterona.

1.5.3 Estradiol

Estradiol je spolni hormon, ki sledi rasti in razvoju jajčne celice v jajčnem foliku. Raven estradiola določamo v krvi (serumu), poznati pa moramo dan menstrualnega ciklusa, ko je bil vzorec odvzet, saj vrednosti hormona rastejo z bližanjem dnevu ovulacije (10). Pri zdravi ne noseči ženski se dnevno izloči 100-300 mg estradiola. V reproduktivnem obdobju ženske jajčnik izloča večino estrogenov, ki jih najdemo v krvnem obtoku. Preostali del estrogenov pa nastane v perifernem tkivu. Celice granuloze v jajčniku izločajo estrogen, ki je v večini v obliki 17β -estradiola, manj pomembna količina estradiola (5%) pa nastane tudi s periferno konverzacijo estrona, testosterona in androstendiona. Med estrogenskimi receptorji (ER) sta znana dva receptorja: ER α in ER β ter njune variante. ER α deluje proliferativno, ER β pa nasprotuje delovanju ER α (28).



Slika 16: Estradiol (14)

1.5.3.1 Sinteza estrogenov

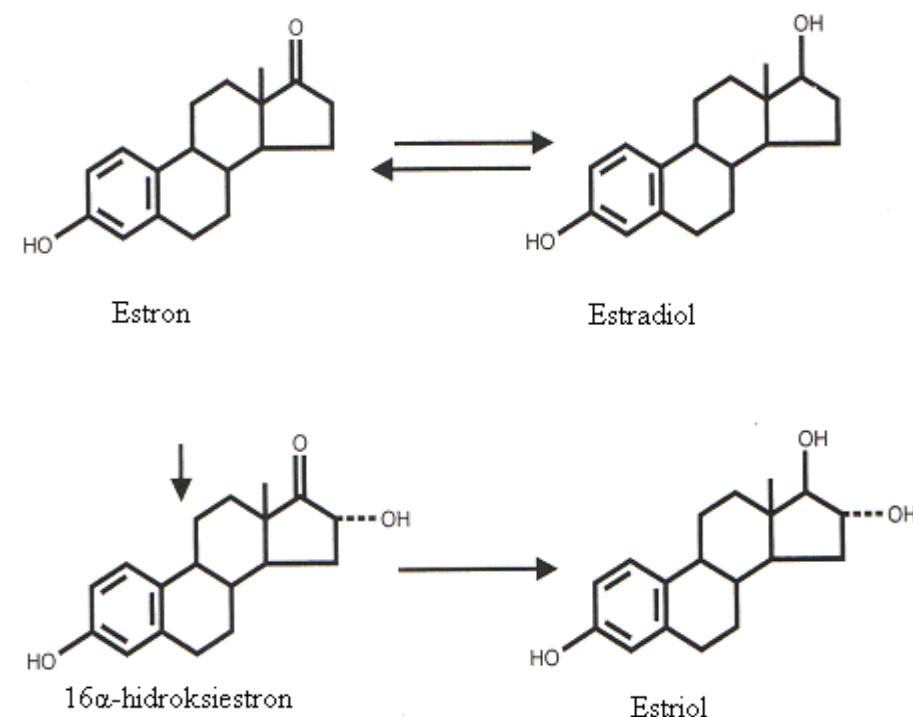
Prekurzorji estrogenov so androgeni. 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17β -HSD) omogočajo pretvorbo androstendiona v testosteron, ki pa ni glavni sekretorni produkt normalno delujočega jajčnika. Glavni estrogen, ki ga izloča jajčnik, je estradiol. Ta nastane iz testosterona, ki se demetilizira na mestu 19 in se hkrati aromatizira s pomočjo encima aromataza. Druga pot nastanka estradiola je preko androstendiona in estrona, kjer sta enako vključeni aromataza in 17β -HSD (10, 13, 14). Encimi 17β -HSD uravnavajo zasedenost receptorjev, tako da delujejo stereospecifično na mestu 17 steroidnega skeleta. Keto skupine reducirajo v hidroksi skupine in obratno (29).

Prisotna je tudi pretvorba steroidov v perifernih tkivih. Prosti androgeni se npr. v koži in celicah adipoznega tkiva pretvorijo v proste estrogene. Lokacija maščobnih celic vpliva na

njihovo aktivnost. Znano je, da ženske z večjo količino maščob na področju abdomna proizvajajo več androgenov. Pri moških je skoraj vsa količina cirkulirajočih estrogenov posledica periferne pretvorbe androgenov (13, 29).

1.5.3.2 Metabolizem estrogenov

Estron ima šibko afiniteto do estrogenskih receptorjev, zato se mora pretvoriti v estradiol, ki je aktivna oblika hormona. S presnovo estradiola in estrona nastane estriol, ki je biološko najmanj učinkovit estrogen in ni sekretorni produkt jajčnika (13, 28).



Slika 17: Metabolizem estrogenov (14)

V plazmi je večja količina estradiola vezana na albumin. Jetrni metabolizem vključuje konjugacijo estradiola ter tvorbo sulfatov in glukuronidov, ki se v večjem delu izločajo preko ledvic z urinom (15).

1.5.3.3 Učinki estrogenov

Estrogeni spodbudijo razvoj ženskih spolnih organov in drugih spolnih znakov ter so sestavni del fiziologije pubertete, menstruacije, ovulacijskih ciklusov in nosečnosti. Vzdržujejo urogenitalno funkcijo in vazomotorično stabilnost (13). Estrogeni vplivajo na dozorevanje jajčec, na pripravo reprodukcijskega sistema za sprejem semenčic in vgnezditve oplojenega jajčeca. Delujejo na mukozni sloj jajcevoda, povzročijo rast tkiva žlez in povečanje števila

epitelnih celic s fibrilami, ki obdajajo jajcevode. Povečajo aktivnost fibril, ki usmerjajo oplojena jajčeca v maternico (13, 15).

Estrogeni povečujejo osteoblastično aktivnost, zato po menopavzi, ko jajčniki ne izločajo skoraj nič estrogena, pride do zmanjšanja kostnega matriksa in zmanjšanje nalaganja kalcija in fosforja v kosteh. Vplivajo tudi na manjši porast beljakovin v telesu, na povečanje intenzitete metabolizma, imajo pa le 1/3 učinka testosterona.

Estrogeni so vzrok nalaganja maščob v velikih količinah v podkožnem tkivu, v dojkah ter mestih, značilnih za ženski spol. Povzročajo zadrževanje soli in vode, imajo manjši vpliv na rast dlak. Zaradi ugodnega vpliva na razmerje HDL, LDL in trigliceride, estrogeni do menopavze ščitijo ženski organizem pred razvojem kardiovaskularnih obolenj in ateroskleroze (13, 15).

Previsoka raven estrogena ob hkratnem pomanjkanju progesterona lahko privede do prevelike stimulacije celic in s tem do razvoja številnih bolezni (rak na rodilih, tumorji, razdražljivost, migrena, prekomerna telesna teža,...) (13).

2 NAMEN DELA

Namen

V diplomski nalogi želimo ugotoviti možne razlike v serumski koncentraciji progesterona in estradiola med naravnimi in spodbujenimi ciklusi pri pacientkah v postopku zunajtelesne oploditve. Povprečne koncentracije bomo med seboj primerjali in s statističnimi izračuni ugotovili, ali se koncentracije statistično razlikujejo.

Rezultati naše raziskave bodo pokazali, da z uporabo spodbujenega postopka v primerjavi z naravnim postopkom, vplivamo na serumske koncentracije steroidnih hormonov v krvi ter da je hormonska slika ključnega pomena pri obeh postopkih.

Hipoteza

V serumu preiskovank, ki so prestale protokol spodbujanja ovulacije, so koncentracije progesterona in estradiola višje kot pri preiskovankah v naravnem ciklusu.

3 MATERIALI in METODE

3.1 PROGESTERON

3.1.1 Princip metode

Za določanje progesterona smo uporabili LIAISON analizator, ki ga proizvaja družba DiaSorin. Uporabili smo kemiluminiscenčno imunološko metodo (CLIA - chemiluminescence immunoassay) in ustrezne komercialne reagente LIAISON.



Slika 18: Analizator LIAISON

3.1.2 Reagenti

Vsi reagenti so vloženi v posebna stojala oziroma integrale, ki količinsko zadoščajo za 100 testov. Integrali z reagenti so označeni s črtnimi kodami, da jih aparat lahko prepozna. V primeru, da se čitalec pokvari, lahko kodo vnesemo tudi ročno.

Integrali vsebujejo:

- Magnetne delce (2,3 mL): obdani so s protitelesi proti progesteronu, dodan je fosfatni pufer in <0,1 % natrijev azid.
- Konjugat (20 mL): hormon progesteron je konjugiran z izoluminolnim derivatom, dodan je fosfatni pufer in <0,1 % natrijev azid.
- Kalibrator 1 (1,2 mL): vsebuje človeški serum brez hormona, 0,1 % Proclin® 300 in progesteron.
- Kalibrator 2 (1,2 mL): vsebuje človeški serum brez hormona in 0,1 % Proclin® 300.
- Pufer za redčenje vzorcev (2,0 mL): vsebuje človeški serum brez hormonov in 0,1 % Proclin.

Preostali potrebni material LIAISON:

- reagenti aktivatorji;
- kontrola za oddano svetlobo;
- tekočina za izpiranje;
- Progesteron kontrolni set;
- komplet za čiščenje.

Reagente hranimo zaprte v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Vedno morajo biti shranjeni v pokončnem stanju, da se ohrani pravilno stanje magnetnih delcev.

Reagente pripravimo tako, da jih pred uporabo horizontalno nežno in previdno pretresememo, pri tem pa pazimo, da se reagent ne začne peniti. Z vsake posodice nato odstranimo pokrov in obračamo kolešček z magnetnimi delci na dnu posodice, dokler usedlina ne postane rjave barve. To povzroči suspendiranje magnetnih delcev. Komplet reagentov nato postavimo v analizator. Pred uporabo počakamo 30 minut, v tem času pa analizator reagente avtomatsko premeša in suspendira magnetne delce.

Po uporabi reagente zapečatimo s trakom, ki je na voljo v setu, in jih nato shranimo v aparaturi LIAISON ali v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Na ta način so uporabni izključno do roka uporabnosti posameznih reagentov. Reagentov ne smemo zamrzniti. Kalibratorje lahko po odprtju uporabljam še štiri tedne pod pogojem, da so zaprti v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Na ta način so zaščiteni tudi pred svetlobo.

Nekateri reagenti vsebujejo konzervans natrijev azid. Reagenti so pripravljeni za takojšnjo uporabo (30).

3.1.3 Vzorci

Vzorce po odvzemu lahko shranujemo sedem dni pri temperaturi 2-8°C, za daljši čas shranjevanja pa jih zamrznemo na -20°C ali manj. Shranujemo jih v plastičnih ali steklenih vialah. Vzorčni material je serum, ki je bil ločen od sedimenta.

Pri prvem testiranju mora biti minimalni volumen vzorca 300 µL, za vsako nadaljnje testiranje pa potrebujemo še 75 µL vzorca. Če uporabimo zamrznjene vzorce, jih moramo pred analizo odmrzniti in dobro premešati na mešalniku Vortex. Večkratnim ciklusom odmrzovanja in zamrzovanja se moramo izogibati. Vzorci pred uporabo ne smejo vsebovati mehurčkov zraka.

Vzorcev, ki so mikrobiološko kontaminirani, lipemični ali hemolizirani, ne smemo uporabiti (30).

3.1.4 Umerjanje aparature

Komplet reagentov vsebuje kalibrator 1 in kalibrator 2, za nizko in visoko merilno območje.

Kalibracija sicer poteka avtomatsko, dodatno pa jo je treba izvesti:

- kadar uporabimo nov komplet reagentov;
- vsakih sedem dni;
- če so bile izmerjene koncentracije kontrole izven dovoljenih mej;
- po vsakem servisiranju LIAISON analizatorja.

Temperatura prostora v času kalibracije mora biti med 20°C in 26°C (30).

3.1.5 Postopek testa

Za izvedbo moramo slediti navodilom proizvajalca analizatorja LIAISON. Vzorci in reagenti so odmerjeni avtomatsko. Postopek testa v aparaturi je naslednji:

- vstavljanje vzorcev, kalibratorjev ali kontrol;
- dodajanje magnetnih delcev, obdanih s specifičnimi protitelesi;
- inkubacija;
- spiranje z izpiralnim pufrom;
- dodajanje reagentov aktivatorjev, merjenje količine oddane svetlobe.

Paziti je treba tudi na spremembo temperature v laboratoriju, kjer delamo analizo.

Temperatura se med postopkom testa ne sme spremeniti za več kot $\pm 1^{\circ}\text{C}$ (30).

3.1.6 Kontrola kakovosti

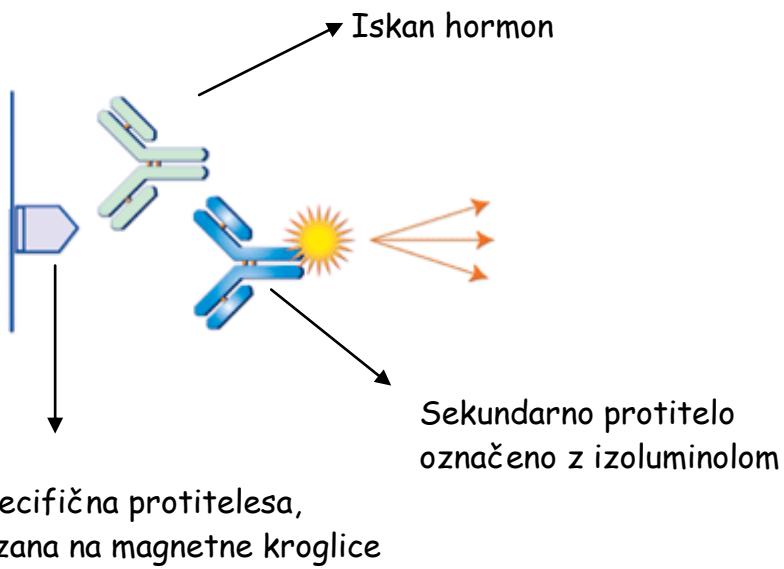
Kontrolo kakovosti je priporočljivo izvesti enkrat na dan ob uporabi analizatorja LIAISON.

Progesteron kontrolni set je dobro opremljen glede na zahteve kontrole kakovosti. Kontrolo vključimo na koncu vsakega drugega nosilca z vzorcem ali še pogosteje. Kadar je kontrola izven meja zahtevanega območja, ponovno izvedemo kalibracijo in kontrolni test.

3.1.7 Opis kemiluminiscenčne imunološke metode

Kemiluminiscenčni imunski test za določanje progesterona je direktna kompetitivna metoda, s katero kvantitativno določamo količino progesterona v vzorcih. Trdna faza so magnetni delci, ki so povezani s specifičnimi protitelesi za progesteron, progesteron pa je označen z izoluminolnim derivatom. Med inkubacijo se progesteron loči od svojega vezavnega mesta na proteinu in tekmuje z označenim progesteronom za mesto na protitelesu. Nevezan material po inkubaciji odstranimo z izpiranjem. V primeru vezave konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju posebnega reagenta aktivatorja sprosti svetlobni signal. Fotopomnoževalec izmeri

ta signal kot relativne luminiscenčne enote (RLU; ang.: relative luminescence units) in te kažejo na koncentracijo progesterona.



Slika 19: Shema sendvič kemiluminiscenčne imunološke metode

3.1.8 Rezultati

Signal, izmerjen v relativnih luminiscenčnih enotah, je obratno sorazmeren s koncentracijo progesterona v vzorcu, kontroli in kalibraciji. Analizator avtomatsko preračuna koncentracije progesterona v vzorcih. Koncentracije so podane v ng/mL. Če želimo pretvoriti rezultate v nmol/L, moramo vrednost, izraženo v ng/mL, pomnožiti s 3,18.

$$\text{ENAČBA: } \text{nmol/L} = 3,18 * \text{ng/mL}$$

3.1.9 Pričakovane vrednosti

Določitev referenčnega območja LIAISON analizatorja za progesteron so določili na vzorcih 125 moških, 32 žensk na oralni kontracepciji, 30 žensk po menopavzi in 90 nosečih žensk, razdeljenih na trimesečja. Vse osebe so bile predvidoma zdrave. Vzorci, ki so bili odvzeti v času menstruacijskega ciklusa, so pripadali 32 predvidoma zdravim ženskam v starosti od 22-53 let. Vzorci teh pacientk so bili zbrani tedensko v obdobju petih tednov. Vsem vzorcem so določili vrednosti za LH, FSH, estradiol in progesteron z opremo, ki je trenutno na trgu (30).

Preglednica II: Vrednosti za določanje referenčnega območja analizatorja za progesteron

Populacija (N)	Srednja vrednost progesterona	Osrednje 95% območje
Moški (125)	3,8 nmol/L	<1,3 – 8,6 nmol/L
Populacija (N)	Srednja vrednost progesterona (nmol/L)	Absolutno območje (nmol/L)
ŽENSKE		
Folikularna faza (66)	3,2	<1,3 – 7,9
Luteinska faza (93)	23,8	3,8 – 78,9
Srednja luteinska faza (26)	43,2	17,5 – 78,9
Oralna kontracepcija (32)	2,9	<1,3 – 6,7
Menopavza (30)	1,9	<1,3 – 4,4
NOSEČNICE		
Prvo trimesečje (30)	90,9	50,2 – 146,3
Drugo trimesečje (30)	125,9	49,6 – 235,3
Tretje trimesečje (30)	269,0	143,1 – 454,7

3.1.10 Specifične karakteristike analizatorja LIAISON**Meritveno območje**

Meritveno območje vsebnosti progesterona z analizatorjem LIAISON je od 1,3 do 127,2 nmol/L. Najnižji nivo poročanja vsebnosti je 1,3 nmol/L, vrednosti določene pod to mejo označimo kot vrednost <1,3 nmol/L. Najvišji nivo poročanja koncentracije brez redčenja je 127,2 nmol/L. Vzorce, katerih izmerjena koncentracija presega maksimum meritvenega območja, lahko redčimo s pufom za redčenje in jih potem ponovno analiziramo. Za vsak takšen vzorec lahko uporabimo redčenje 1:10, kar pomeni, da vzamemo 50 µL vzorca in 450 µL pufra za redčenje (30).

Analitična občutljivost

Analitična občutljivost je definirana kot minimalna meja detekcije in je <1,27 nmol/L (30).

Funkcionalna občutljivost

Funkcionalna občutljivost je definirana kot koncentracija, pri kateri koeficient variacije, izražen v %, preseže vrednost 20%. Funkcionalna občutljivost, izpeljana iz regresijske analize pa je 3,18 nmol/L (30).

Primerjalna metoda

239 kliničnih vzorcev je bilo testiranih tako z LIAISON Progesteron metodo kot z radioimunsko metodo (RIA). Vključili so 44 vzorcev predvidoma zdravih moških, 154 vzorcev predvideno zdravih žensk in 41 vzorcev nosečnic. Vsi vzorci so bili znotraj meritvenega območja za LIAISON Progesteron metodo (1,3 do 127,2 nmol/L) (30).

$$\text{ENAČBA PREMICE : } \text{LIAISON} = 0.96 \text{ (RIA)} + 0.48; r = 0,98$$

Natančnost metode

Natančnost določimo z meritvami šestih vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije analita. Vzorce merimo dvakrat dnevno po dve meritvi, to pa ponavljamo 20 operativnih dni. Na ta način določimo ponovljivost in obnovljivost analize, in sicer ponovljivost znotraj ene serije (intra-analizna variacija) ter ponovljivost med serijami (inter-analizna variacija) (30).

Preglednica III: Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti

Ponovljivost	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (nmol/L)	17,8	81,4	23,2	56,3	11,4	31,8
Standarda deviacija (nmol/L)	1,6	3,8	1,6	2,5	0,95	1,6
Koeficient variacije (%)	9%	5%	6%	4%	8%	5%

Preglednica IV: Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti

Obnovljivost	A	B	C	D	E	F
Število analiziranj	80	80	80	80	80	80
Povprečje (nmol/L)	17,8	81,4	23,2	56,3	11,4	31,8
Standard deviacije (nmol/L)	1,9	4,4	2,2	3,8	1,6	1,9
Koeficient variacije (%)	11%	6%	9%	7%	15%	6%

Točnost metode

Točnost metode preverimo s testom redčenja. Tri vzorce redčimo in analiziramo. Rezultati so analizirani kot linearna regresija pričakovanih in izmerjenih vrednosti (30).

$$\text{ENAČBA PREMICE: Izmerjene vrednosti} = \text{Pričakovane vrednosti} * (1,01) - 0,13; r = 0,99$$

Preglednica V: Rezultati meritev vzorcev za določanje točnosti

Redčenje	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane (povprečje v %)
nerazredčen		105,2	
1:2	52,5	53,7	
1:4	26,4	27,0	
1:8	13,0	12,4	
1:16	6,7	4,8	
nerazredčen		75,7	
1:2	37,8	33,4	
1:4	18,8	19,7	
1:8	9,5	8,3	
1:16	4,8	3,5	
nerazredčen		74,7	
1:2	37,5	39,1	
1:4	18,7	20,7	
1:8	9,2	10,2	
1:16	4,8	5,7	

Ponovljivost metode

Serumu treh žensk in treh moških dodamo progesteron. Sledi primerjava izmerjenih vrednosti z vrednostmi človeškega seruma brez hormona, kateremu je bila predhodno dodana enaka količina progesterona (spiking metoda). S tem postopkom določimo ponovljivost v %. Srednja vrednost ponovljivosti je 101 % (30).

Preglednica VI: Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti

	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane = % ponovljivosti
ženska 1- nerazred.	25,1		
nizek dodatek	42,6	44,8	95
srednji dodatek	69,0	65,2	106
visok dodatek	118,9	106,9	111

povprečje			104
ženska 2 - nerazred.	14,3		
nizek dodatek	31,8	35,0	91
srednji dodatek	49,9	53,4	93
visok dodatek	88,1	88,4	100
povprečje			95
ženska 3-nerazred.	17,2		
nizek dodatek	42,0	41,6	101
srednji dodatek	61,4	66,8	92
visok dodatek	116,4	110,0	106
povprečje			100
moški 1-nerazred.	5,1		
nizek dodatek	27,7	24,8	112
srednji dodatek	49,3	45,1	109
visok dodatek	101,8	86,8	117
povprečje			113
moški 2-nerazred.	5,1		
nizek dodatek	24,5	25,7	95
srednji dodatek	41,6	44,2	94
visok dodatek	78,5	79,2	99
povprečje			96
moški 3-nerazred-	4,4		
nizek dodatek	28,9	28,9	100
srednji dodatek	53,1	54,1	98
visok dodatek	94,8	97,3	97
povprečje			98
		povprečje ponovljivosti	101 %

Specifičnost metode

Križno reaktivnost LIAISON Progesteron metode določimo z dodatkom snovi v kontrolni serum. Dodane snovi so navedene v tabeli. Vzorce analiziramo, križno reaktivnost pa lahko izračunamo (30).

*ENAČBA : % križne reaktivnosti = (vrednost analize/koncentracija dodanih snovi) * 100*

Preglednica VII: *Rezultati meritev vzorcev za določanje specifičnosti*

Križni reaktanti	Testirane koncentracije (ng/mL)	% križne reaktivnosti
Kortizol	1000	0,3
DHEA-S	100000	0,0
17-hidroksiprogesteron	100	3,9
Kortikosteron	1000	0,7
Danazol	100	0,1
11-deoksikortikosteron	1000	0,8
11-deoksikortizol	1000	0,3
estradiol	100	0,1
pregnenolon	1000	0,2
testosteron	100	1,6
20 α -dihidropogesteron	1000	0,2

Moteče snovi

Kontrolne študije o potencialno motečih snoveh so pokazale, da hemoliza (do 600 mg/dL), bilirubinemija (do 25 mg/dL) ali holesterolemija (do 500 mg/dL) ne vplivajo na analizo. Enako niso motila niti človeška proti-mišja protitelesa (HAMA) do koncentracije 360 ng/mL. Povišana vrednost trigliceridov glede na normalno raven je lahko moteča (30).

3.2 ESTRADIOL

3.2.1 Princip metode

Za določanje estradiola smo uporabili analizator LIAISON proizvajalca DiaSorin. Uporabili smo kemiluminiscenčno imunološko metodo (CLIA - chemiluminescence immunoassay) in ustrezne komercialne reagente LIAISON.

3.2.2 Reagenti

Komplet reagentov (integral), ki količinsko zadošča za 100 določitev vsebuje:

- Magnetne delce (2,3 mL): prevlečeni so s protitelesi proti estradiolu, dodan je fosfatni pufer, površinsko aktivna snov in 0,09 % natrijev azid.
- Konjugat (2 mL): estradiol je konjugiran z izoluminolnim derivatom, dodan je MES-pufer s površinsko aktivno snovjo in 0,1 % Proclin® 300.

- Preizkusni pufer (12 mL): vsebuje citrat fosfatni pufer, površinsko aktivno snov in 0.1 % Proclin® 300.
- Pufer za redčenje vzorcev (14 mL): vsebuje človeški serum brez hormona, 0,2 % Proclin® 300. Raztopine je dovolj za 37 redčenj (80 µL vzorca in 320 µL pufra za redčenje).
- Kalibrator 1 (3.5 mL): človeški serum brez hormona, 0,2 % Proclin® 300 in estradiol. Kalibratorja je volumsko dovolj za 5 kalibracij.
- Kalibrator 2 (3.5 mL): človeški serum brez hormona, 0,2 % Proclin® 300 in estradiol. Kalibratorja je volumsko dovolj za 5 kalibracij.

Preostali potrebni material LIAISON:

- reagenti aktivatorji;
- kontrola za oddano svetlobo;
- tekocina za izpiranje;
- Estradiol kontrolni set;
- komplet za čiščenje.

Zahteve za reagente, priprava in shranjevanje reagentov so enake kot pri določevanju progesterona. Integrali z reagenti so po odprtju v ustreznih pogojih shranjevanja uporabni še 4 tedne (31).



Slika 20: Komplet reagentov (integral)

3.2.3 Vzorci

Vzorce po odvzemu lahko shranjujemo pet dni pri temperaturi 2-8°C, za daljši čas pa jih zamrznemo na -20°C ali manj. Vzorčni material je serum, ki je bil ločen od sedimenta.

Minimalni volumen vzorca, ki ga potrebujemo za prvo testiranje, je 400 µL, za vsako nadaljnje testiranje pa potrebujemo še 200 µL vzorca.

Ostale zahteve so enake zahtevam pri določevanju progesterona.

3.2.4 Umerjanje aparature

Komplet reagentov vsebuje kalibrator 1 in kalibrator 2 za nizko in visoko merilno območje.

Kalibracija poteka avtomatsko, v nekaterih primerih pa jo izvedemo še dodatno:

- kadar uporabimo nov komplet reagentov
- vsake tri dni
- če so bile izmerjene koncentracije kontrole izven dovoljenih mej
- po vsakem servisiranju LIAISON analizatorja

Temperatura prostora v času kalibracije mora biti med 20°C in 26°C (31).

3.2.5 Postopek testa

Upoštevati moramo navodila proizvajalca analizatorja LIAISON. Vzorci in reagenti so bili odmerjeni avtomatsko in so označeni s črtnimi kodami, da jih aparat lahko prepozna. V slučaju, da se čitalec pokvari, lahko kodo vnesemo tudi ročno.

Postopek testa v aparaturi je naslednji:

- vstavljanje vzorcev, kalibratorjev ali kontrol;
- dodajanje pufra in magnetnih delcev;
- 21-minutna inkubacija;
- vstavljanje konjugata;
- 4-minutna inkubacija;
- izpiranje z izpiralnim pufrom;
- dodajanje reagentov aktivatorjev, merjenje oddane svetlobe (31).

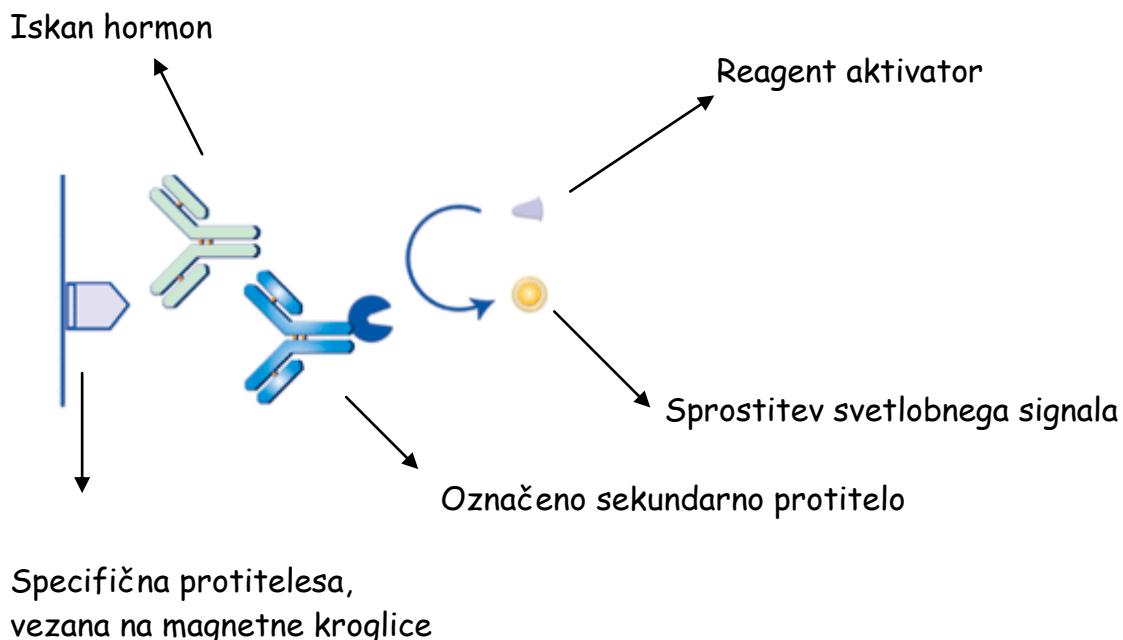
3.2.6 Kontrola kakovosti

Kontrolo kakovosti je priporočljivo izvesti enkrat na dan uporabe analizatorja LIAISON. Kadar je kontrola izven meja zahtevanega območja, ponovno izvedemo kalibracijo in kontrolni test. O rezultatih ne smemo poročati, dokler meritve kontrol niso v predpisanim območju (31).

3.2.7 Opis modificirane kemiluminiscenčne imunološke metode

Metoda, s katero kvantitativno določamo estradiol, je direktna kompetitivna kemiluminiscenčna imunološka metoda. Gre za modificirano dvostopenjsko CLIA metodo.

Trdna faza so magnetni delci, ki so povezani s specifičnimi protitelesi za estradiol. Med inkubacijo se estradiol loči od svojega vezavnega mesta na proteinu in se veže na estradiol v vzorcu. Nato dodamo označeni estradiol, ki tekmuje za vezavna mesta na protitelesu. Nevezan material po inkubaciji odstranimo z izpiranjem. V primeru vezave konjugata se po dodajanju posebnega reagenta aktivatorja sprosti svetlobni signal. Fotopomnoževalec izmeri ta signal kot relativne luminiscenčne enote (RLU; ang.: relative luminescence units) in te kažejo na koncentracijo estradiola.



Slika 21: Princip modificirane kemiluminiscenčne metode

3.2.8 Rezultati

Signal, izmerjen v relativnih luminiscenčnih enotah, je obratno sorazmern s koncentracijo estadiola v vzorcu, kontroli in kalibraciji. Analizator avtomatsko preračuna koncentracije estradiola v vzorcih. Koncentracije so podane v pg/mL. Če želimo pretvoriti rezultate v pmol/L uporabimo naslednjo zvezo:

$$\text{ENAČBA: } 1 \text{ pg/mL} = 3.67 \text{ pmol/L}$$

3.2.9 Redčenje vzorcev

Koncentracije vzorcev, ki so nad mejo detekcije, lahko redčimo. Uporabljam reagent za redčenje v razmerju 1:5, kar pomeni, da vzamemo 80 µL vzorca in 320 µL reagenta. Minimalna količina, ki jo potrebujemo, je 400 µL (31).

3.2.10 Pričakovane vrednosti

Preglednica VIII: Vrednosti za določanje referenčnega območja analizatorja za estradiol

Populacija (N)	Povprečna vrednost estradiola (pmol/L)	95 % opazovano območje (pmol/L)
Moški (134)	84,4	*nz – 205,5
Ženske (normalni ciklus)		
Folikularna faza (75)	165,1	nz – 411,0
Predovulatorno obdobje (30 ± 3 dni)	407,4	132,1 – 921,2
Luteinska faza (75)	256,9	113,8 – 499,1
Nezdravljeni menopavza (48)	51,4	nz – 165,1
Menopavza (52)	429,4	91,7 - 1490,0
Hormonska kontracepcija (55)	106,4	nz – 348,6

*nz-nezaznavne vrednosti

3.2.11 Specifične karakteristike analizatorja LIAISON

Meritveno območje

Meritveno območje vsebnosti estradiola z analizatorjem LIAISON je med 44,0 in 4037,0 pmol/L. Najnižji nivo poročanja vsebnosti je 44,0 pmol/L, vrednosti, določene pod to mejo, označimo kot vrednost <44,0 pmol/L. Najvišja vrednost brez redčenja je 4037,0 pmol/L. Vsak vzorec, katerega vrednost je več kot 4037,0 pmol/L, moramo redčiti. Priporočeno redčenje je 1:5 (80 µL vzorca in 320 µL pufra za redčenje). Najmanjša zahtevana količina razredčenega vzorca znaša 400 µL (31).

Analitična občutljivost

Analitična občutljivost je definirana kot minimalna vrednost koncentracije snovi, ki jo še lahko zaznamo. Vrednost je $\leq 44,0$ pmol/L (31).

Natančnost metode

A) Natančnost določimo tako, da na 6-ih vzorcih, ki vsebujejo različne koncentracije hormona, opravimo dvakrat na dan po dve meritvi, in to ponavljamo 20 operativnih dni. S tem določimo ponovljivost in obnovljivost metode (ponovljivost znotraj ene serije in med serijami) (31).

Preglednica IX: Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti

Ponovljivost	1	2	3	4	5	6
Število analiz	80	80	80	80	80	80
Povprečje (pmol/L)	201,8	300,9	546,8	1005,6	1695,5	3027,7
Standardna deviacija (pmol/L)	18,3	13,9	29,0	34,9	160,7	231,6
Koeficient variacije (%)	9,1	4,6	19,4	3,5	9,5	7,6

Preglednica X: Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti

Obnovljivost	1	2	3	4	5	6
Število analiz	80	80	80	80	80	80
Povprečje (pmol/mL)	201,8	300,9	546,8	1005,6	1695,5	3027,7
Standardna deviacija (pmol/L)	29,7	28,6	37,1	55,4	151,9	303,5
Koeficient variacije (%)	14,7	9,5	7,0	5,5	9,0	10,0

B) Natančnost postopka določimo tudi tako, da 6 vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije hormona z vrednostjo več kot 1100 pg/mL, redčimo in izmerimo koncentracije v 5 operativnih dneh. Na ta način določimo ponovljivost in obnovljivost postopka (31).

Preglednica XI: Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti

Ponovljivost	1	2	3	4	5	6
Število analiz	20	20	20	20	20	20
Povprečje (pmol/L)	5167	10305	14441	5432	9314	16651
Standardna deviacija (pmol/L)	401,9	823,9	1094	394,1	547,2	1571
Koeficient variacije (%)	7,8	8,0	8,7	7,3	5,9	9,4

Preglednica XII: Rezultati meritev vzorcev za določanje obnovljivosti

Obnovljivost	1	2	3	4	5	6
Število analiz	20	20	20	20	20	20
Povprečje (pmol/L)	5167	10305	14441	5432	9314	16651
Standardna deviacija (pmol/L)	380,2	1138	1380	558,7	1148	2368
Koeficient variacije (%)	7,4	11	9,6	11,9	12,3	14,2

Specifičnost metode

Za določanje specifičnosti dodamo potencialne križne reaktante, s katerimi ocenimo križno reaktivnost preizkusa. Križne reaktante dodamo v kontrolni serum (31).

Preglednica XIII: Rezultati meritev vzorcev za določanje specifičnosti

Križni reaktanti	Testirana koncentracija (ng/mL)	Križna reaktivnost (%)
Mesterolon	50000	0,0
DHEA-S	50000	0,0
Etisteron	500	0,0
11-Ketotestosteron	500	0,0
Estriol	50	0,0
Norgestrel	50	0,0
Estron	5	-0,8
Androstendion	100000	0,0
Danazol	100000	0,0
Testosteron Dekanoat	100000	0,0
Deksametazon	100000	0,0
Kortikosteron	100000	0,0
Progesteron	100000	0,0
17-hidroksiprogesteron	100000	0,0
Kortizol (hidrokortizon)	100000	0,0
Kortizon	10000	0,0
5α-Dihidrotestosteron	10000	0,0
Etioholanolon	10000	0,0

Testosteron	10000	0,0
DHEA	10000	0,0
Estriol-3 sulfat (Na-sol)	10000	0,0
Prednizon	10000	0,0
11-deoksikortikosteron	10000	0,0
Pregnenolon	10000	0,0
Androstendion	1000	0,0
17 α -Estradiol	1000	0,0
Etinilestradiol	1000	0,0
17 α -metil-19-nortestosteron	1000	0,0
Pregnatriol	1000	0,0
Ekvilin	100	0,0
17 α -Estradiol-3-sulfat (Na-sol)	100	0,0
17 β -Estradiol-3 β -D-glukuronid	100	0,0
17 β -Estradiol- 17(β)-D-glukuronid	100	0,1
17 β -Estradiol-17-propionat	100	0,0
Noretindron	100	0,0
17 β -Estradiol-3-sulfat-17-glukuronid	100	0,0
19-Nortestosteron	100	0,1
Estron-3-glukuronid	100	0,1
(D)-Ekvilenin	10	-0,2
Estron natrijev sulfat	10	0,6
17 β -Estradiol-17-valerat	10	0,0
Aldosteron	10000	0,0
Androstendiol	10000	0,0

Ponovljivost metode

Za večkratno analiziranje izberemo vzorce, ki imajo zadosten volumen. Izberemo 6 klinično pripravljenih vzorcev z visokimi koncentracijami in 6 kliničnih vzorcev z nizkimi koncentracijami. Vzorci za določanje ponovljivosti so pripravljeni z mešanjem definiranih vzorcev z visokimi in nizkimi koncentracijami (analiza vsaj 4 vzorcev) (31).

Preglednica XIV: Rezultati meritev vzorcev za določanje ponovljivosti

	Pričakovane koncentracije (pmol/L)	Izmerjene koncentracije (pmol/L)	% ponovljivosti
visoko redčenje		2176	
2H : 1L	1523	1486	98
1H : 1L	1189	1053	89
1H : 2L	851	716	84
nizko redčenje		202	
povprečje			90
visoko redčenje		2723	
2H : 1L	1831	1897	104
1H : 1L	1372	1538	112
1H : 2L	917	1046	114
nizko redčenje		26,8	
povprečje			110
visoko redčenje		2422	
2H : 1L	1655	1978	119
1H : 1L	1262	1714	136
1H : 2L	870	1233	142
nizko redčenje		104,6	
povprečje			132
visoko redčenje		1897	
2H : 1L	1281	1442	113
1H : 1L	961	1284	134
1H : 2L	642	943	146
nizko redčenje		26,8	
povprečje			131
visoko redčenje		2851	
2H : 1L	1281	1706	87
1H : 1L	961	1057	73
1H : 2L	642	649	66

nizko redčenje		56,5	
povprečje			75
visoko redčenje		2209	
2H : 1L	1523	1406	92
1H : 1L	1163	1028	88
1H : 2L	818	672	82
nizko redčenje		136,5	
povprečje			87
		povprečje ponovljivosti	104

Korelacija

Nekateri vzorci so bili testirani z dvema metodama, in sicer z metodo LIAISON Estradiol in še z drugo avtomatsko metodo. Vključenih je bilo 259 vzorcev. Vzorce s koncentracijo <4037 pmol/L testiramo nerazredčene, medtem ko vzorce s koncentracijo 4037 pmol/L - 20185 pmol/L redčimo v razmerju 1:5 (31).

ENAČBA PREMICE: LIAISON = 0.83 (lmm) - 0,93; r = 0.98

Točnost metode

Točnost določimo s testom redčenja. Vzamemo šest vzorcev in jih redčimo. Rezultati so analizirani kot linearna regresija pričakovanih in izmerjenih vrednosti (31).

*ENAČBA PREMICE: Izmerjene vrednosti = Pričakovane vrednosti * (1,1) + 2; r = 0.98*

Moteče snovi

Kontrolne študije o potencialno motečih snoveh so pokazale, da na postopek analize ne vplivajo holesterol (do 1000 mg/dL), hemoliza (do 600 mg/dL), bilirubin (do 10 mg/dL) in trigliceridi (do 200 mg/dL) (31).

4 REZULTATI

4.1 OVREDNOTENJE SKUPINE

Na Ginekološko kliniko v Ljubljani so bile napotene pacientke, ki so bile glede na rezultate predhodnih pregledov ter ostale parametre razvrščene v skupino naravnega ciklusa ali v skupino spodbujenega ciklusa. V skupino naravnega ciklusa je bilo vključenih 48 pacientk, v drugo skupino pa 31 pacientk.

4.1.1 Serumske koncentracije vzorcev v naravnem postopku ZTO

Vzorec	Progesteron (nmol/L)	Estradiol (nmol/L)
1	3.6	0.52
2	7.4	1.92
3	13.2	3.71
4	1.3	0.61
5	6.8	4.12
6	9.3	5.28
7	1.5	0.74
8	11.2	7.17
9	1.3	1.42
10	6.4	1.21
11	0.5	0.41
12	6.0	0.94
13	16.2	7.15
14	15.4	5.32
15	9.8	2.31
16	14.5	5.85
17	1.4	0.72
18	19.5	6.01
19	4.3	0.38
20	1.8	0.42
21	10.0	5.52
22	12.1	5.23
23	0.4	0.42
24	2.3	1.21
25	6.5	0.55
26	3.4	0.51
27	0.5	0.31
28	18.0	4.25
29	17.4	0.45
30	0.5	0.33

31	1.7	0.45
32	1.8	0.63
33	3.7	0.65
34	0.4	0.65
35	0.4	0.32
36	7.8	3.11
37	1.5	0.54
38	4.6	6.52
39	0.8	0.34
40	0.4	0.32
41	1.4	0.61
42	8.9	3.52
43	2.5	0.31
44	0.4	0.34
45	2.2	0.11
46	1.5	0.41
47	5.0	1.19
48	8.0	5.27

4.1.2 Serumske koncentracije vzorcev v spodbujenem postopku ZTO

Za analizo smo izbrali prve koncentracije vzorcev (zasenčeni tisk), pri katerih je bila koncentracija izmerjena v serumu. Druge koncentracije so bile izmerjene v foliklovih tekočinah.

Vzr.	Št. foliklov	Pro (nmol/L)	E2 (nmol/L)
1	1	33,7	4
2	1	17,3	2,5
3	1	15	2,8
	2	22,5	1,6
	3	17,2	1,9
	4	8,3	1,6
	5	10,4	2,8
	6	10,6	1,9

4	1	10,6	2,3
5	1	7,1	1,5
6	1	14,3	0,02
7	1	20,3	1,1
	2	15,8	1,5
8	1	9,1	1,6
	2	8,6	1,4
	3	26	0,4
	4	17	0,5
	5	9,7	0,7
9	1	9,7	1,3
	2	9,1	1,1
	3	10,5	0,8
	4	17,2	1,1
	5	16,9	0,69
	6	8	0,71
	7	6,8	0,7
	8	8	0,6
10	1	7,8	1,4
11	1	21,3	0,1
	2	15,4	0,05
	3	9,5	0,5
	4	20,1	0,3
	5	6,1	0,31
	6	11,7	0,45
	7	31,2	0,4
12	1	15,7	1
13	1	10	0,6
	2	10,7	0,1
	3	10,5	0,3
	4	11,2	0,02
	5	9	0,33

	6	10,3	0,4
14	1	10,7	0,7
15	1	15,1	1
16	1	8	0,6
	2	10,9	0,9
	3	5	1,2
	4	10,6	1,1
	5	15,9	1,1
	6	6	5,12
	7	4	1,8
	8	8,5	1,9
17	1	10,3	3
18	1	11,2	1,8
	2	10,8	2,4
	3	15,1	1,7
	4	14,9	1,1
19	1	4,5	1,2
20	1	15,1	2,8
21	1	9,1	4,75
22	1	10,8	0,5
	2	15,1	0,4
	3	10,8	0,3
	4	10,3	0,2
	5	7	0,31
	6	1	0,4
23	1	11,2	5,82
24	1	11,3	5,91
25	1	10,3	6,31
26	1	11,4	3,1
27	1	10,7	2,1
28	1	10,6	6,21
29	1	15,5	5,75

	2	16,2	2
	3	14	1,1
	4	13,8	1,6
	5	13,9	1,4
	6	13,5	1
	7	13,1	1,7
30	1	13,7	2,3
	2	12	2,4
	3	10,3	0,9
	4	10,8	1,5
	5	11	1,4
	6	10,8	3,5
	7	21	0,5
31	1	28,7	0,7
32	1	20,9	1,3
33	1	15,3	0,6
	2	16,8	0,4
	3	10,6	0,5
	4	14,8	1,1
34	1	5,5	5,8
35	1	20,7	5,3
36	1	28,5	3,9
	2	12,6	2,7
	3	8,5	2,71
	4	16,5	1,6
	5	21,4	2,8
	6	19,9	4,9
37	1	25,7	2,1
	2	14,4	1,2
	3	21,4	1,4
	4	17,4	0,9
	5	29,5	4,1

	6	22,3	2,9
38	1	18,1	2,91
	2	15,3	1,7
	3	16	1,6
	4	27,1	1,9
	5	11,9	1,91
	6	23,3	2,8
	7	14,5	1,8
39	1	4,2	3,3
40	1	16,7	2,7
	2	27,9	2,2
	3	16,3	4,8
	4	21,1	4,1
41	1	16,1	3,7
42	2	5,5	5,1
43	1	3,6	0,6
	2	8	1,8
	3	7,3	1,41
	4	9,2	1,4
44	1	1,3	1,9
45	1	22,9	0,4
	2	22,8	0,5
	3	13,7	0,2
46	1	11,9	4,2
47	1	24,6	1,5
	2	20,6	0,5
48	1	16	2
	2	12,9	2,2
	3	7,8	3,9
	4	10,7	2,3
	5	0,3	0,05
49	1	0,2	0,06

	2	0,4	0,03
	3	0,5	0,04
	4	0,6	0,02
50	1	10,4	5,7
51	1	16	1
	2	6	1,5
	3	3,1	1,2
	4	15,6	0,8
	5	1	0,6
	6	11,8	1,5
	7	11,7	1
52	1	15,8	2,7
	2	11,7	1,2
	3	16,2	1,5
	4	7,5	1,8
	5	21,9	2
	6	14,4	1,5
53	1	20,3	0,7
	2	14,8	0,4
54	1	1,9	1,1
	2	3,8	2,5
55	1	22,3	0,8
	2	28	0,92
	3	24	0,9
	4	10,4	0,2
	5	21,4	0,7

4.2 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate smo analizirali in statistično ovrednotili s pomočjo programa MedCalc. Skupine, v katere so bile razdeljene paciente-preiskovanke, smo glede na izbran parameter medsebojno primerjali. Poskušali smo ugotoviti, ali obstajajo med njimi statistično značilne razlike. Vse statistične teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05.

A) Na začetku smo preverili, če se izmerjene koncentracije progesterona in estradiola v naravnem postopku porazdeljujejo normalno. Uporabili smo Kolmogorov-Smirnov test za testiranje normalnosti porazdelitve (preglednica XV) in ugotovili, da koncentracije progesterona v naravnem postopku sledijo normalni porazdelitvi. Izračunana stopnja značilnosti je več kot 0,05 ($p=0,0799$). Nasprotno pa velja, da koncentracije estradiola v naravnem postopku ne sledijo normalni porazdelitvi, stopnja značilnosti je tako 0,010, kar je manj kot 0,05 (preglednica XVI).

Iz Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve lahko razberemo tudi naslednje podatke: število preiskovank, najnižja ter najvišja vrednost analita, povprečna vrednost, mediana, standardna deviacija, relativna standardna deviacija, varianca ter 95 % interval zaupanja.

Preglednica XV: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracije progesterona v naravnem postopku

Variable	Prog
Sample size	48
Lowest value	<u>0,4000</u>
Highest value	<u>19,5000</u>
Arithmetic mean	5,7396
95% CI for the mean	4,1361 to 7,3431
Median	3,6500
95% CI for the median	1,7744 to 6,5768
Variance	30,4965
Standard deviation	5,5224
Relative standard deviation	0,9622 (96,22%)
Standard error of the mean	0,7971
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution	accept Normality ($P=0,0799$)

Preglednica XVI: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracije estradiola v naravnem postopku

Variable	Estra
Sample size	48
Lowest value	<u>0,1100</u>
Highest value	<u>7,1700</u>

Arithmetic mean	2,0892
95% CI for the mean	1,4317 to 2,7466
Median	0,6850
95% CI for the median	0,5349 to 1,5480
Variance	5,1267
Standard deviation	2,2642
Relative standard deviation	1,0838 (108,38%)
Standard error of the mean	0,3268
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution	reject Normality (P=0,0010)

B) Preverili smo tudi, če se izmerjene koncentracije progesterona in estradiola v spodbujenem postopku porazdeljujejo normalno. Vzeli smo prve vzorce koncentracij hormonov v spodbujenem postopku in meritve testirali s pomočjo Kolmogorov-Smirnov testa (preglednica XVII in XVIII). Rezultati testa za progesteron v spodbujenem postopku kažejo, da koncentracije hormonov sledijo normalni porazdelitvi, saj je izračunana stopnja značilnosti višja kot 0,05 ($p=0,4352$). Enako velja tudi za koncentracije estradiola, saj je stopnja značilnosti $p=0,8728 > 0,05$.

Preglednica XVII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracij progesterona v spodbujenem postopku

Variable	Prog 2
Sample size	31
Lowest value	4,2000
Highest value	33,7000
Arithmetic mean	14,9258
95% CI for the mean	12,4014 to 17,4502
Median	15,0000
95% CI for the median	10,7586 to 16,3487
Variance	47,3633
Standard deviation	6,8821
Relative standard deviation	0,4611 (46,11%)
Standard error of the mean	1,2361
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution	accept Normality (P=0,4352)

Preglednica XVIII: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za testiranje normalnosti porazdelitve koncentracij estradiola v spodbujenem postopku

Variable	Estra 2
Sample size	31
Lowest value	0,1000
Highest value	6,3100
Arithmetic mean	2,8339
95% CI for the mean	2,1097 to 3,5580
Median	2,7000
95% CI for the median	1,4757 to 3,7829
Variance	3,8978
Standard deviation	1,9743
Relative standard deviation	0,6967 (69,67%)
Standard error of the mean	0,3546
Kolmogorov-Smirnov test for Normal distribution	accept Normality (P=0,8728)

C) Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinama naravnega in spodbujenega postopka, katerih koncentracije sledijo normalni porazdelitvi, smo uporabili parametrični t-test za neodvisne vzorce. Ta test lahko uporabimo, ker koncentracije progesterona v obeh postopkih sledijo normalni porazdelitvi (preglednica XIX). Ničelna hipoteza pravi, da sta ne glede na postopek povprečni koncentraciji enaki. Rezultat $p < 0,05$ nam pove, da ničelno hipotezo lahko zavrzemo in zaključimo, da med naravnim in spodbujenim postopkom obstaja statistično značilna razlika.

Preglednica XIX: Rezultati t-testa za testiranje dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni porazdelitvi

Sample 1		Sample 2	
Variable	Prog	Variable	Prog 2
Sample 2			
Variable	Prog	Variable	Prog 2
Sample size	48	Sample 1	Sample 2
Arithmetic mean	5,7396	48	31
95% CI for the mean	4,1361 to 7,3431	14,9258	12,4014 to 17,4502
Variance	30,4965	47,3633	6,8821
Standard deviation	5,5224	1,2361	
Standard error of the mean	0,7971		

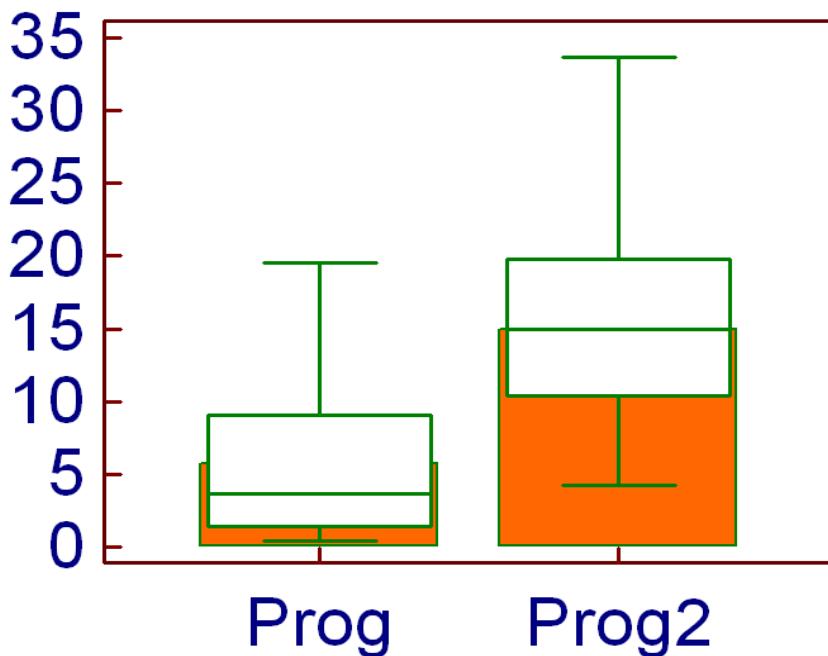
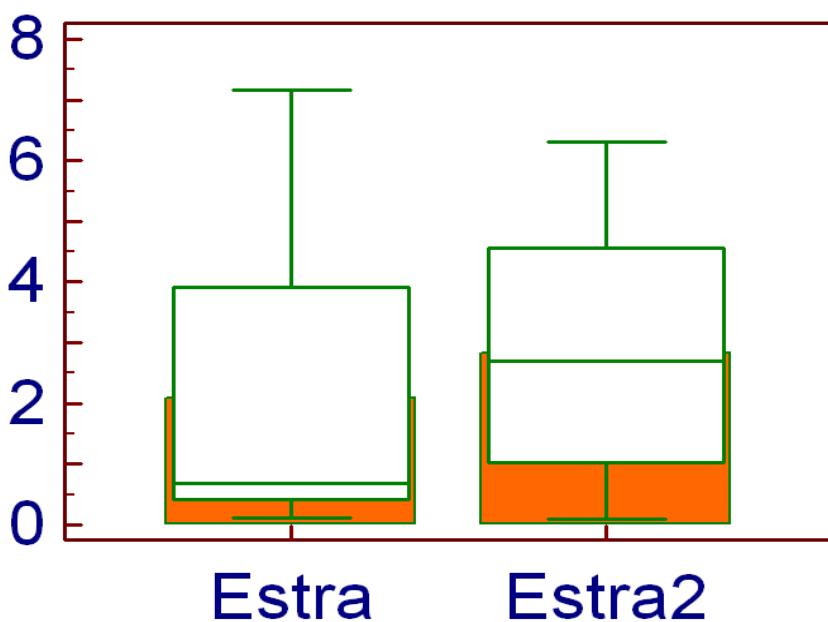
F-test for equal variances	P = 0,173
T-test (assuming equal variances)	
Difference	9,1862
Standard Error	1,4029
95% CI of difference	6,3928 to 11,9797
Test statistic t	6,548
Degrees of Freedom (DF)	77
Two-tailed probability	P < 0,0001

D) V nadaljevanju smo uporabili neparametrični test, saj izmerjene koncentracije estradiola v naravnem postopku niso sledile normalni porazdelitvi. Neparametrični testi ne uporabljajo predpostavk parametrov testne spremenljivke (kot je npr. povprečna vrednost pri parametričnih testih) in ne predpostavljajo uporabe točno določene porazdelitve. Uporabili smo Mann-Whitney test, s katerim primerjamo dva vzorca, ki sta med seboj neodvisna. Hoteli smo ugotoviti, ali obstajajo statistično značilne razlike med skupinama. Testirali smo ničelno hipotezo, ki pravi, da je ne glede na to, ali je postopek naraven ali spodbujen, povprečna koncentracija estradiola enaka. Rezultati so pokazali, da je p-vrednost <0.05, zato smo ničelno hipotezo zavrgli. Med koncentracijami v naravnem proti spodbujenem postopku obstaja statistično značilna razlika.

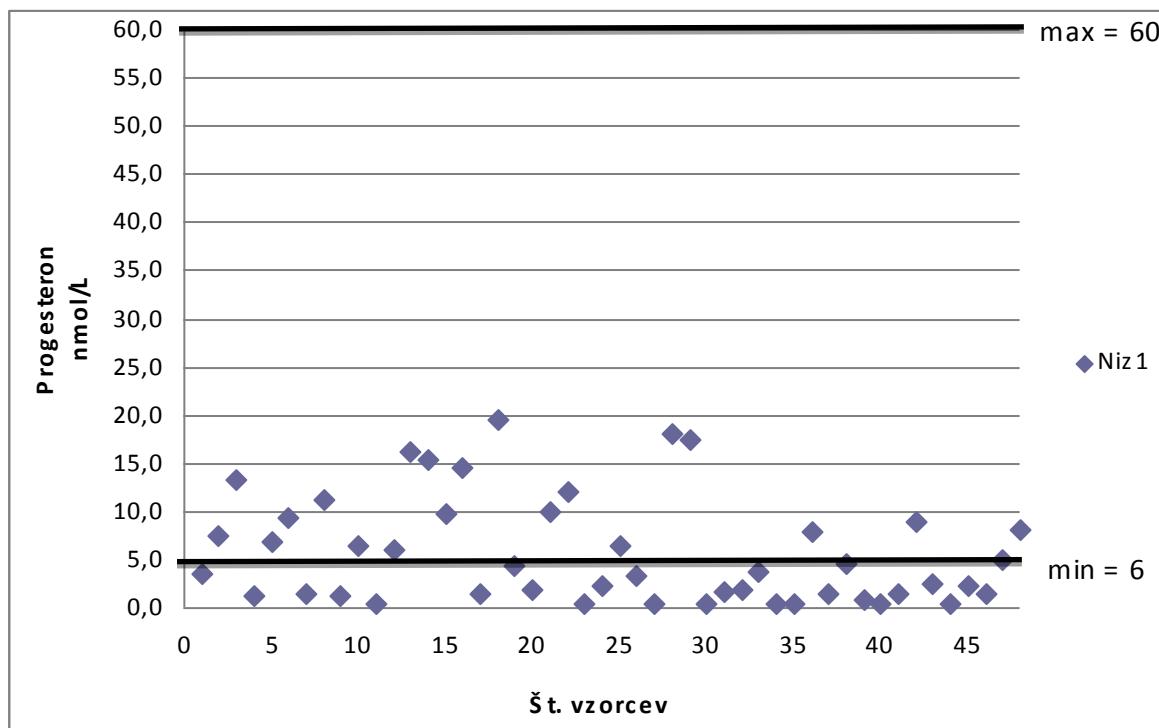
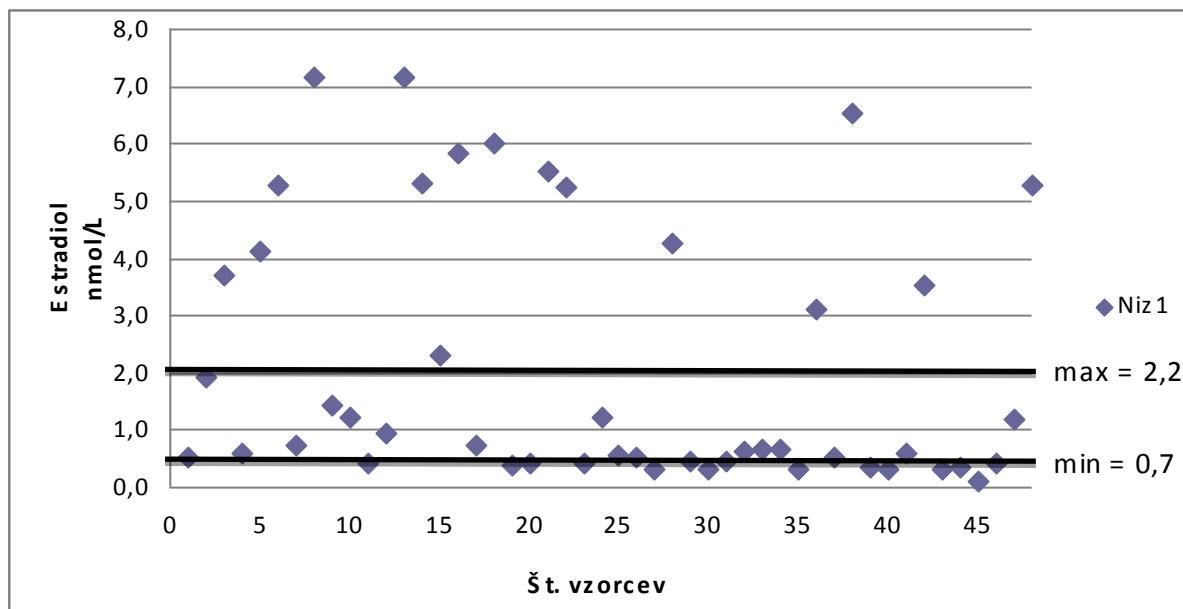
Preglednica XX: Rezultati Mann-Whitney testa za testiranje dveh neodvisnih vzorcev, ki ne sledita normalni porazdelitvi

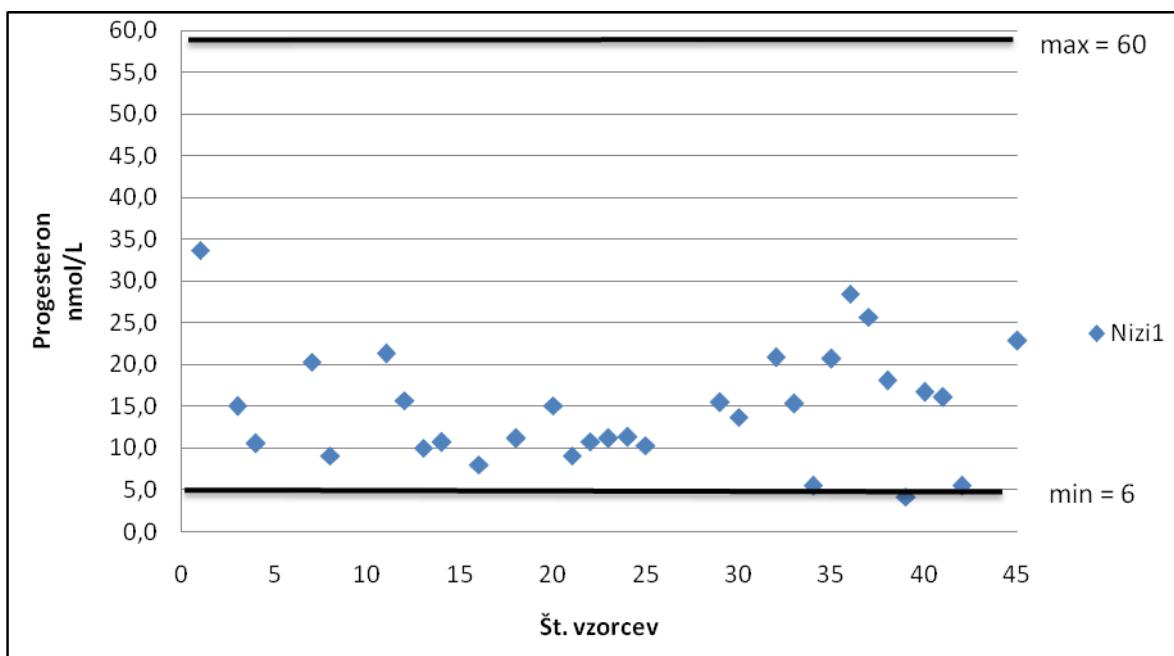
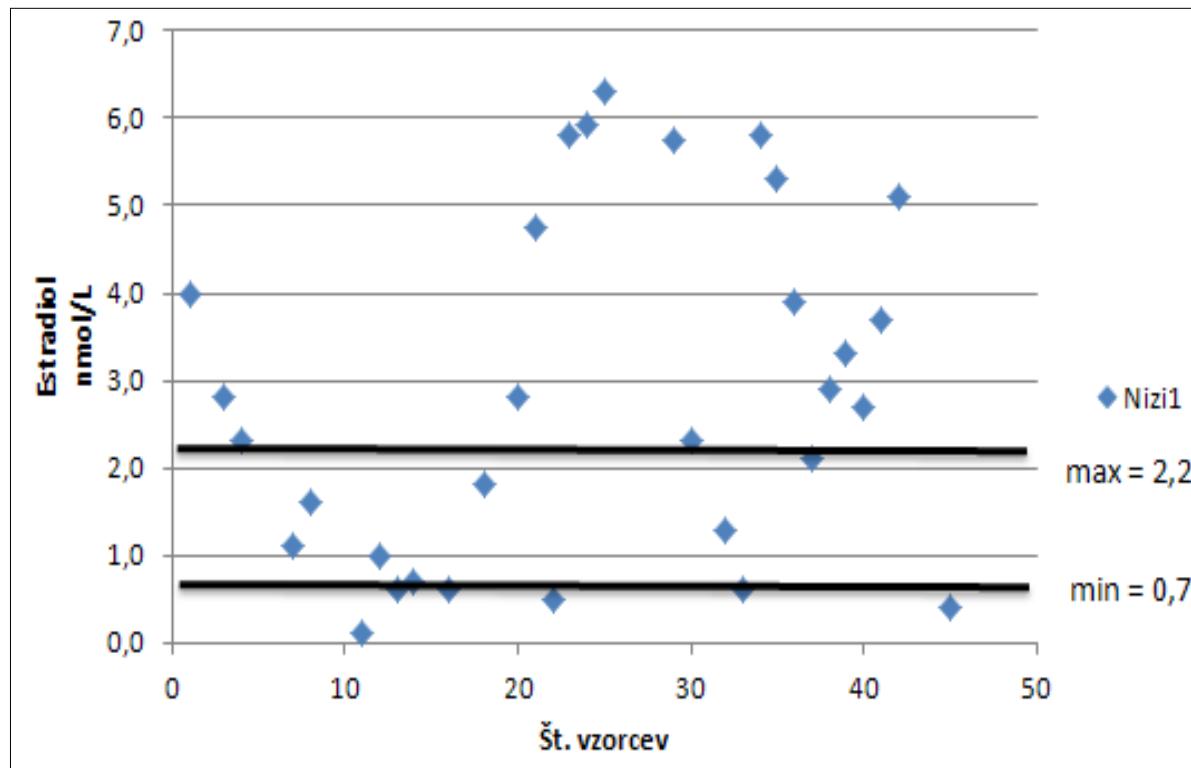
Sample 1		Sample 2	
Variable	Estra	Variable	Estra 2
Sample 2			
Sample size	48	31	
Lowest value	0,1100	0,1000	
Highest value	7,1700	6,3100	
Median	0,6850	2,7000	
95% CI for the median	0,5349 to 1,5480	1,4757 to 3,7829	
Interquartile range	0,4200 to 3,9150	1,0250 to 4,5625	
Average rank of first group	35,6042		
Average rank of second group	46,8065		
Mann-Whitney U	533,00		
Test statistic Z (corrected for ties)	2,119		
Two-tailed probability	P = 0,0341		

E) Vrednosti koncentracij hormonov v naravnem in spodbujenem postopku smo prikazali tudi grafično. Primerjava je predstavljena z diagramom tipa zabolj z ročaji. Osrednji kvadrat označuje povprečno vrednost, zabolj predstavlja povprečje \pm SD, ročaji pa 1,96-kratno vrednost maksimuma in minimuma.

Graf 1: Razporeditev koncentracij progesterona v naravnem in spodbujenem ciklusu**Graf 2:** Razporeditev koncentracij estradiola v naravnem in spodbujenem ciklusu

F) Vrednosti koncentracij hormonov v obeh postopkih smo prikazali tudi glede na referenčne vrednosti. Referenčna vrednost za progesteron, izmerjen v plazmi, je 6-60 nmol/L, vrednost za estradiol pa je 0.7-2.2 nmol/L.

Graf 3: Prikaz meritev progesterona v naravnem ciklusu glede na referenčno vrednost**Graf 4:** Prikaz meritev estradiola v naravnem ciklusu glede na referenčno vrednost

Graf 5: Prikaz meritev progesterona v spodbujenem ciklusu glede na referenčno vrednost**Graf 6:** Prikaz meritev estradiola v spodbujenem ciklusu glede na referenčno vrednost

5 RAZPRAVA

5.1 VREDNOSTI SERUMSKE KONCENTRACIJE PROGESTERONA IN ESTRADIOLA

Na podlagi vrednosti serumskih koncentracij dveh steroidnih hormonov v krvi smo med seboj primerjali dva različna postopka zunajtelesne oploditve. V ta namen smo analizirali rezultate meritev 48-ih serumskih vzorcev preiskovank v naravnem ciklusu in 31-ih serumskih vzorcev preiskovank v spodbujenem ciklusu.

Ugotovili smo naslednje značilnosti. Povprečna vrednost progesterona v naravnem ciklusu je bila 5.7 ± 5.5 nmol/L, najnižja izmerjena vrednost je bila 0.4 nmol/L, najvišja pa 19.5 nmol/L. Glede na referenčno območje, ki je za progesteron 6-60 nmol/L, je delež tistih, ki niso dosegli spodnje referenčne meje, 58.3 %. 41.7 % vzorcev je bilo v referenčnem območju.

Povprečna vrednost estradiola v naravnem ciklusu je bila 2.1 ± 2.3 nmol/L, najnižja izmerjena vrednost je bila 0.1 nmol/L, najvišja pa 7.2 nmol/L. Referenčno območje za estradiol je 0.7-2.2 nmol/L, kar potem pomeni, da 50,0 % vzorcev ni doseglo spodnje referenčne meje in 33.3 % vzorcev je preseglo zgornjo referenčno mejo. Delež tistih, ki so bili v referenčnem intervalu, je bil samo 16.7 %.

Izsledki naše raziskave kažejo, da so podatki primerljivi s tistimi iz literature. Belgija raziskava kaže na malenkost nižje vrednosti obeh hormonov v naravnem ciklusu, enako velja za še eno slovensko raziskavo (32, 33). Poudariti moramo, da nismo imeli na voljo vseh podatkov, ki bi bili lahko ključnega pomena za posamezne vrednosti hormonov. Podatki, ki so pri postopkih ZTO zelo pomembni, so starost preiskovanke, vzrok neplodnosti, telesna teža ali ITM in koncentracije drugih hormonov (FSH, LH).

Vrednosti hormonov v spodbujenem ciklusu so bile pričakovano višje. Povprečna vrednost progesterona je tako bila 14.9 ± 6.9 nmol/L. Najnižja vrednost je bila 4.2 nmol/L, najvišja pa 33.7 nmol/L. Pod spodnjo referenčno mejo 6 nmol/L so bili trije vzorci (9.8 %), nad zgornjo mejo 60 nmol/L pa ni bilo vzorcev (0 %).

Rezultati za estradiol so naslednji: povprečna vrednost je bila 2.8 ± 2.0 nmol/L, najnižja izmerjena vrednost je znašala 0.1 nmol/L, najvišja pa 6.3 nmol/L. 58.1 % vzorcev je bilo nad zgornjo referenčno mejo 2.2 nmol/L in 19.3 % vzorcev pod spodnjo referenčno mejo 0.7 nmol/L. V referenčnem območju je bilo 22.6 % vzorcev.

Na tem mestu je treba omeniti, da je prav koncentracija estradiola v krvi poleg ustreznega velikosti foliklov merilo za zrelost foliklov. Hormonsko spodbujanje jajčnikov z zdravili nadzorujemo z določanjem estradiola v krvi, prav tako pa je koncentracija estradiola pomembna tudi pri naravnem postopku. Seveda pa ima zelo pomembno mesto pri obeh postopkih tudi ultrazvočna preiskava.

V Sloveniji stroške naravnih ciklusov, ki jih spremljajo z ultrazvočnimi pregledi jajčnika in meritvami estradiola v serumu, krije zavarovalnica. Podobno je le še v Belgiji, kjer lahko pari namesto enega spodbujenega ciklusa izberejo tri naravne (24). Številne študije govorijo o tem, da imajo naravni ciklusi pomembno vlogo pri zdravljenju neplodnosti in zato nekateri strokovnjaki celo priporočajo najmanj tri naravne cikluse seveda z upoštevanjem določenih omejitev (34).

5.2 RAZLIKE MED NARAVNIMI IN SPODBUJENIMI CIKLUSI V SERUMSKI KONCENTRACIJI PROGESTERONA IN ESTRADIOLA

Glavni namen naše raziskave je bila primerjava vrednosti hormonov v naravnem in spodbujenem ciklusu. Izkazalo se je, da obstaja statistično značilna razlika med obema skupinama hormonov.

Pri analizi koncentracije progesterona smo ugotovili, da se je koncentracija po terapiji spodbujanja ovulacije statistično značilno povečala ($p<0.0001$). Povprečna vrednost progesterona v naravnem ciklusu je bila 5.7 nmol/L, v spodbujenem ciklusu pa je narasla na 14.9 nmol/L.

Enako kot pri analizi progesterona smo tudi po analizi rezultatov koncentracij estradiola ugotovili, da se je koncentracija estradiola po terapiji spodbujanja ovulacije statistično značilno povečala ($p=0.0341$). Povprečna vrednost estradiola je bila v naravnem ciklusu 2.1 nmol/L, v spodbujenem ciklusu pa je bila 2.8 nmol/L.

Koncentracija progesterona je v spodbujenem ciklusu 2.6-krat višja kot v naravnem ciklusu, razlika pa obstaja tudi v koncentraciji estradiola (ki je 1.3-krat višja). Podatki iz literature kažejo, da je faktor povišanja vrednosti obeh hormonov v spodbujenem ciklusu nekoliko večji (32, 33).

Zagotovo je povečanje koncentracije v spodbujenem ciklusu pričakovan rezultat, kar lahko razložimo z razvojem več foliklov. V naravnem ciklusu se razvije le en folikel oziroma ena

jajčna celica, v spodbujenem pa težimo k razvoju več foliklov, od katerih vsak prispeva k višji serumski koncentraciji steroidnih hormonov.

Pomembno je upoštevati tudi dejstvo, da preiskovanke različno reagirajo na spodbujanje ovulacije. Višje koncentracije steroidnih hormonov v krvi izmerimo pri preiskovankah z boljšim odzivom na spodbujanje, nižje pri tistih s slabšim odzivom. Stroka si tukaj ni enotna, saj študije govorijo o različnih kriterijih za zrelost folikla. Nekateri strokovnjaki so kriterij za zrelost folikla postavili pri višjih koncentracijah estradiola, drugi pa pri nižjih. V študiji na Ginekološki kliniki v Ljubljani so z upoštevanjem nižje mejne vrednosti estradiola (0.40 nmol/L) ugotovili, da se ob nezmanjšani uspešnosti postopkov izognemo prezgodnjemu LH vrhu in s tem relativno pogostim prekinjavam postopka zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu (35). Nasprotno pa so v neki drugi študiji ugotovili, da lahko višji delež zanositev na punkcijo pričakujemo pri višjih vrednostih estradiola (34).

Koncentracija steroidnih hormonov ima torej pri obeh obravnavanih postopkih zunajtelesne oploditve zelo pomembno vlogo, ki se je še bolj okrepila z vnovično oživitvijo naravnega postopka.

6 SKLEP

V raziskavi smo s primerjavo dveh različnih postopkov zunajtelesne oploditve glede na rezultate lahko potrdili našo postavljeno hipotezo. Ugotovili smo:

- **V naravnem postopku so vrednosti hormonov progesterona in estradiola nižje kot v spodbujenem postopku.**
- **Vrednost progesterona v spodbujenem postopku se v primerjavi z naravnim postopkom statistično značilno poveča.**
- **Vrednost estradiola v spodbujenem postopku se v primerjavi z naravnim postopkom statistično značilno poveča.**
- **Dopolnila metoda merjenja steroidnih hormonov je poleg ultrazvočne preiskave ključnega pomena pri ugotavljanju zrelosti foliklov.**

V primeru natančnejše analize bi potrebovali več osebnih podatkov o preiskovankah, podatke o uporabljenih protokolih spodbujanja, rezultate meritev dodatnih parametrov, ki so povezani s steroidnimi hormoni in v končni fazi tudi podatek o stopnji nosečnosti na ciklus. Na ta način bi še učinkoviteje ovrednotili primerjavo naravnega in spodbujenega postopka.

7 LITERATURA

1. Takač I: 50 let načrtovanja družine v Mariboru, Maribor, Univerzitetni klinični center Maribor, 2007: 179-187.
2. Klun-Virant I, Meden Vrtovec H, Tomaževič T: Od nastanka gamet do rojstva, Oploditev z biomedicinsko pomočjo, Založba Didakta, 2002: 45-66, 81-83, 97-116, 118-129, 188-191.
3. Šmuc T, Ribič-Pucelj M, Lanišnik-Rižner T: Molekularne osnove patogeneze endometrioze. Zdrav Vest 2008; 77: 515-518.
4. Kolenc M: Ginekologija, Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo, 1997: 60-63.
5. Vrtačnik Bokal E, Jančar E: Sodobne oblike zdravljenja neplodnosti, IV. spominski sestanek akad. prof. dr. Lidije Andolšek-Jeras, Slovensko društvo za reproduktivno medicino, 2007: 10-14, 74-78, 79-83.
6. Elsevier. Guyton&Hall: Textbook of Medical Physiology 11. izdaja. www.studentconsult.com. Dostopano 08-2011
7. Vlaisavljević V, Gavrić-Lovrec V, Reljić M, Kovač V, Kovačić B, Čižek-Sajko M: Program zunajtelesne oploditve v Mariboru v petletnem obdobju 1998-2002. Zdrav Vestn 2004; 73: 313-317.
8. Tomaževič T, Virant-Klun I, Vlaisavljević V, Kovačić B, Reš P, Reš Ž, Meden-Vrtovec H: The art programme in Slovenia-our place in Europe (Slovenia in EIM 2005 year report). Zdrav Vestn 2009; 78: I-53-5.
9. Drobnič S: Intrauterina inseminacija (IUI) in večplodna nosečnost. Zdrav Vest 2003; 72: II-77-8.
10. Borko E, Takač I: Ginekologija, Maribor, Univerza v Mariboru, 2006: 25-29, 122.
11. Goldberg M.J, Falcone T, Attaran M: In vitro fertilization update. Cleveland Clinical Journal of Medicine 2007; 74(5): 329-338.
12. Meden-Vrtovec H: Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji, Ljubljana, 2002: 45-50.
13. Meden-Vrtovec H s sodelavci: Neplodnost, Ljubljana, 1988: 120-129, 175-181, 295-299, 343-362.
14. Speroff L, Fritz M.A: Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 7. izdaja, Philadelphia, Williams & Wilkins, 2005: 25-59.
15. Pinter B: Spolni hormoni in njihovi biološki učinki. Med Razgledi 2001; 40: 415-421.

16. Klun-Virant I: Ta čudoviti zarodek, atlas spolnih celic in zarodkov v postopku zunajtelesne oploditve, 2004: 21.
17. Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Ljubljana, Littera picta, 2005: 878-880.
18. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, Ljubljana, Inštitut za patološko fiziologijo, 2002: 161-165.
19. Wikipedija. Slika: Menstrual Cycle. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:MenstrualCycle-sl.png>. Dostopano 08-2011
20. Wikipedija. Slika: Corpus Luteum. http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Human_Ovary_with_Fully_Developed_Corpus_Luteum.jpg. Dostopano 08-2011
21. Meden-Vrtovec H: Jubilejni zbornik ob 20-letnici rojstva prvih otrok, spočetih po postopku zunajtelesne oploditve na Ginekološki kliniki v Ljubljani, Ljubljana, Ginekološka klinika, 2004: 1-4, 7-15, 20-27, 35-38.
22. Edwards B: IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF – time for a rethink. Reprod Biomed Online 2007; 15(1): 106-119.
23. Bokal Vrtačnik E: Od konvencionalnih k zmernejšim oblikam spodbujanja jajčnikov v postopku zunajtelesne oploditve. Zdrav Vestn 2009; 78: I-69-73.
24. Vlaisavljević V: Pacientu prijazen postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo. Revija Isis 2009: 69-70.
25. American society for reproductive medicine. Slika: Ovarian follicles, stimulated by ovulation drugs, visible on ultrasound. http://www.sart.org/uploadedFiles/ASRM_Content/Resources/Patient_Resources/Fact_Sheets_and_Info_Booklets/ART.pdf. Dostopano 08-2011
26. Erickson GF, Danforth DR: Ovarian control of follicle development. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 736-47.
27. Macklon S. N, Stouffer L. R, Giudice C. L, Fauser C.J.M. B: The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. Endocrine Reviews 2005; 27(2): 170-207.
28. Berne R, Levy M: Principles of Physiology, 5.izdaja, Mosby, St.Louis, 2004: 834-849, 953-962.
29. Šmuc T: Uravnavanje delovanja estrogenov in progesterona pri endometriozni in raku endometrija. Doktorska disertacija, Ljubljana, 2009: 16-19.
30. Diasorin: LIAISON® Progesterone, Navodila za uporabo (Ref. 310420)
31. Diasorin: LIAISON® Estradiol, Navodila za uporabo (Ref. 310400)

32. Smitz J, Andersen A.N, Devroey P, Arce J.C: Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. *Human Reprod* 2007; 22(3): 676–687.
33. Jančar N, Virant Klun I, Osredkar J, Vrtačnik Bokal E: Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(5): 640-8.
34. Reljič M, Vlaisavljević V, Gavrić V, Kovačič B, Čižek-Sajko M, Kovač V: Postopki zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu. *Zdrav Vestn* 2002; 71: Supl. I: 19-23.
35. Tomaževič T, Korošec S, Drobnič S, Virant-Klun I, Veble A, Bačner-Kermavner L, Valentinčič-Gruden B, Meden-Vrtovec H: Koncentracije estradiola in uspešnost prenosa svežih in odmrznejnih zarodkov v naravnem ciklusu. *Zbornik / II. kongres ginekologov in porodničarjev Slovenije z mednarodno udeležbo, Ljubljana, Ginekološka klinika, 2000:* 239.