

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

SIMON GUZELJ

**DIPLOMSKA NALOGA
ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE**

**KLINIČNI POMEN SPOLNE HORMONE VEZOČEGA GLOBULINA
(SHBG) IN TESTOSTERONA V SERUMU PRI ŽENSKAH S
POLICISTIČNIM OVARIJEM**

**CLINICAL IMPORTANCE OF SEX HORMONE-BINDING GLOBULIN
(SHBG) AND TESTOSTERONE IN SERUM OF WOMEN WITH
POLYCYSTIC OVARY SYNDROME**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljal 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 in s strokovnim pristopom ter dobrim nasvetom pomagal pri nastanku diplomske naloge.

Hvala sošolkama Tadeji Gojkovič in Moniki Kumperščak za prijateljstvo in pomoč v najtežjih obdobjih študija.

Hvala tudi staršem in vsem ostalim, ki so mi omogočili nadaljevanje življenjske poti, ki sem si jo izbral.

Izjava

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

Simon Guzelj

Ljubljana, junij 2013

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. SINDROM POLICISTIČNIH OVARIJEV.....	1
1.2. VZROKI.....	1
1.3. SLADKORNA BOLEZEN TIP 2	3
1.4. DIAGNOSTIKA.....	4
1.5. ZDRAVLJENJE	5
1.6. ENDOKRINI SISTEM.....	6
1.6.1. Hipotalamus	7
1.6.2. Hipofiza.....	8
1.6.3. Gonadotropini.....	8
1.6.4. Nadledvični žlezi.....	9
1.6.4.1. Sredica.....	9
1.6.4.2. Skorja	9
1.6.5. Ovariji.....	11
1.6.5.1. Folikli	11
1.6.5.2. Fiziologija ovarija	12
1.6.5.3. Menstrualni cikel	13
1.6.6. Androgeni.....	14
1.6.6.1. Funkcija.....	15
1.6.6.2. Delovanje	15
1.6.6.3. Sinteza.....	16
1.6.6.4. Izločanje.....	16
1.7. TESTOSTERON	16
1.8. SHBG.....	17
2. NAMEN DELA	19
2.1. NAMEN.....	19

2.2.	HIPOTEZA.....	19
3.	MATERIALI IN METODE.....	20
3.1.	VZORCI	20
3.2.	TESTOSTERON	20
3.2.1.	Reagenti in material	20
3.2.2.	Vzorci	21
3.2.3.	Umerjanje aparature	21
3.2.4.	Postopek testa.....	21
3.2.5.	Rezultati	22
3.2.6.	Specifične karakteristike naprave Gamma Counter Wallac Wizard	22
3.3.	SHBG.....	26
3.3.1.	Princip metode.....	26
3.3.2.	Reagenti in material	26
3.3.3.	Vzorci	27
3.3.4.	Umerjanje aparature	27
3.3.5.	Postopek testa.....	27
3.3.6.	Rezultati	28
3.3.7.	Specifične karakteristike analizatorja IMMULITE.....	28
3.4.	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV.....	31
3.4.1.	Testiranje normalnosti porazdelitve	32
3.4.2.	Testiranje statistično značilnih razlik.....	32
3.4.3.	Specifičnost in občutljivost	32
3.4.3.1.	Opredelitev rezultatov preiskav	33
3.4.3.2.	Izračun.....	34
4.	REZULTATI.....	35
4.1.	OVREDNOTENJE SKUPIN	35
4.2.	REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PODATKOV.....	37

5. RAZPRAVA	42
5.1. KONCENTRACIJE TESTOSTERONA IN SHBG.....	42
5.2. PRIMERJAVA MED KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO BOLNIC.....	43
5.3. SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST POSAMEZNEGA TESTA TER KOMBINACIJE TESTOV	43
6. SKLEP	44
7. LITERATURA.....	45

SEZNAM SLIK

Slika 1: Glavne presnovne poti steroidnih hormonov	10
Slika 2: Zorilni proces foliklov v jajčnikih	12
Slika 3: Menstruacijski cikel na osnovi 28 dnevnega ritma.....	14
Slika 4: Humani spolne hormone vezoči glikoprotein oz. SHBG.....	17

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Porazdelitev merjenih vrednosti testosterona obolelih preiskovank z intervalom referenčnih vrednosti.....	35
Graf 2: Porazdelitev merjenih vrednosti SHBG obolelih preiskovank z intervalom referenčnih vrednosti	35
Graf 3: Porazdelitev merjenih vrednosti testosterona kontrolne skupine z intervalom referenčnih vrednosti.....	36
Graf 4: Porazdelitev merjenih vrednosti SHBG kontrolne skupine z intervalom referenčnih vrednosti	36
Graf 5: Porazdelitev meritev testosterona za kontrolno skupino (testosteron1) in skupino bolnic (testosteron2).....	39
Graf 6: Porazdelitev meritev SHBG za kontrolno skupino (SHBG1) in skupino bolnic (SHBG2).....	39

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Osnovna statistična analiza starosti preiskovank	20
Tabela 2: Izsledki meritev vzorcev za določitev ponovljivosti.....	23
Tabela 3: Izsledki meritev vzorcev za določitev obnovljivosti.....	23
Tabela 4: Izsledki meritev preizkusa redčenja	24
Tabela 5: Izsledki meritev "recovery" preizkusa	24
Tabela 6: Izsledki meritev vzorcev za določitev specifičnosti.....	25

Tabela 7: Izsledki meritev vzorcev za določitev ponovljivosti.....	29
Tabela 8: Izsledki meritev vzorcev za določitev obnovljivosti.....	29
Tabela 9: Izsledki meritev preizkusa redčenja	30
Tabela 10: Izsledki meritev "recovery" preizkusa	30
Tabela 11: Izsledki meritev vzorcev za določitev specifičnosti.....	31
Tabela 12: Opredelitev izidov testa.....	33
Tabela 13: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev testosterona kontrolne skupine.....	37
Tabela 14: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev testosterona skupine bolnic	37
Tabela 15: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev SHBG kontrolne skupine	38
Tabela 16: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev SHBG skupine bolnic.....	38
Tabela 17: Izsledki T-testa dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni distribuciji za testosteron.....	39
Tabela 18: Izsledki T-testa dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni distribuciji za SHBG	40
Tabela 19: Izsledki izračuna specifičnosti in občutljivosti	41
Tabela 20: Primerjava parametrov med testi.....	41

POVZETEK

Pogosta težava žensk v rodni dobi so motnje menstrualnega cikla, ki imajo lahko številne vzroke in tudi kronične zaplete. Eden izmed vzrokov porasta motenj je moderen način življenja v zahodnem svetu. Sindrom policističnih jajčnikov izstopa med motnjami hormonskega ravnotežja z njegovo heterogeno simptomatiko, katera je tudi povezana s sladkorno boleznijo tip 2. Za obolenje so značilne motnje funkcij jajčnikov in androgene spremembe. Pogosto se pojavlja oligomenoreja ali amenoreja ter akne, hirsutizem in alopecija.

Natančna diagnostika je otežena ter pretežno temelji na izključitvi drugih vzrokov, zato smo se odločili, da bi v diplomski nalogi primerjali, kako se koncentracije SHBG in testosterona ujemajo z bolezenskim stanjem.

Na osnovi pridobljenih serumskih koncentracij smo preverili, ali obstajajo statistično značilne razlike med kontrolno skupino in skupino bolnic, ter kakšno specifičnost in občutljivost lahko dosežemo s posameznim testom ali kombinacijo obeh. V kontrolno skupino smo vključili 54 domnevno zdravih preiskovank, v skupino s potrjeno diagnozo policističnih ovarijev pa 9 preiskovank. Z uporabo kemiluminiscenčne in radioimunološke metode smo pridobili koncentracije testosterona in SHBG za obe skupini. Statistična analiza nam je pokazala, da so vrednosti testosterona nižje in vrednosti SHBG višje v kontrolni skupini. V primeru testosterona smo izračunali povprečno koncentracijo 1,9 nmol/L za kontrolno skupino in 3,1 nmol/L za skupino bolnic. Za meritve SHBG smo izračunali, da je povprečna vrednost za kontrolno skupino 57 nmol/L in za skupino bolnic 31 nmol/L. Računsko smo tudi dokazali, da obstajajo statistično značilne razlike med meritvami parametrov obeh skupin. Izračun specifičnosti in občutljivosti posamičnih parametrov ter kombinacije je pokazal, da je za odkrivanje bolezni najnatančnejša kombinirana metoda obeh parametrov.

KLJUČNE BESEDE: PCOS, PCO, SHBG, tetosteron, sladkorna bolezen, diabetes, oligomenoreja, amenoreja, hirsutizem.

ABSTRACT

Within the reproductive period of women menstrual disorders are a common issue, as they have many causes and can lead to serious complications. One of the major influences that caused an increase of incidence is the modern western lifestyle.

Polycystic ovary syndrome stands out of the large group of endocrine disorders with a wide range of symptoms and close links to type 2 diabetes mellitus. Symptoms like oligomenorrhea or amenorrhea are commonly present and can often be accompanied by acne, hirsutism and alopecia.

PCOS as a vague diagnosis relies on exclusion of other causes, that's why we decided to compare how serum concentrations of SHBG and testosterone correlate with the disease.

On the basis of the gathered serum concentrations we tested if there is any significant statistical difference between the control group and the patient group, we also calculated the sensitivity and specificity for both individual test methods and their combination.

In the control group we included 54 apparently healthy subjects, in the patient group with the confirmed of PCOS we included 9 subjects. With the use of a chemiluminescent and radioimmunoassay we obtained the serum concentrations of testosterone and SHBG of both groups. The statistical analysis has shown us that the testosterone levels are lower and levels of SHBG higher in the control group. For testosterone we calculated an average concentration of 1,9 nmol/L for the control group and a concentration of 3,1 nmol/L for the patient group. The calculated average of SHBG in the control group was 57 nmol/L and 31 nmol/L in the patient group. We also have mathematically proven that there are significant statistical differences between the results of the two groups. The calculation of sensitivity and specificity for the individual method and the combination of both, has shown us that the combination of both methods has the highest predictive value.

KEY WORDS : PCOS, PCO, SHBG, testosterone, diabetes, hirsutism, oligomenorrhea, amenorrhea.

SEZNAM OKRAJŠAV

OKRAJŠAVA	POMEN
ACTH	Adenokortikotropni hormon
CLIA	Kemiluminiscenčna imunološka metoda
CRH	Kortikotropin sproščujoči hormon
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHEAS	Dehidroepiandrosteron sulfat
DHT	Dihidrotestosteron
EGF	Epidermalni rastni faktor
FSH	Folikle stimulirajoči hormon
GnRH	Gonadotropin sproščujoči hormon
IGF	Inzulinu podoben rastni faktor
LH	Luteinizirajoč hormon
MSH	Melanocyte stimulirajoči hormon
OGTT	Oralni glukozno tolerančni test
PCO	Policistični ovariji
PCOS	Sindrom policističnih ovarijev
PRL	Prolactin
RIA	Radiološko imunološka metoda
SHBG	Spolne hormone vezoč globulin
T	Totalna aktivnost
TGF	Transformirajoči rastni faktor
TRH	Tireotropin sproščujoči hormon

1. UVOD

1.1. SINDROM POLICISTIČNIH OVARIJEV

Definicija

Splošno je sindrom policističnih ovarijev (PCOS) oz. Stein-Leventhal-ov sindrom stanje, za katero je značilen nastanek cist v ovarijih, visoka raven androgenov, kronične oligo oz. anovulacije in druge metabolne motnje. Pogosto se pojavlja debelost, hirsutizem, akne in neplodnost. (1, 2)

PCOS prizadene 15-22 % žensk v rodni dobi. Njen glavni vzrok je genetska predispozicija, katera še ni povsem raziskana. Povod je pogosto inzulinska rezistenca tkiv, ki jo spremljajo kompenzatorno zvišane vrednosti inzulina. Izpostavljenost organizma hiperinzulinemiji povzroča razne spremembe tkiv, med katerimi so tudi jajčniki. Stanja, ki so zelo podobna, lahko nastopijo ob nastanku endokrinih tumorjev ali na osnovi hipotalamičnih vzrokov. (1, 2, 3)

Družbeno ozadje

Kot sladkorna bolezen, PCOS izstopa v zahodnem svetu, kjer je tveganje mnogo višje. V času modernizacije se spremenjen način življenja pogosto odraža na incidenci določenih bolezenskih stanj, PCOS ni izjema. Povezava s sladkorno boleznijo tip 2, gestacijskim diabetesom ter PCOS je znana. Novejše študije odkrivajo čedalje nove faktorje, ki vplivajo na razvoj, vendar je osrednja dogma ostala enaka. (2, 3, 4)

1.2. VZROKI

Hipotalamus

Reproduktivna funkcija je odvisna od gonadotropin sproščujočega hormona (GnRH). Signal za njegovo sproščanje je ustaljen v ritmu od 26 do 34 dni. Moteno hormonsko ravnotežje z visokimi koncentracijami androgenov, kortikotropinov ali inzulina vplivajo na ritem in način izločanja GnRH. (1, 5)

Inhibicija GnRH je lahko posledica kortikotropin sproščujočega hormona (CRH) in kortizola, katerih aktivnost je zvišana ob ekstenzivnih stresnih stanjih. Izboljšanje stanja se doseže že z eliminacijo stresa. (1)

Inzulin v osnovi prikazuje izobilje, v katerem je reproduktivna funkcija možna, saj je indikator vnosa sladkorjev. Kot odziv se aktivnost GnRH-pulza poveča, zato je kot posledica povečano izločanje gonadotropinov, ki stimulirajo delovanje ovarijev.

Androgeno delovanje je sicer vedno prisotno v centralnem živčnem sistemu, vendar lahko povišane vrednosti privedejo do spremembe ženskega ritmičnega tipa v moški tip enakomernega izločanja. (1, 6)

Vse motnje na nivoju hipotalamusa vplivajo na celotno kaskado, ki sega od hipofize do ovarijev. Če pravilen razvoj foliklov ni zagotovljen, prihaja do patogenih sprememb, ki so neizogibne brez primerne terapije. (1, 5)

Hiperinzulinemija

Zaradi androgenov ter hormonov adipoznega tkiva nastaja rezistenca do inzulina, glukoza v krvi se zviša in kompenzatorno nastopi hiperinzulinemija. Zaradi dolgotrajne izpostavljenosti inzulinu prihaja do patofizioloških sprememb raznih tkiv in motenj v metabolizmu. Med faktorji, ki vplivajo na razvoj policističnih ovarijev (PCO), je v zadnjem času prav ta najodmevnejši, saj se obravnava kot ključna težava. Osrednjo vlogo igrajo mutacije, ki omogočajo patogenezo v okolju z visoko koncentracijo inzulina. Stanje inzulinske rezistence se vedno pogosteje povezuje z mutacijami gena za spolne hormone vezoč globulin (SHBG), katerega vrednosti naraščajo in padajo obratno sorazmerno s koncentracijo inzulina. (1, 6, 7)

Folikli

Razvoj foliklov v jajčnikih je proces, ki je občutljiv na različne vplive, kot so npr. metabolne motnje ali spremembe v hormonskem ravnotežju. (1)

Folikli v jajčnikih zorijo do velikosti 9 mm pod vplivom folikle stimulirajočega hormona (FSH), nato se pričnejo odzivati na luteinizirajoči hormon (LH). Nadaljuje se zorenje in razvoj jajčeca. Ob ovulaciji se jajčece sprosti in folikel se pretvori v rumeno telesce, ki je sestavljeno iz teka celic in granuloznih celic. Teka celice proizvajajo androstendion, ki se pretvarja v granuloznih celicah v estron in estradiol. Ob koncu ovulacije rumeno telesce razpade zaradi izostanka LH, kar pomeni, da teka in granulozne celice propadejo. (1, 5, 8)

V primeru PCOS se folikli zaradi vpliva inzulina pričnejo odzivati na LH mnogo prej, zato prihaja do napake v razvoju. Zaradi spremembe steče apoptoza granuloznih celic, vendar teka celice ostanejo kot cista. Posledica je izostanek menstruacije in cista, ki izloča estrogene ter androgene. (1, 2)

Androgeni

Najpogostejši vzrok za hirsutizem so povečane koncentracije androgenov, ki večinoma izhajajo iz hipeprodukcije nadledvičnih žlez ali jajčnikov. Redko so povišani zaradi endokrinih tumorjev. Kožne spremembe, kot je poraščenost, so le začetek virilizacije, ki nastopi ob dolgotrajni izpostavitvi. Možne so spremembe izločanja gonadotropinov izven mesečnega ritma na moški tip. Spremembe v stimulaciji foliklov močno modulirajo razvoj, prihaja do nastanka cist in zadebeljenja endometrija. Supresija estrogenov lahko zaradi izostanka njihove zaščite poveča tveganje srčno žilnih obolenj. Večja razpoložljivost testosterona vpliva na organizem podobno progestagenom med nosečnostjo ter kortizolu ob stresnih stanjih. Z blokado vezave inzulina se razpoložljiva glukoza v krvi poveča. Že prisotna motnja v presnovi glukoze se na ta način lahko dodatno poslabša. Androgene spremembe niso nujno prisotne, saj je odzivnost odvisna predvsem od genetske predispozicije. (2, 7, 9)

Telesna teža

40% žensk s potrjeno diagnozo PCOS ima prekomerno telesno težo, zato se kot faktor tveganja pogosto omenja. Nekatere raziskave nakazujejo, da znižanje telesne teže za 5% in zmerna fizična aktivnost lahko povrne redne menstruacije in zviša možnost zanositve. Za pacientke z androgenimi težavami je značilno, da se telesna masa ne kopiči na bokih, ampak okrog pasu, zato bi bila uporaba razmerja med obsegom pasu in bokov primernejša kot indeks telesne mase, ki je trenutno v uporabi. Inzulinska rezistenca se pojavlja neodvisno od telesne mase, zato ni mogoče sklepati samo na tej osnovi. (1, 2, 10)

1.3. SLADKORNA BOLEZEN TIP 2

V osnovi je motnja v presnovi glukoze, kjer zaradi pomanjkanja učinkov inzulina ali njegovega izostanka prihaja do kopičenja glukoze v krvi. Vzrok bolezni ni popolnoma pojasnjen, vendar je genetska podlaga dokazana. Dandanes je sladkorna bolezen v porastu širom sveta zaradi slabih prehranjevalnih navad in načina življenja. Vse mlajši obolevajo za sladkorno boleznijo tip 2, ki smo jo predvsem poznali kot starostno sladkorno bolezen.

Ženske, pri katerih se je pojavila nosečnostna sladkorna bolezen, kasneje pogosteje obolijo za sladkorno boleznijo tip 2. Mnogokrat lahko opazimo, da je sladkorni boleznijo pridružena arterijska hipertenzija in hiperlipoproteinemija. (1, 7, 11)

Nastopi lahko tudi ob izrednih stresnih stanjih ali endokrinih tumorjih, kjer kortizol deluje diabetogeno, nosečnosti zaradi visoke ravni progesteronov in androgenih motnjah. Hormoni adipoznih tkiv lahko prav tako vplivajo kot diabetogeni faktorji. Težava nastopi, saj se adipozna tkiva razgrajujejo samo ob nizkem nivoju inzulina, zato je pogosto, da se telesna masa hitro pridobi, a le težko izgubi. (3, 4, 7)

Veliko število žensk, pri katerih je potrjena diagnoza PCO, ima sladkorno bolezen tip 2 ali se njihove vrednosti gibljejo v območju mejne bazalne glikemije. Pred razvojem boleznijo lahko pogosto opazimo kožne spremembe, ki kažejo na inzulinsko rezistenco. Najpogosteje je opazna hiperpigmentacija na členkih rok, pazduhah in vratu. Mnogo primerov se lahko odkrije še v stanju mejne bazalne glikemije in pravočasno sprejme ukrepe. Inzulinska rezistenca s časom napreduje in beta celice ne dohajajo več potreb po inzulinu. (1, 2, 7)

Diagnozo sladkorna bolezen se lahko postavi takoj, če so prisotni klinični znaki in glukoza v naključnem krvnem vzorcu 11 mmol/l ali več. Diagnostična je prav tako vrednost glukoze na tešče, če je 7 mmol/l ali več. V primeru, da je vrednost na tešče med 6 in 7 mmol/l, je potrebno opraviti oralni glukozno tolerančni test (OGTT). (7)

1.4. DIAGNOSTIKA

Zaradi številčnosti patofizioloških faktorjev je težko vzpostaviti diagnostični kriterij, ki bi zagotovil prepoznavo boleznijo. (1, 2, 12)

Diagnozo PCOS se je definiralo na podlagi dveh kriterijev.

- Rotterdamski kriterij kjer sta potrebna dva ali trije faktorji:
 - oligo ali anovulacije
 - prisotni učinki androgenov ali zvišana raven androgenov
 - policistični ovariji na ultrazvoku
 - izključitev endokrinih tumorjev ali hipotalamičnih vzrokov (1, 12)

- "National Institutes of Health (NIH)" kriterij za katerega so potrebni vsi faktorji:

- oligoovulacije
- prisotni učinki androgenov ali povišana raven androgenov
- izključitev endokrinih tumorjev ali hipotalamičnih vzrokov (1, 12)

Kriteriji so sicer podani, vendar je potrebno upoštevati še mnogo faktorjev pred postavitvijo diagnoze. (1, 12)

1.5. ZDRAVLJENJE

Osnovni cilji zdravljenja so:

- vzpostavitev menstrualnega cikla
- zaustavitev virilizacije
- izboljšanje glukoze tolerance
- preprečitev dolgotrajnih posledic (1, 2)

Osnovna terapija za PCO so bili peroralni kontraceptivi, saj hitro vzpostavijo redni menstrualni cikel in učinkovito zmanjšujejo količino androgenov proizvedenih v jajčnikih. Androgeni adrenalnega izvora se naprej izločajo nemoteno. Učinkovito se preprečuje nastanek endometrioze, saj so redni menstrualni cikli zagotovljeni. (1, 2)

Težave ob jemanju peroralne kontracepcije so predvsem neželeni učinki, kot so na primer pridobivanje telesne mase, nastajanje strdkov in slabša glukoza tolerance, zato je uporaba varna samo pod nadzorom. (1, 2, 13)

Zmerna fizična aktivnost je učinkovit način terapije za zmanjšanje telesne teže in izboljšanje glukoze tolerance. Padeč vrednosti inzulina pripomore k vzpostavitvi menstrualne funkcije. V primeru, da se izvajajo redni prenaporni treningi, pa prav tako lahko izostane reproduktivna funkcija kot reakcija na potrebe ostalega organizma. (1, 2, 7)

V primeru hiperinzulinemije se najpogosteje uporabljajo peroralni antidiabetiki, kot je metformin. Namen je zmanjšati potrebno količino inzulina z izboljšanjem občutljivosti tkiv do njegovega učinka. Znižane vrednosti inzulina in glukoze v krvi izboljšajo hormonsko ravnotežje počasneje kot peroralni kontraceptivi, vendar je dolgoročno boljša strategija. Za

hitrejši učinek se lahko za dopolnitev uporablja še fizična aktivnost ter anti-androgena zdravila. (1, 2, 7)

Kot dopolnilno terapijo za ustavitev vpliva androgenov se lahko uporabijo anti-androgeni, ki so zelo učinkoviti pri izboljšanju kožnih sprememb. Delovanje se osredotoča predvsem na blokado učinkov ali inhibicijo konverzije v dihidrotestosteron (DHT). (1, 13)

V skrajnih primerih, kjer nastopajo težave z zanositvijo in so policistični jajčniki vidni na ultrazvoku, se lahko opravi laparoskopski poseg. Med posegom se obolele predele jajčnikov temeljito pregleda ter odstrani obolelo tkivo s pomočjo laserja. Pogosto se reproduktivna funkcija po posegu ponovno vzpostavi. (1, 2)

1.6. ENDOKRINI SISTEM

Za usklajeno delovanje celotnega organizma je potrebna komunikacija. V ta namen sta se razvila endokrini in živčni sistem. Njuno delovanje je usklajeno in se med seboj dopolnjuje. Oba sistema delujeta na osnovi signalnih molekul, ki posredujejo sporočilo, v primeru živčnega sistema so to nevrottransmitorji, v primeru endokrinega sistema pa hormoni. (7, 8, 9)

Ločimo več različnih načinov izločanja, transporta in sprejemanja hormonov:

- endokrino, iz žleze po krvi v oddaljen predel
- nevrokrino, po aksonu živčne celice in potem po krvi
- parakrino, do sosednjih celic različnega tipa
- avtokrino, sama sekretorna celica izloči in sprejme signal. (7, 8, 9)

Da se signal sprejme in sproži učinek na tarčnih celicah, so potrebni receptorji. Receptorske molekule so bodisi v celicah ali na celični membrani in vežejo le točno določen hormon ali njemu sorodne molekule. (7, 8, 9)

Večina hormonov signal prenese na celice s pomočjo z G-protein povezanimi receptorji. Receptorji sprejmejo signal in s kaskado reakcij vplivajo na metabolne procese. Potrebni so predvsem za peptidne hormone, ki ne prehajajo skozi celično membrano. (5, 7, 10)

Steroidni hormoni lahko prehajajo skozi plazemsko membrano brez prenašalnih molekul. Vežejo se na mobilne receptorje v citosolu. Nastali kompleks hormon receptor vstopi v jedro,

kjer deluje kot transkripcijski faktor. Aktivirajo se geni za prepis specifičnih proteinov. Nastali specifični proteini se vključijo v celici bodisi kot encimi ali kot strukturni proteini. Način delovanja steroidov je počasen, a traja dalj časa v primerjavi z drugimi hormoni. (3, 6, 10)

1.6.1. Hipotalamus

Centralno vlogo nadzora življenjskih funkcij prevzema hipotalamus. Bistvena naloga je posredovanje med vegetativnim živčevjem in hormonskim sistemom. Nahaja se tik nad možganskim deblom ter tik pod talamusom med obema možganskima polovicama. (8, 9)

Z povezavo živčnega in endokrinega sistema nadzira sedem vitalnih funkcij:

- ravnotežje energije
- ravnotežje tekočin
- regulacija temperature
- aktivnost in spanje
- cirkulacija in dihanje
- rast in odraščanje
- reprodukcija. (6, 9)

Skupaj z odzivom na spremembe teče uravnavanje po ritmih, kateri so bodisi cirkadialni ali kot menstrualni cikel infradialni. Samo razporejanje funkcij je odvisno od njihove pomembnosti. (6, 9)

Komunikacija steče kot nevrokrini signal, ki služi kaskadi sproščanja hormonov iz endokrinih celic ali direktno vpliva na metabolne procese tarčnih tkiv. (5, 6, 9)

Nadzor se izvaja z izločanjem neuropeptidov iz aksonov supraoptičnega ter paraventricularnega jedra, ki tvorita zadnji režanj hipofize ali z izločanjem hipotalamusa v hipotalamično-hipofizni obtok. Portalni obtok nam predstavlja povezavo med hipotalamusom in prednjim režnjem hipofize. (6, 9)

V portalni obtok se izločajo:

- TRH (tireotropin sproščujoči hormon)

- CRH (kortikotropin sproščujoči hormon)
- GnRH (gonadotropin sproščujoči hormon)
- GHRH (rastni-hormon sproščujoči hormon). (6, 9)

Za sproščanje in sintezo GnRH je najpomembnejše suprasiazmično jedro, ki je tudi eden izmed telesnih ritmandov. Sproščanje je vezano na nevrottransmitterje serotonin, melatonin in endogene opiate. Procesi, po katerih se izločanje GnRH krmili, niso popolnoma pojasnjeni. Znano je, da nam razpoložljivost z energijo in posledično zvišan inzulin omogočata reproduktivno funkcijo ter s tem povečano izločanje GnRH. V nasprotnem primeru, kjer primanjkuje energije ali se izraža stres s CRH, se izločanje GnRH ustavi. (6)

1.6.2. Hipofiza

Hipofiza je za grah velika žleza, ki se nahaja pod hipotalamusom. Zadnji reženj je pretežno sestavljen iz nevronov, kateri izhajajo iz hipotalamusa, prednji reženj sestavlja preplet kapilar in celic z endokrinim izločanjem. (6, 8, 9)

V nevronih zadnjega režnja se tvorita oksitocin ter ADH (antidiuretični hormon) pod direktnim vplivom hipotalamusa. (6, 8)

Prednji reženj je predvsem sestavljen iz endokrinih celic, katerih aktivnost uravnavajo nevrohormoni, ki so dostopni iz portalnega obtoka. Tvorijo se ščitnico stimulirajoči hormon (TSH), adenokortikotropni hormon (ACTH), FSH, LH, prolaktin (PRL), somatotropin (rastni hormon) in melanocyte stimulirajoči hormon (MSH). (6, 8, 9)

Vsak hipofizni hormon, razen gonadotropinov, ima inhibirajoči in stimulirajoči dejavnik. (6)

1.6.3. Gonadotropini

Glikoproteina LH in FSH nastajata in se skladiščita v gonadotropnih celicah adenohipofize. Naloga je usmerjanje procesov v ovarijih. Z vezavo na receptorje se usmerja zorenje foliklov, ovulacija, tvorjenje rumenega telesca in funkcija rumenega telesca. Izločanje je popolnoma odvisno od stimulacije z GnRH. (1, 5, 6)

FSH igra veliko vlogo v zgodnji fazi zorenja foliklov. Spodbuja razrast granuloznih celic, nastajanje steroidov, nastanek LH in FSH receptorjev ter vpliva na način delovanja lokalnih dejavnikov. Na sproščanje FSH ne vpliva samo hipotalamus ampak tudi inhibini in aktivini, ki se tvorijo v celicah granuloze. (1, 5, 14)

V kasnejših fazah razvoja foliklov se poveča sproščanje LH, ki pospešuje steroidogenezo celic teke, uravnava izločanje androgenov ter presnovo androgenov v estrogene in progestagene v granuloznih celicah. LH sproži ovulacijo in je potreben za vzdrževanje rumenega telesca. (1, 14)

PRL je evlucijsko zelo star hormon, ki ima širok spekter delovanja. Eno izmed centralnih vlog prevzema pri razmnoževanju z mamogenezo in laktogenezo. Tvori se v sprednjem režnju hipofize, vendar nastaja tudi v drugih tkivih, kot npr. v placenti ter endometriju. (5, 14)

1.6.4. Nadledvični žlezi

Nahajata se nad ledvicami obdani s kapsulo iz maščobnega tkiva in sta sestavljeni iz dveh funkcionalnih enot. Sredica sintetizira kateholamine kot dopolnitev simpatika, v skorji poteka predvsem sinteza steroidov pod vplivom hormonov hipofize. (6, 15)

1.6.4.1. Sredica

Sredica je glavni vir cirkulirajočih kateholaminov. Pretežno se sintetizira adrenalin, v manjši meri noradrenalin in dopamin. Sinteza je deloma odvisna od kortizola iz skorje, sproščanje poteka odvisno od nevrlnih signalov. (6, 8)

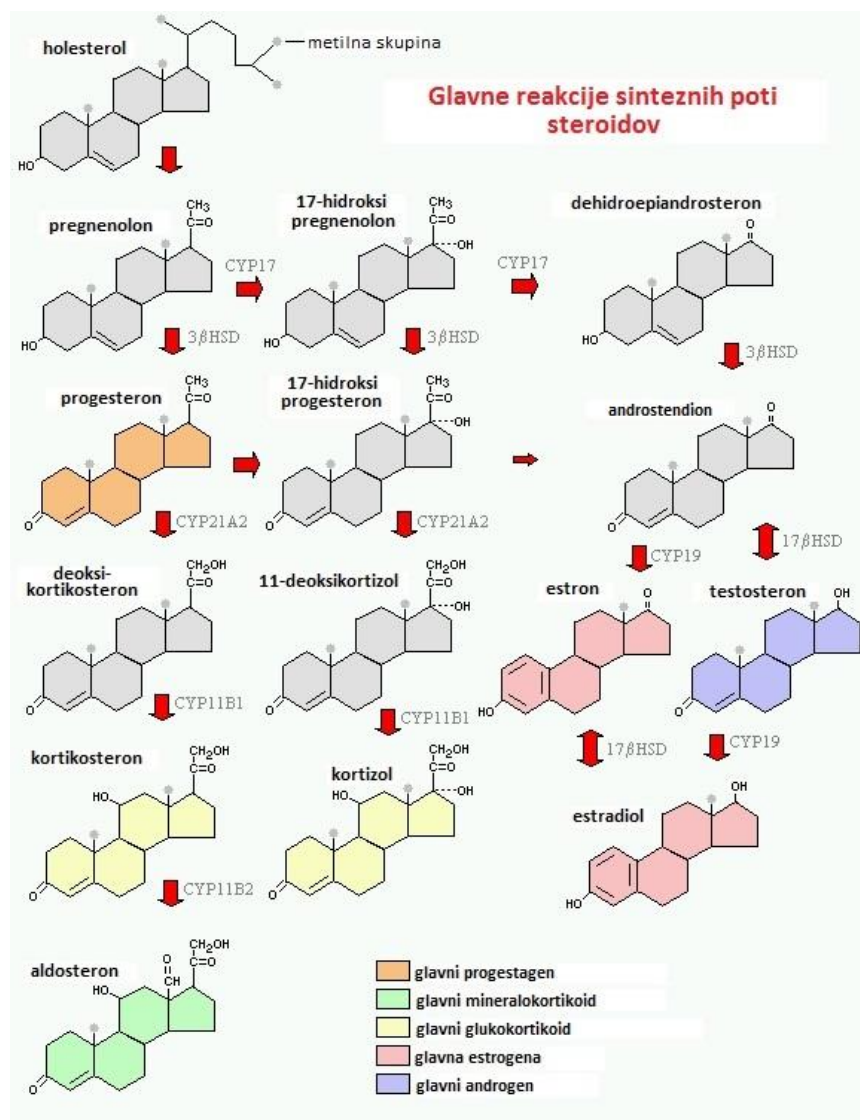
1.6.4.2. Skorja

Skorja je vir kortikosteroidov, ki uravnavajo ravnotežje tekočin, energije in omogočajo odziv na stres. Sočasno s kortikosteroidi se sintetizirajo tudi androgeni, kateri so do adolescence primarni androgeni v organizmu. V celotni skorji poteka sinteza pregnenolona iz holesterola (slika št. 1), ki služi kot osnova za nadaljnjo biosintezo steroidnih hormonov. (6, 15, 16)

Skorjo delimo na tri plasti, kjer je vsaka posvečena svoji skupini hormonov:

- Zona glomerulosa (zunanja plast) je vir mineralokortikoidov, katerih glavni predstavnik je aldosteron. Izločanje regulira angiotenzin II in delno ACTH. (6, 15)

- Zona fasciculata (srednja plast) je posvečena sintezi glukokortikoidov. Najpomembnejši je kortizol, ki je odvisen od hipofiznega ACTH. (6, 15)
- Zona reticularis (notranja plast) je glavni vir androgenov pri obeh spolih v času pred puberteto in glavni vir androgenov pri odraslih ženskah. Največji delež sintetiziranih androgenov predstavljata dehidroepiandrosteron in androstedion. Primarno je izločanje odvisno od ACTH in je pogosto sinhronizirano s cirkadialnim ritmom kortizola. Le majhen del sproščenih androgenov je v prosti obliki in biološko aktivnih, saj se 90% veže na albumin ter 3% na SHBG. (6, 8, 15)



Slika 1: Glavne presnovne poti steroidnih hormonov (17)

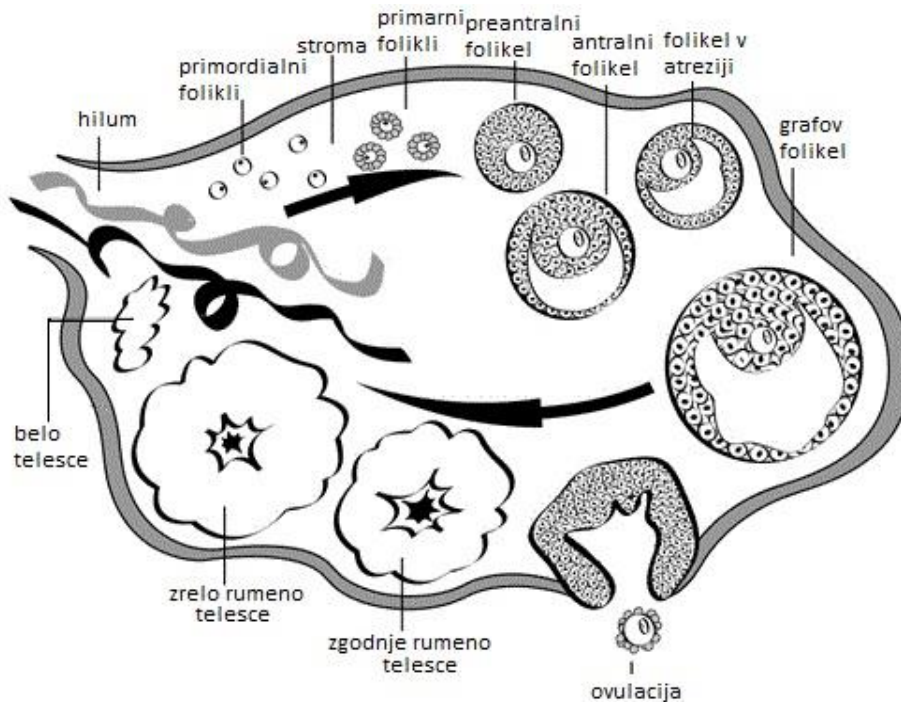
1.6.5. Ovariji

Ovarija, kot del ženskih spolnih organov, prevzemata reproduktivno endokrino in eksokrino funkcijo. Sta parna organa, ki sta prislonjena na maternico. Delovanje je odvisno od FSH in LH, ki se dopolnjujeta z intraovarijskimi mehanizmi. Hormoni ovarijev vplivajo na hipofizo in hipotalamus ter s tem tvorijo dinamično ravnotežje. (1, 5, 8)

1.6.5.1. Folikli

Folikli so strukture, ki so že prisotne v kasnejšem embrionalnem razvoju. V obdobju menarhe so večinoma prisotni samo primordialni folikli, ki so sestavljeni iz oocita obdanega s sploščeno plastjo granuloznih celic in teka celic. Primordialnim foliklom sledi prehod v primarne folikle (slika št. 2), kjer se oocit poveča in je obdan z bazalno membrano ter kubično zgrajeni granuloznimi celicami. Granulozne celice obdaja še dodatna bazalna membrana, ki jih ločuje od teka celic.

Med nadaljnjim zorenjem folikli preidejo skozi stadije sekundarnega, terciarnega in Grafovega folikla. Že ob prehodu iz primarnega v sekundarni folikel je opazno tvorjenje tekočine antruma. Zorenje od primarnega folikla do antralnega je popolnoma neodvisno od gonadotropinov. Proliferacija granuloznih celic se dogaja sočasno z večanjem antruma. Med antralnimi folikli pride do selekcije vodilnega folikla s signalom FSH, folikli z nižjo afiniteto do FSH preidejo v atrezijo. Sočasno z rastjo Grafovega folikla se pospešuje steroidogeneza. Ob ovulaciji se oocit sprosti in izlije v jajcevod. Preostale celice folikla se pretvorijo v rumeno telesce (corpus luteum), kjer se nadaljuje sinteza hormonov. (5, 8, 14)



Slika 2: Zorilni proces foliklov v jajčnikih (18)

1.6.5.2. Fiziologija ovarija

Folikli in rumeno telesce so vir različnih hormonov z endokrino, parakrino in avtokrino funkcijo. Primarna skupina so steroidi, ki se tvorijo iz holesterola ali iz acetilacetata v celicah teke. Prva večja stopnja v biosintezi je pregnenolon, kateri je osnoven substrat za tvorbo progesterona, androstediona in testosterona (slika št. 1). Z difuzijo prehajata androstedion ter testosteron v celice granuloze, kjer steče nadaljnja biosinteza. Aromataze tvorijo iz androgenov estrogena estron in estradiol. Steroidi se v ovarijih ne skladiščijo, sinteza ter sproščanje potekata samo kot odziv na LH in FSH.

Sočasno s sintezo steroidov poteka tudi sinteza cele vrste peptidov. Najpogosteje se omenjajo kot rastni faktorji in imajo vloge, ki segajo od lokalne do sistemske regulacije:

- Inhibin se sintetizira v celicah granuloze in v mnogo nižjih koncentracijah v nekaterih drugih tkivih. Selektivno zavira sproščanje FSH iz hipofize z inhibicijo FSH-biosinteze. Avtokrino modulira delovanje aromataze skupaj z aktivinom v celicah granuloze. V celicah teke pospešuje LH inducirano sintezo androstendiona.
- Aktivin ima obratno delovanje inhibinu, kot pozitivna povratna zanka. Sinteza poteka izključno samo v celicah granuloze. Sproščanje FSH je počasnejše in dalj časa trajajoče v primerjavi s stimulacijo z GnRH.

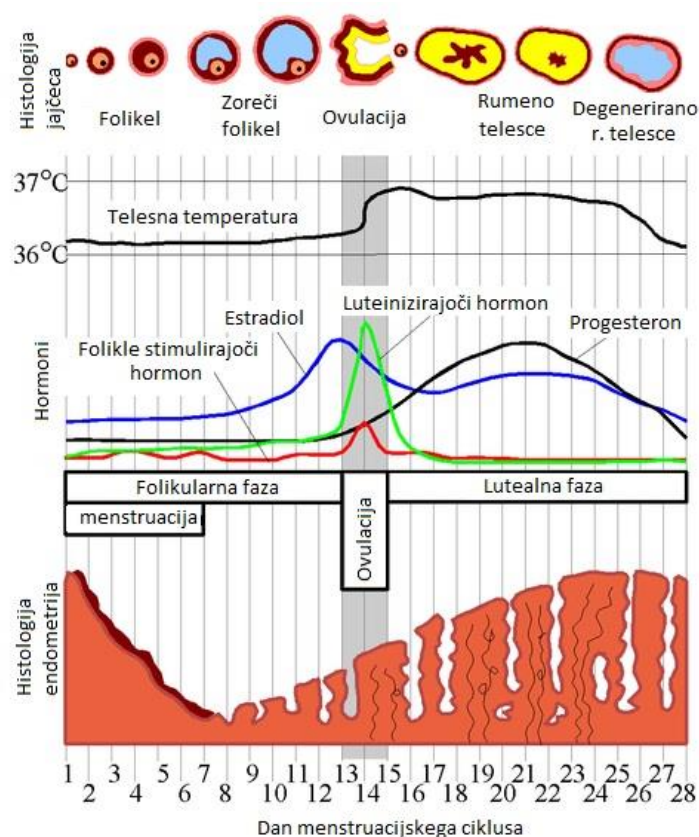
- Inzulinu podoben rastni faktor (IGF) sodeluje primarno v proliferaciji celic. IGF-I se tvori v celicah granuloze, IGF-II se tvori v celicah teke in granuloze. Znano je, da poveča učinek gonadotropinov in pospeši steroidogenezo. Raziskave nakazujejo na možne agonistične učinke inzulina zaradi vezave na IGF-I receptor.
- Epidermalni rastni faktor (EGF) stimulira proliferacijo celic granuloze ter inhibira FSH podprto sintezo estrogenov. Sklepa se, da igra veliko vlogo pri tvorbi LH-receptorjev na celicah granuloze.
- Transformirajoči rastni faktor (TGF) spreminja učinke FSH na granulozne celice in zavira sintezo androgenov v celicah teke.
- Folistatin je peptid, ki ga tvorijo celice granuloze. Sposoben je vezave inhibina in aktivina ter s tem vpliva na njuno biološko funkcijo. (5, 14)

1.6.5.3. Menstrualni cikel

Menstruacija je izraz za luščenje maternične sluznice in se smatra kot začetek novega cikla. Periodični cikel se uravnava s hormonsko osjo, katera teče iz hipotalamusa preko hipofize do jajčnikov. Deluje po ciklu, ki traja nekje 28 dni.

Deli se na več faz:

- Folikularna faza
Menstrualni cikel steče, ko prične FSH stimulirati folikle jajčnikov. Granulozne celice folikla ob zorenju pričnejo izločati estrogen, deluje kot pozitivna povratna zanka, ki omeji nastanek novih foliklov. Stimulacija estrogena pripravi sluznico maternice na sprejetje jajčeca. (5, 8, 14)
- Ovulacija
Dozorevanje folikla se nadaljuje z vključitvijo LH in znižanjem FSH. Za sprostitvev jajčeca pride do skupnega nenadnega zvišanja LH, FSH in estrogena. (5, 8, 14)
- Lutealna faza
Granulozne in teka celice, ki so bile ovoj folikla, tvorijo rumeno telesce. Za vzdrževanje nosečnosti LH podpira tvorjenje progesterona v rumenem telescu, ki z estrogenom vzdržuje endometrijo maternice. Medtem preprečuje inhibin nastanek novega folikla. (5, 8, 14)
- Pozna lutealna faza
Ob zanositvi se vzdržuje estrogen, progesteron in inhibin. Če nosečnosti ni, se nivo hormonov zniža, nastopi menstruacija in prične se razvoj novega folikla. (5, 8, 14)



Slika 3: Menstruacijski cikel na osnovi 28 dnevnega ritma (19)

1.6.6. Androgeni

Androgeni so primarni moški spolni hormoni, vendar sinteza ne poteka izključno samo v testisih, temveč tudi v nadledvičnih žlezah obeh spolov in ovarijih. V moškem organizmu so potrebne mnogo višje koncentracije zaradi visokega metabolnega obrata kot pri ženskah. Na ravni tkiv se koncentracije bistveno ne razlikujejo. (1, 13, 20)

Glavni predstavniki so:

- dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEAS) - je androgen, ki izhaja iz skorje nadledvičnih žlez. V krvi se nahaja v koncentracijah med 3-12 $\mu\text{mol/L}$. Lokalno se pretvarja v aktivnejše metabolite, ki so sposobni vezave na androgeni receptor.
- dehidroepiandrosteron (DHEA) – se tvori delno v nadledvični žlezi, delno v celicah teke in delno na osnovi DHEAS z encimom steroid-sulfataza. Krvne koncentracije se gibljejo v območju 3-35 nmol/L . Lokalno se vključuje v biosintezo bodisi androgenov ali drugih steroidov.

- androstendion – se sprošča iz nadledvičnih žlez ter foliklov v jajčnikih. Koncentracije variirajo po infradijalnem ritmu, ki se sinhronizira z menstrualnim ciklom. V krvi se nahaja v koncentraciji med 2-8 nmol/L. Biosinteza lahko poteka na osnovi holesterola ali pro-androgenov, kot sta DHEAS ali DHEA. Celice granulose ga uporabljajo kot osnovo za sintezo estrogenov. Lokalno se tudi pretvarja v testosteron.
- testosteron – izvira iz sinteze v nadledvični žlezi, iz celic teke v ovarijih in iz cirkulirajočega androstendiona. Dnevno se sintetizira od 0,1mg do 0,4mg, v krvi lahko zasledimo koncentracije v območju 0,6-2,5nmol/L. Koncentracije so najvišje zjutraj, vendar se splošno ravna po infradijalnem ritmu menstrualnega cikla. Lokalna sinteza testosterona je možna na osnovi vseh androgenov razen DHT. Testosteron se lahko nespremenjen veže na androgeni receptor, a se pogosto s pomočjo reduktaz pretvori v DHT, ki predstavlja aktivnejšo obliko in ima višjo afiniteto do androgenih receptorjev.
- dihidrotestosteron (DHT) – je najaktivnejši med androgeni. Koncentracije v krvi so izjemno nizke, saj se večinoma sintetizira lokalno iz drugih androgenov po potrebi. (1, 6, 23)

1.6.6.1. Funkcija

Vloge in koncentracije androgenov v organizmu se spreminjajo tekom življenja. V otroštvu, ob dozorevanju nadledvične žleze, se prične tvorba večjih količin DHEA in DHEAS, nastopi adrenarha. Značilen je razvoj pazdušnega vonja ter možen pojav poraščenosti osramja. Naslednja večja stopnja je dozorevanje GnRH pulza, ki stimulira steroidogenezo v ovarijih in naznanja začetek pubertete. Obdobje pubertete predstavljajo fiziološke spremembe, kot so pospešena rast, pospešena aktivnost lojnic, poraščenost osramja in pazdušnega predela, skratka razvoj sekundarnih spolnih znakov. Zvišane ravni androgenov v tem obdobju so eden izmed glavnih faktorjev v nastanku teh sprememb. Po nastopu menarhe se postopoma vzpostavi dinamično ravnotežje z estrogeni progestageni in androgeni. Pomembna vloga v obdobju do menopavze je vzdrževanje ženske libido. Ostale vloge so slabo raziskane, vključno z obdobjem po menopavzi, kjer koncentracije praviloma padajo. (10, 20, 21)

1.6.6.2. Delovanje

Kot ostali steroidni hormoni tudi androgeni prosto prehajajo celično membrano. Učinek se sproži ob vezavi na prosti androgeni receptor. Receptor se nahaja v citosolu in ob aktivaciji modulira celične procese ali preide v jedro, kjer prevzame vlogo transkripcijskega faktorja.

Vezavno mesto specifično veže testosteron in DHT, vendar se progesteron lahko veže kot agonist ob zadostni koncentraciji. Odvisno od celičnega tipa variirajo receptorji. V določenih tkivih 5α -reduktaza reducira testosteron v DHT ter omogoča učinek. Druga tkiva, kjer je za aktivacijo potreben estradiol, se poslužujejo aromataze. (10, 16)

1.6.6.3. Sinteza

Biosinteza androgenov sledi skupni poti v obeh spolih. Encimi, lokacija organelov ter zahteve po kofaktorjih so enake v jajčnikih kot tudi v nadledvični žlezi (glej sliko št. 1). (10, 16)

1.6.6.4. Izločanje

Konstantna raven androgenov je delno zagotovljena z inaktivacijo in eliminacijo. Inaktivacija se vrši neposredno po aktivni fazi delovanja hormonov v tkivih ali delno ob prehodu skozi jetra. Za nadaljnjo razgradnjo v vodotopne oblike igrajo primarno vlogo hepatociti. Steroidne molekule pretvorijo v vodotopne oblike, ki se izločijo z urinom. (10, 16)

1.7. TESTOSTERON

IUPAC: *17-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one*

molekulska masa: 288,4 Da

molekularna formula: $C_{19}H_{28}O_2$

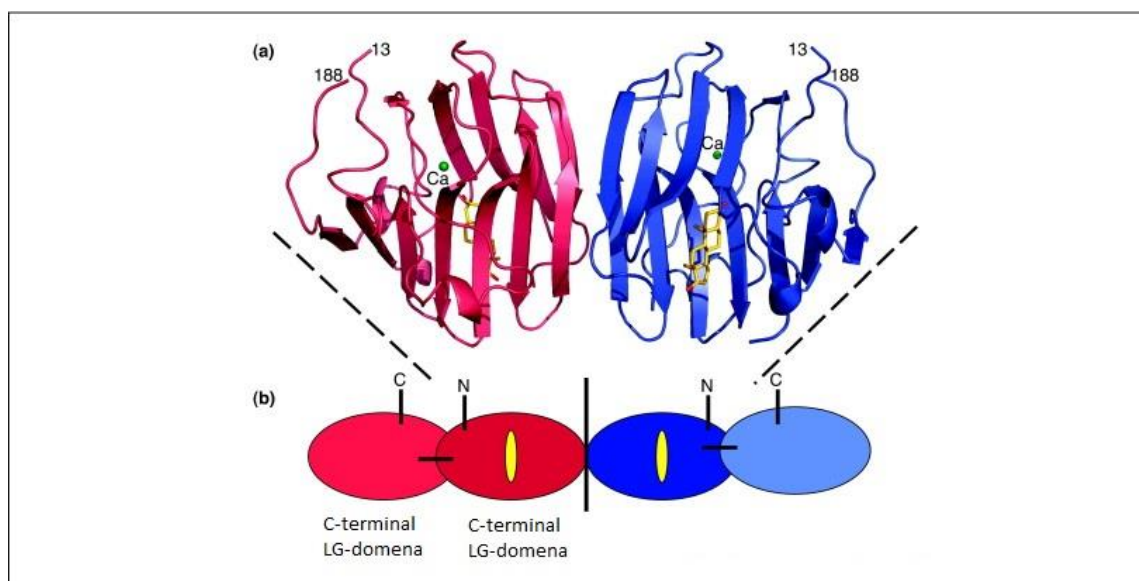
Je drugi najaktivnejši hormon iz skupine androgenov in je zaslužen za večino učinkov, ki so za njih značilni.

Večina testosterona se po cirkulaciji giblje nekovalentno vezanega na plazemske proteine. 50-60% testosterona je vezanega z visoko afiniteto na SHBG, manjši delež 40-50% je šibko vezan na albumin in 1-3% je nevezanega, ki ga poznamo kot prosti testosteron. Učinek je predvsem odvisen od proste oblike. Pomanjkanje SHBG lahko močno poveča razpoložljivost. Inaktivacija se odvija v tarčnih tkivih. Razpolovna doba je nekje med 2 do 4 ure. (10, 16, 20)

1.8. SHBG

Spolne hormone vezoč globulin (SHBG) velja kot glavni transportni protein in mediator celičnega prevzema za biološko aktivne oblike nekaterih steroidnih hormonov. Z visoko afiniteto veže predvsem androgene ter estradiol. (3, 4)

"V plazmi se nahaja v obliki glikoproteina (slika št. 4), ki je sestavljen iz dveh enakih nekovalentno vezanih monomerov po 40,5 kDa. Vsako podenoto sestavlja 373 aminokislin, tri oligosaharidne stanske verige ter dve disulfidni vezi. V monomeru se tudi nahajata dva β -prepoznjena lista povezana z vodikovimi vezmi, ki sta potrebna za kasnejšo tvorbo strukture dimerja. Na zrelem homodimerju se nahajata dve enako aktivni specifični vezavni mesti za sterioide kot so DHT, testosteron ali estradiol. Kot v primeru kortizol vezočega globulina in tiroksin vezočega globulina so prisotne stranske oligosaharidne verige, ki tvorijo specifično strukturno organizacijo. Glikozilacija naj ne bi bila zaslužna za sposobnost vezave steroidov, ampak bi naj igrala vlogo pri interakciji SHBG-steroid kompleksov z celičnimi receptorji v tarčnih tkivih. Razpolovni čas molekule se z glikozilacijo podaljša in omogoči večje število interakcij z drugimi makromolekulami." (3)



Slika 4: Humani spolne hormone vezoči glikoprotein oz. SHBG (22)

Velika večina plazemskega SHBG se sintetizira v jetrih, v manjših količinah se sintetizira v testisih, prostati, ovarijih, endometriju in placenti. (3, 23)

"SHBG transkripcijo regulirajo trije tkivno specifični promotorji. Najvažnejši je P_L promotor, kateri se nahaja v hepatocitih v izobilju. Kodirajoč gen za SHBG obsega 4kb in je sestavljen

iz osmih eksonov in sedem intronov. Smatra se, da imajo polimorfizmi posamičnih nukleotidov na genu za SHBG velik vpliv na sintezo in funkcijo proteina. Določene polimorfizme se povezuje z razvojem sladkorne bolezni tip 2, a povezava še ni dokazana." (3)

Sinteza SHBG je podvržena mnogim različnim metabolnim ter hormonalnim vplivom. (3, 4)

Predvideva se, da prisotnost inzulina zniža sposobnost sinteze SHBG v hepatocitih. Nekatere raziskave omenjajo splošno zmanjšanje sinteze proteinov in izpostavljajo monosaharide kot vzrok za zmanjšano sintezo SHBG. (3, 4)

Vsekakor velja, da je plazemska koncentracija SHBG podvržena metabolnim motnjam, ki so povezane z zgodnjo fazo razvoja sladkorne bolezni tip 2. (3, 4, 23)

2. NAMEN DELA

2.1. NAMEN

V diplomski nalogi želimo ugotoviti, v kolikšnem odstotku se vrednosti SHBG in testosterona ujemajo s klinično sliko. V ta namen bomo izbrali skupino bolnic in jih primerjali s kontrolno skupino. Izračunali bomo specifičnost in občutljivost testov (testosterona in SHBG) ter za kombinacijo obeh. Izračunali bomo tudi, za koliko se specifičnost in občutljivost razlikujeta (v %) med posameznimi testi.

2.2. HIPOTEZA

V serumu bolnic, za katere je potrjena diagnoza sindroma policističnih ovarijev, so vrednosti SHBG znižane in vrednosti testosterona povišane v primerjavi s kontrolno skupino.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Vsi vzorci so pridobljeni v obdobju 2011/2012, od preiskovank, ki smo jih opredelili na osnovi predhodnih raziskav v kontrolno skupino in skupino bolnic. Vse preiskovanke so bile testirane v rodni dobi pred nastopom menopavze. Izračunali smo povprečno starost in standardno deviacijo za obe skupini, kot je razvidno iz tabele št. 1.

Tabela 1: Osnovna statistična analiza starosti preiskovank

	Kontrolna skupina	Bolnice
Število preiskovank	54	9
Povprečna starost	33	31
Standardna deviacija	5,7	5,7

3.2. TESTOSTERON

Princip metode

Za določanje testosterona smo uporabili aparaturo Atomic Gamma Counter Wallac Wizard 1470. Test smo izvedli s setom za radioimunološko metodo (RIA- radioimmunoassay) in pripadajočimi reagenti proizvajalca DiaSorin.

3.2.1. Reagenti in material

Vsi reagenti so iz seta reagentov TESTO-CTK proizvajalca DiaSorin:

- epruvete z vezanimi anti-testosteron protitelesi
- raztopina testosterona, označenega z I^{125}
- 6 standardov z različnimi koncentracijami testosterona, od 0 do 34,7 nmol/L
- kontrolni serum, liofiliziran
- deionizirana voda
- 2 epruveti 12x70 mm za totalno aktivnost (T) (24)

3.2.2. Vzorci

Primeren je serum, ki je shranjen na temperaturi od 2 do 8°C 24 ur. V primeru, da se analize ne izvedejo v 24 urah, je vzorce potrebno zamrzniti pri -20°C ali manj. Za vzorčni material smo uporabili serum, ki je bil ločen od sedimenta in zamrznjen na -20°C. Shranjujemo ga v plastičnih ali steklenih vialah. Pred uporabo je potrebno vzorce odmrzniti ter premešati z vortex mešalnikom. Vzorce, ki so mikrobiološko kontaminirani, hemolizirani ali lipemični, ne uporabimo za analizo.

3.2.3. Umerjanje aparature

Za vsako serijo analiz se pripravi umeritveno krivuljo v dvojniku. Osnovo za krivuljo dobimo z meritvijo standardov iz seta od najnižje do najvišje koncentracije. Merilno območje metode je od 0,07 – 34,7 nmol/L. (24)

3.2.4. Postopek testa

Pred pričetkom dela vzamemo sete z reagenti iz hladilnika in jih segrejemo na sobno temperaturo in previdno premešamo. Liofiliziran kontrolni serum raztopimo z deionizirano vodo po navodilu na embalaži. Epruvete označimo za standarde v dvojniku, kontrolni serum, vzorce in totalno aktivnost (T). Odpipetiramo po 50 µL standardov, kontrole ter vzorcev na dno epruвет. V vse epruvete dodamo po 500 µL reagenta testosteron-I¹²⁵. Epruvete pazljivo premešamo, pokrijemo z aluminijasto folijo in inkubiramo 3 ure na 37°C. Po inkubaciji odsesamo vsebino epruвет, razen T. Za meritev zložimo epruvete po vrstnem redu v stojala z oznako in kodo preiskave od leve proti desni:

- T
- standardi od najnižje do najvišje koncentracije v dvojniku
- kontrolni vzorec
- vzorci v enojniku

Stojala zložimo v aparaturo, kjer se po tekočem traku pomikajo v merilno komoro. Zadnje stojalo mora biti stojalo z oznako STOP. Rezultati meritev se izpišejo na tiskalniku.

Opis radioimunološke metode

Osnova metode je direktna kompetitivna imunološka tehnika, pri kateri merimo ionizirajoče sevanje označenih antigenov. Reakcija poteka v epruветah z vezanimi protitelesi anti-testosteron. Vzorcju dodamo derivat testosterona označenega z radioaktivnim izotopom I¹²⁵.

Označen testosteron- I^{125} tekmuje za vezavna mesta s testosteronom iz vzorca za vezavna mesta na omejenem številu protiteles. S spiranjem odstranimo nevezane snovi in izmerimo aktivnost vzorcev z gama števcem. Meritev nam omogoča NaI(Tl) kristal, ki pod vplivom energije ionizirajočega sevanja oddaja luminiscenco. Emitirano svetlobo zazna fotopomnoževalka. (24, 25)

3.2.5. Rezultati

Aktivnost vzorca je obratno sorazmerna s koncentracijo testosterona v vzorcu. Analizator nam avtomatsko pretvori izmerjen signal v ng/mL. Rezultate navajamo v nmol/L, zato je potrebno vrednosti v ng/mL pomnožiti s 3,47.

ENAČBA: $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} * 3,47$

Območje linearnosti metode je do 34,7 nmol/L. V primeru, da vzorec presega to vrednost, redčimo 11x s standardom 0 nmol/L (20 μL + 200 μL standarda 0), ki je v reagenčnem kompletu.

3.2.6. Specifične karakteristike naprave Gamma Counter Wallac Wizard

Meritveno območje

Kvantitativna določitev za metodo RIA je mogoča v območju od 0,07 do 34,7 nmol/L.

Območje linearnosti metode je do 34,7 nmol/L. V primeru, da vzorec presega to vrednost, redčimo 11x s standardom 0 nmol/L (20 μL vzorca + 200 μL standarda 0), ki je v reagenčnem kompletu. (24, 25)

Referenčno območje

Referenčno območje za meritve testosterona je 1,0 – 3,0 nmol/L.

Analitična občutljivost

Najnižja meja detekcije za metodo je 0.07 nmol/L. (24)

Natančnost metode

Natančnost se določi tako, da se na 3 vzorcih z različnimi koncentracijami glikoproteina ponovi meritev 14 krat v eni seriji za določitev ponovljivosti (tabela št. 2) in 10 krat v različnih serijah s 4-mi vzorci za določitev obnovljivosti (tabela št. 3). (24)

Tabela 2: Izsledki meritev vzorcev za določitev ponovljivosti (24)

Vzorec	1	2	3
Število analiz	14	14	14
Povprečje (nmol/L)	3,92	12,53	25,23
Standardna deviacija (nmol/L)	0,315	0,548	0,909
Koeficient variacije (%)	8,06	4,38	3,16

Tabela 3: Izsledki meritev vzorcev za določitev obnovljivosti (24)

Vzorec	1	2	3	4
Število analiz	10	10	10	10
Povprečje (nmol/L)	1,453	7,509	16,135	32,417
Standardna deviacija (nmol/L)	0,111	0,468	1,176	2,294
Koeficient variacije (%)	7,58	6,23	7,28	7,08

Točnost metode

Preizkus točnosti se je izvedel s preizkusom redčenja (tabela št. 4), kjer se je vzorcem z znano koncentracijo dodajalo standard-0 in s tako imenovanim "recovery" preizkusom (tabela št. 5), kjer so se znanim vzorcem dodajale vse višje koncentracije raztopine testosterona. Oba preizkusa sta se izvedla v dveh serijah. (24)

Tabela 4: Izsledki meritev preizkusa redčenja (24)

Vzorec	Faktor redčenja vzorec/standard 0	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane (%)
1	1:1	18,67	-	-
	1:2	9,02	9,33	96,7
	1:4	4,51	4,65	96,7
	1:8	2,32	2,33	99,7
	1:16	1,18	1,17	101,2
	1:32	0,62	0,59	107,1
2	1:1	17,80	-	-
	1:2	9,68	8,92	108,8
	1:4	4,58	4,44	102,9
	1:8	2,36	2,22	106,0
	1:16	1,08	1,11	96,7
	1:32	0,52	0,56	93,6

Tabela 5: Izsledki meritev "recovery" preizkusa (24)

Vzorec	Dodane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane (%)
1	brez dodatka	1,04	-	-
	13,46	14,23	14,50	98,1
	8,54	8,68	9,26	90,6
	3,85	5,21	4,89	106,4
	2,39	3,47	3,44	101,0
	1,35	2,43	2,39	101,4
2	brez dodatka	15,55	-	-
	13,46	30,88	30,26	102,1
	8,54	25,68	25,33	101,4
	3,85	22,21	20,65	107,6
	2,39	19,78	19,19	103,1

	1,35	18,39	18,15	101,3
--	------	-------	-------	-------

Specifičnost metode

Specifičnost metode se je določila z dodatkom križnih reaktantov k vzorcu z znano koncentracijo za določitev navzkrižne reaktivnosti (tabela št. 6). Za odvzem se je uporabilo vakutejnerje brez aditivov.

Tabela 6: Izsledki meritev vzorcev za določitev specifičnosti (24)

Križni reaktanti	Delež križne reaktivnosti (%)
5-dihidrottestosteron	6,9
Androstenedion	1,1
19-norethisteron	0,33
Danazol	0,15
Dehydroepiandrosteron	$4,5 \times 10^{-2}$
5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	$2,5 \times 10^{-2}$
Testosteron glukoronid	$2,0 \times 10^{-2}$
Kortizol	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Kortikosteron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Holesterol	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Deoksikortikosteron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
17-epitestosteron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Testosteron sulfat	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Androsteron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
3 β -oksiandrostan-5 β ,17-on	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Progesteron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Estron	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Estradiol, Etinilestradiol	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Estriol	$< 1,0 \times 10^{-2}$
Dexametazon	$< 1,0 \times 10^{-2}$

Antikoagulantna EDTA in heparin ne interferirata pri preiskavi. (24)

3.3. SHBG

3.3.1. Princip metode

Za določanje SHBG v plazmi smo uporabili IMMULITE analizator proizvajalca SIEMENS. Test smo izvedli s setom za kemiluminiscenčno imunometrično metodo (CLIA – chemiluminescence immunoassay) in pripadajočimi reagenti.

3.3.2. Reagenti in material

Splošni reagenti ter čistilna sredstva iz setov SIEMENS Chemiluminescent Substrate Module, SIEMENS Probe Wash Module in SIEMENS Probe Cleaning Kit :

- raztopina kemiluminiscenčnega substrata
- raztopina za spiranje aparata
- raztopina za čiščenje igel

Reagenti pripravljeni v laboratoriju:

- raztopina 10% Na-hipoklorita
- raztopina 70% izopropilnega alkohola
- deionizirana voda

Reagenti iz seta SIEMENS SHBG:

- raztopina za redčenje vzorcev
- testne enote z vezanimi primernimi anti-SHBG monoklonalnimi protitelesi
- raztopina sekundarnih anti-SHBG poliklonalnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo
- kalibrator I nizek
- kalibrator II visok
- kontrolni serum 1 in 2

Material iz kompletov SIEMENS Sample Cup Holders in SIEMENS Sample Cup:

- nosilci za vzorce s črtno kodo
- plastične kivete

3.3.3. Vzorci

Po odvzemu lahko vzorce shranjujemo do 7 dni pri 2-8°C ali 2 meseca pri -20°C. Za vzorčni material smo uporabili serum, ki je bil ločen od sedimenta. Shranjujemo ga v plastičnih ali steklenih vialah. Pred uporabo je potrebno zamrznjene vzorce odmrzniti ter premešati z vortex mešalnikom. Ponavljajočega se odmrzovanja in zamrzovanja se poskušamo izogniti.

Minimalna količina vzorca, potrebnega za analizo, je 10 µL. Najmanjša količina vzorca za eno analizo skupaj z mrtvim volumnom (100 µL) je 110 µL.

Običajno redčimo vzorec 1:21, kar pomeni 20 µL vzorca + 400 µL raztopine za redčenje. (26)

Ostale zahteve za vzorce so enake kot pri določanju testosterona.

3.3.4. Umerjanje aparature

Umerjanje je potrebno ob vsaki menjavi serije reagentov ali vsakih 14 dni. Osnovna kalibracijska krivulja je podana s strani proizvajalca in se prilagodi z rekaliibracijo našim pogojem. Za rekaliibracijo uporabimo kalibratorja I in II za nizko in visoko merilno območje. Glede na meritvi, dobljeni s kalibratorjema, program prilagodi umeritveno krivuljo. (26)

3.3.5. Postopek testa

Reagente in testne enote pred pričetkom dela vzamemo iz hladilnika in počakamo da se segrejejo na sobno temperaturo. Preverimo, če je zadosti tekočine za spiranje, deionizirane vode in raztopine substrata v aparatu. V primeru, da je katere izmed tekočin premalo, pripravimo novo. Za pripravo aparata na meritev še speremo celoten sistem, da odstranimo vse mehurčke in morebitne ostanke osušenih reagentov. Reagentom odstranimo zaščitno folijo ter vstavimo v krožnik. Krožnik z reagenti vložimo v inkubator, avtomatsko se prečitajo črtne kode in preveri nivo tekočin. Vzorce in kontrolne serume premešamo. Vzorce razredčimo z raztopino za redčenje iz seta reagentov. Redčimo 1:21 (20 µL vzorca + 400 µL raztopine za redčenje), premešamo in prelijemo v plastične kivete, ki jih vložimo v oštevilčene nosilce s črtno kodo. Vzorce označimo s številkami in vnesemo v delovno listo. Za vsakim vzorcem postavimo v aparat testno enoto iz reagenčnega seta. Delovni postopek v napravi je sledeč:

- pipetiranje vzorcev v testne enote
- odpipetira se reagent s sekundarnimi konjugiranimi protitelesi
- sledi 30 minutna inkubacija
- testne enote se sperejo, da se odstrani odvečne nevezane snovi

- odpipetira se izoluminolni substrat
- nazadnje steče meritev s fotopomnoževalko. (26)

Opis kemiluminiscenčne imunološke metode

Metoda temelji na nekompetativni indirektni reakciji protitelo-antigen-konjugirano protitelo. Reakcija se izvaja v testni enoti, ki vsebuje plastično kroglico prekrito z anti-SHBG monoklonalnimi protitelesi. Reagent vsebuje anti-SHBG poliklonalna protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo. SHBG v vzorcu se veže na primarna protitelesa na nosilcu, v naslednji stopnji se vežejo konjugirana sekundarna protitelesa na vezan SHBG. Tvori se kompleks primarno anti-SHBG/SHBG/sekundarno anti-SHBG/alkalna fosfataza. Nevezane snovi se sperejo. Inkubacija se izvaja pri 37°C in traja 30 min. Zadnja stopnja je dodatek substrata, ki vsebuje izoluminolni derivat. Alkalna fosfataza konjugirana s poliklonalnimi anti-SHBG razgradi substrat, pri čemer pride do kemiluminiscence. Svetlobni signal izmeri fotopomnoževalka. Intenziteta kemiluminiscence je premosorazmerna s koncentracijo SHBG v vzorcu. (26)

3.3.6. Rezultati

Intenziteta kemiluminiscence je premosorazmerna s koncentracijo SHBG v vzorcu. Analizator izmerjeno svetlobo avtomatsko pretvori iz relativnih luminiscenčnih enot v nmol/L. (26)

3.3.7. Specifične karakteristike analizatorja IMMULITE

Meritveno območje

Za kvantitativno določanje SHBG na analizatorju se meritveno območje giblje od 0,2 do 180 nmol/L. Vrednosti nižje od 0,2 nmol/L navajamo kot <0,2 nmol/L. Linearnost metode je zagotovljena do 180 nmol/L. Vzorce z višjo koncentracijo je potrebno redčiti:

- 1:41, kar pomeni 20 µL vzorca + 800 µL raztopine za redčenje, rezultat množimo s 2
 - 1:61, kar pomeni 20 µL vzorca + 1200 µL raztopine za redčenje, rezultat množimo s 3.
- (26)

Referenčno območje

Referenčno območje za določanje SHBG na analizatorju je 18 – 114 nmol/L.

Analitična občutljivost

Analitična občutljivost je definirana kot minimalna meja detekcije in je 0,2 nmol/L. (26)

Primerjalna metoda

Vzorci 68-tih pacientov se je testiralo z metodo "DPC" IRMA-Count SHBG in "IMMULITE" SHBG. Vsi vzorci so bili znotraj merilnega območja metode (0,2 do 180 nmol/L)

ENAČBA PREMICE: IMMULITE = 0,92 (IRMA-Count) + 3,6 nmol/L; $r = 0,979$

Natančnost metode

Natančnost se določi tako, da se na 5-tih vzorcih z različnimi koncentracijami glikoproteina ponovi meritev 20 krat v eni seriji za določitev ponovljivosti (tabela št. 7) in 20 krat v različnih serijah na 5-tih vzorcih za določitev obnovljivosti (tabela št. 8). (26)

Tabela 7: Izsledki meritev vzorcev za določitev ponovljivosti (26)

Vzorec	1	2	3	4	5
Število analiz	20	20	20	20	20
Povprečje (nmol/L)	4,5	11	33	64	121
Standardna deviacija(nmol/L)	0,31	0,85	2,0	2,6	9,1
Koeficient variacije (%)	6,9	7,7	6,1	4,1	7,5

Tabela 8: Izsledki meritev vzorcev za določitev obnovljivosti (26)

Vzorec	1	2	3	4	5
Število analiz	20	20	20	20	20
Povprečje (nmol/L)	6,0	12	35	71	105
Standardna deviacija (nmol/L)	0,77	1,1	2,8	5,3	6,1
Koeficient variacije (%)	13	9,2	8,0	7,5	5,8

Točnost metode

Preizkus točnosti metode se je izvedel s preizkusom redčenja (tabela št. 9), kjer se je vzorcem z znano koncentracijo dodajalo raztopino za redčenje in s "recovery" preizkusom (tabela št.

10), kjer se je vzorcu z znano koncentracijo dodajalo vse višje koncentracije raztopine testosterona.

Tabela 9: Izsledki meritev preizkusa redčenja (26)

Vzorec	Faktor redčenja vzorec/razt. za redčenje	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane (v %)
1	1:1	125	-	-
	1:2	59	63	94
	1:4	33	31	106
	1:8	18	16	113
2	1:1	135	-	-
	1:2	68	68	100
	1:4	35	34	103
	1:8	20	17	118
3	1:1	156	-	-
	1:2	80	78	103
	1:4	41	39	105
	1:8	23	20	115

Tabela 10: Izsledki meritev "recovery" preizkusa (26)

Vzorec	Zmes	Izmerjene koncentracije (nmol/L)	Pričakovane koncentracije (nmol/L)	Izmerjene/Pričakovane (% ponovljivosti)
1	brez dodatka	19	-	-
	A	21	24	88
	B	28	32	88
	C	49	50	98
2	brez dodatka	49	-	-
	A	48	53	92

	B	58	61	95
	C	79	79	100
3	Brez dodatka	54	-	-
	A	58	57	102
	B	58	65	89
	C	86	83	104

Specifičnost metode

Specifičnost metode se je določila z dodatkom križnih reaktantov k vzorcu z znano koncentracijo za določitev navzkrižne reaktivnosti (tabela 11). Za odvzem se je uporabilo vakutejnerje brez aditivov.

Tabela 11: Izsledki meritev vzorcev za določitev specifičnosti (26)

Križni reaktanti	Testirani dodatki	Delež križne reaktivnosti (%)
Alfa-fetoprotein (AFP)	368 μ g/L	0
Kortizol	275,900nmol/L	0
11-deoksikortizol	11,560nmol/L	0
5 α -dihidroksitestosteron	68,860nmol/L	0
Estradiol	13,216pmol/L	0
Humani serumski albumin (HSA)	0,5g/L	0
Testosteron	69,340nmol/L	0
Tiroglobulin	454pmol/L	0
Tiroksin-vezoč globulin (TBG)	193 μ g/mL	0
Transferin	4mg/mL	0

3.4. STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Dobljene rezultate meritev smo analizirali s pomočjo programa MedCalc. Pri vseh skupinah rezultatov smo izračunali osnovne statistične parametre ter opredelili distribucijo za nadaljnjo analizo. Statistične teste se je izvajalo s stopnjo značilnosti 0,05.

3.4.1. Testiranje normalnosti porazdelitve

Za testiranje normalnosti smo izbrali Kolmogorov-Smirnov test porazdelitve, kjer smo preverili ujemanje porazdelitve dobljenih vrednosti s standardno normalno porazdelitvijo in opravili osnovno statistično analizo podatkov (tabele št. 12, 13, 14 in 15).

Kot hipotezi smo predpostavili:

H_0 : Rezultati meritev se porazdeljujejo normalno

H_1 : Rezultati meritev se ne porazdeljujejo normalno

3.4.2. Testiranje statistično značilnih razlik

V nadaljnjem postopku nas je zanimalo, če obstaja statistično značilna razlika med kontrolno skupino in skupino bolnic. Zato smo na osnovi testa porazdelitve izbrali parametrični t-test enakosti varianc za neodvisne vzorce, ki se porazdeljujejo normalno ali neparametrični Mann-Whitney U-test vsote rangov za vzorce, ki ne sledijo normalni porazdelitvi.

Kot hipotezi smo postavili:

- H_0 : Med skupinama ni statistično značilnih razlik
- H_1 : Med skupinama obstaja statistično značilna razlika

Formula za T-test za enakost varianc:

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{\sqrt{s_P^2/n_A + s_P^2/n_B}} = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{s_P} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}}$$

Formula Mann-Whitney U-testa vsot rangov:

$$Z = \frac{|T_1 - n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/2|}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 + 1)/12}}$$

3.4.3. Specifičnost in občutljivost

Specifičnost in občutljivost sta lastnosti testa, ki nam omogočata oceno, kako učinkovita je binarna klasifikacija na bolne in zdrave.

Za izračun posameznega parametra je kot prvo potrebna delitev na pravilno pozitivne, pravilno negativne, nepravilno negativne in nepravilno pozitivne (tabela 12). Podatke za analizo smo pridobili s pomočjo predhodnih preiskav, ki so jih za nas izvedli na Ginekološki kliniki v Ljubljani in podatkov pridobljenih z meritvami testosterona in SHBG.

Tabela 12: Opredelitev izidov testa

		TEST	
		Pozitiven (T+)	Negativen (T-)
Bolezen	Prisotna (B+)	PP Pravilno pozitiven izid	NN Nepravilno negativen izid
	Odsotna (B-)	NP Nepravilno pozitiven izid	PN Pravilno negativen izid

3.4.3.1. Opredelitev rezultatov preiskav

Za preiskavo testosterona smo šteli kot:

- pravilno pozitivne - bile so nad referenčnim območjem in bolezen je prisotna,
- pravilno negativne - bile so v ali pod referenčnim območjem in bolezen ni prisotna,
- nepravilno negativne - bile so v ali pod referenčnim območjem in bolezen je prisotna,
- nepravilno pozitivni - bile so nad referenčnim območjem in bolezen ni prisotna.

Za preiskavo SHBG smo šteli kot:

- pravilno pozitivne - bile so pod referenčnim območjem in bolezen je prisotna,
- pravilno negativne - bile so v ali nad referenčnim območjem in bolezen ni prisotna,
- nepravilno negativne - bile so v ali nad referenčnim območjem in bolezen je prisotna,
- nepravilno pozitivne – bile so pod referenčnim območjem in bolezen ni prisotna.

Za kombinacijo preiskav testosteron – SHBG smo šteli kot:

- pravilno pozitivne - bile so nad referenčnim območjem za testosteron ali pod referenčnim območjem za SHBG ali oboje in bolezen je prisotna,
- pravilno negativne - bile so pod ali v referenčnem območju za testosteron ter v ali nad referenčnim območjem za SHBG in bolezen ni prisotna,
- nepravilno negativne - bile so v ali pod referenčnim območjem za testosteron ter v ali nad referenčnim območjem za SHBG in bolezen je prisotna
- nepravilno pozitivni - bile so nad referenčnim območjem za testosteron ali pod referenčnim območjem za SHBG ali oboje, vendar bolezen ni prisotna

3.4.3.2. *Izračun*

Na osnovi opredelitve smo lahko izračunali specifičnost, ki je definirana kot verjetnost negativnega izida pri osebah, pri katerih bolezen ni prisotna in občutljivost, ki je definirana kot verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih bolezen je prisotna.

Za izračun:

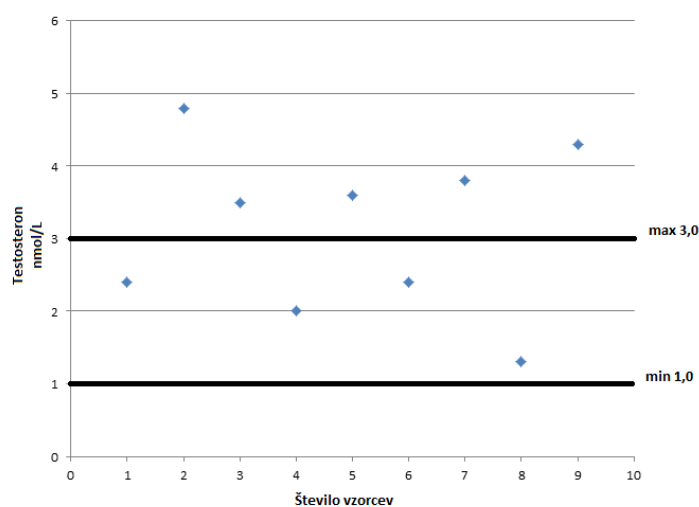
- specifičnosti uporabljamo formulo: $\text{specifičnost} = \text{PN} \times 100 / \text{PN} + \text{NP}$
- občutljivosti uporabljamo formulo: $\text{občutljivost} = \text{PP} \times 100 / \text{PP} + \text{NN}$

Ker nas zanima, za koliko odstotkov se specifičnost in občutljivost razlikujeta med posameznimi testi, smo tudi to izračunali. Pri izračunu razlika_s = specifičnost1 – specifičnost2 oz. razlika_o = občutljivost1 – občutljivost2 smo uporabili absolutno vrednost.

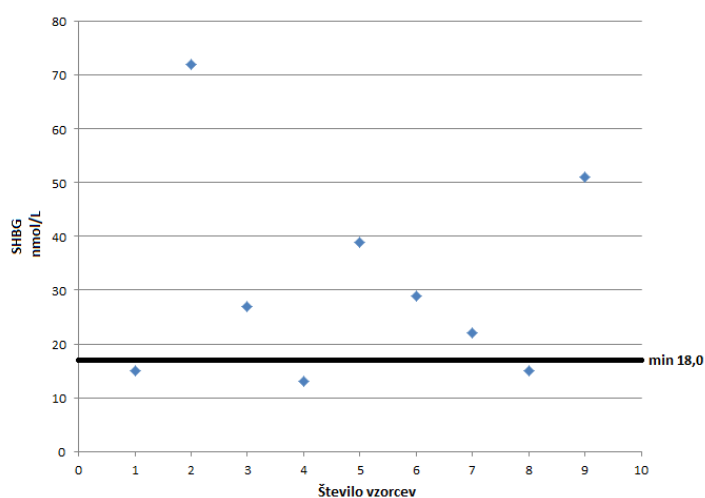
4. REZULTATI

4.1. OVREDNOTENJE SKUPIN

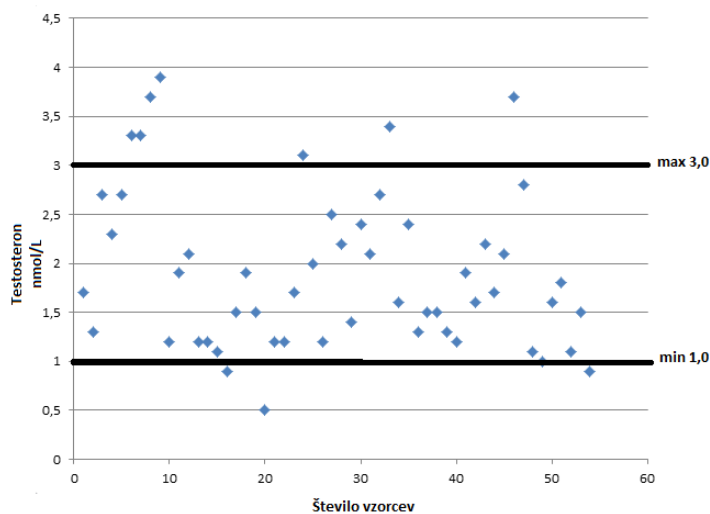
Glede na predhodne preiskave na Ginekološki kliniki v Ljubljani smo razdelili preiskovanke na skupino bolnic in kontrolno skupino. V skupini bolnic smo pridobili 9 vzorcev in 54 v kontrolni skupini. Posamezne meritve smo prikazali v grafih (graf 1, 2, 3 in 4) z referenčnim območjem (odebeljeni črti). V skupini bolnic smo pridobili 9 vzorcev in 54 v kontrolni skupini.



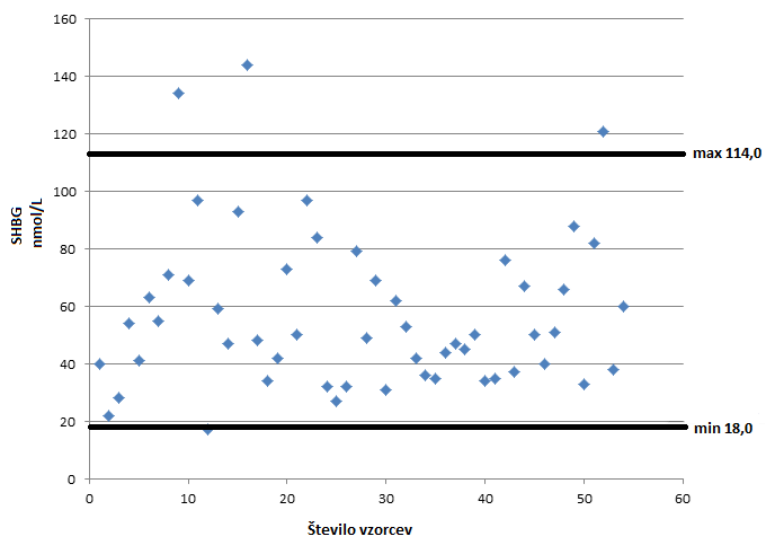
Graf 1: Porazdelitev merjenih vrednosti testosterona obolelih preiskovank z intervalom referenčnih vrednosti



Graf 2: Porazdelitev merjenih vrednosti SHBG obolelih preiskovank z intervalom referenčnih vrednosti



Graf 3: Porazdelitev merjenih vrednosti testosterona kontrolne skupine z intervalom referenčnih vrednosti



Graf 4: Porazdelitev merjenih vrednosti SHBG kontrolne skupine z intervalom referenčnih vrednosti

4.2. REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE PODATKOV

Pri vseh skupinah rezultatov smo izračunali osnovne statistične parametre ter opredelili distribucijo za nadaljnjo analizo. Statistične teste se je izvajalo s stopnjo značilnosti 0,05.

a) Kolmogorov-Smirnov test za testiranje normalnosti porazdelitve je potrdil ničelno hipotezo ($P > 0,05$), da se rezultati meritev porazdeljujejo normalno, kar je razvidno iz tabel št. 13, 14, 15 in 16. V tabelah smo prav tako navedli rezultate osnovne statistične analize.

Tabela 13: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev testosterona kontrolne skupine

Velikost vzorca	54
Najvišja vrednost	3,9
Najnižja vrednost	0,5
Povprečna vrednost	1,9
Mediana	1,7
Varianca	0,6566
Standardna deviacija	0,8103
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	P = 0,2493 sprejmemo ničelno hipotezo

Tabela 14: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev testosterona skupine bolnic

Velikost vzorca	9
Najvišja vrednost	4,8
Najnižja vrednost	1,3
Povprečna vrednost	3,1
Mediana	3,5
Varianca	1,3319
Standardna deviacija	1,1541
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	P = 0,8892 sprejmemo ničelno hipotezo

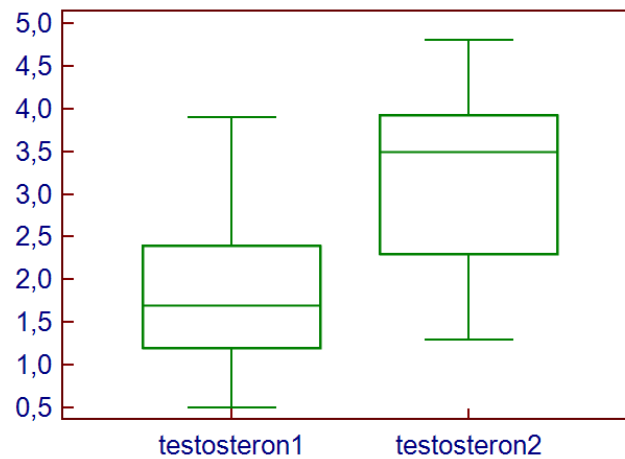
Tabela 15: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev SHBG kontrolne skupine

Velikost vzorca	54
Najvišja vrednost	144
Najnižja vrednost	17
Povprečna vrednost	56,9
Mediana	50,00
Varianca	730,086
Standardna deviacija	27,0201
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	P = 0,2082 sprejmemo ničelno hipotezo

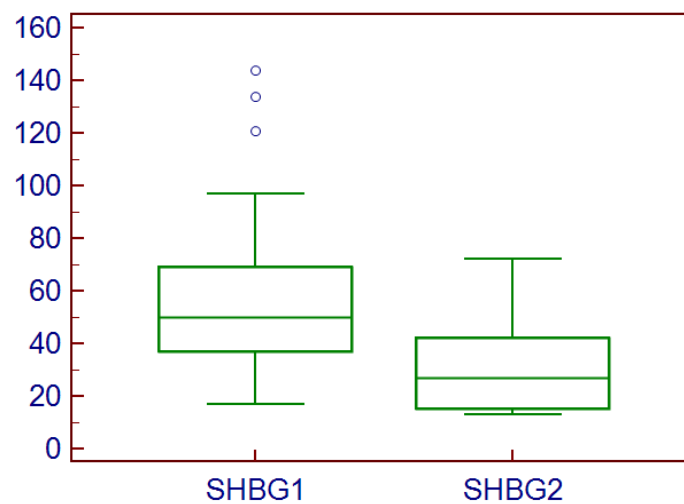
Tabela 16: Rezultati dobljeni s Kolmogorov-Smirnov testom za testiranje normalnosti porazdelitve meritev SHBG skupine bolnic

Velikost vzorca	9
Najvišja vrednost	72
Najnižja vrednost	13
Povprečna vrednost	31,4
Mediana	27,00
Varianca	385,028
Standardna deviacija	19,6221
Kolmogorov-Smirnov test za normalno distribucijo	P = 0,7400 sprejmemo ničelno hipotezo

b) Dodatno k osnovni statistični analizi smo izrisali grafe, ki nam predstavljajo razporeditev rezultatov glede na analit in skupino (graf št. 1 in 2). Zabož predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v zabožu mediano, ročaji skrajne vrednosti in pike ekstremne meritve, ki bi lahko bile posledica napake.



Graf 5: Porazdelitev meritev testosterona za kontrolno skupino (testosteron1) in skupino bolnic (testosteron2)



Graf 6: Porazdelitev meritev SHBG za kontrolno skupino (SHBG1) in skupino bolnic (SHBG2)

c) Ker sledijo vse skupine rezultatov normalni porazdelitvi, smo izbrali T-test. Ničelno hipotezo smo zavrnili, saj je $P < 0,5$, kar je tudi razvidno iz tabel št. 17 in 18.

Tabela 17: Izsledki T-testa dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni distribuciji za testosteron

Vzorec 1		
Spremenljivka	Testosteron 1	
Vzorec 2		
Spremenljivka	Testosteron 2	
	Vzorec 1	Vzorec 2
Velikost vzorca	54	9
Povprečna vrednost	1,9037	3,1222
95% interval zaupanja	1,6825 to 2,1249	2,2351 to 4,0093
Varianca	0,6566	1,3319
Standardna deviacija	0,8103	1,1541
Standardna napaka srednje vrednosti	0,1103	0,3847
F-test za enakost varianc	P = 0,121	
T-test (za homogenost varianc)		
Razlika	1,2185	
Standardna napaka	0,3108	
95% interval zaupanja za razliko	0,5970 to 1,8400	
Testna statistika t	3,921	
Stopnje prostosti	61	
Dvostranska verjetnost	P = 0,0002	

Tabela 188: Izsledki T-testa dveh neodvisnih vzorcev, ki sledita normalni distribuciji za SHBG

Vzorec 1		
Spremenljivka	SHBG 1	
Vzorec 2		
Spremenljivka	SHBG 2	
	Vzorec 1	Vzorec 2
Velikost vzorca	54	9
Povprečna vrednost	56,9074	31,4444
95% interval zaupanja	49,5323 to 64,2825	16,3615 to 46,5273
Varianca	730,0856	385,0278
Standardna deviacija	27,0201	19,6221
Standardna napaka srednje vrednosti	3,6770	6,5407
F-test za enakost varianc	P = 0,339	
T-test (za homogenost varianc)		
Razlika	-25,4630	
Standardna napaka	9,4220	
95% interval zaupanja za razliko	-44,3035 to -6,6225	
Testna statistika t	-2,702	
Stopnje prostosti	61	
Dvostranska verjetnost	P = 0,0089	

č) Na osnovi podatkov dobljenih iz opredelitve smo izračunali specifičnost in občutljivost obeh testov ter specifičnost in občutljivost za kombinacijo obeh testov (tabela 19).

Tabela 19: Izsledki izračuna specifičnosti in občutljivosti

	Testosteron	SHBG	Testosteron/SHBG kombinacija
Pravilno pozitivni	5	3	8
Pravilno negativni	47	53	46
Nepravilno negativni	4	6	1
Nepravilno pozitivni	7	1	8
Specifičnost (%)	87	98	85
Občutljivost (%)	56	33	88

d) Preverili smo tudi za koliko odstotkov se razhajata parametra specifičnost in občutljivost med testi.

Tabela 20: Primerjava parametrov med testi

	Testosteron s SHBG	Testosteron s kombinacijo	SHBG s kombinacijo
Specifičnost (razlika v %)	11	2	13
Občutljivost (razlika v %)	23	32	55

5. RAZPRAVA

5.1. KONCENTRACIJE TESTOSTERONA IN SHBG

S pridobljenimi serumskimi koncentracijami testosterona in SHBG smo med seboj primerjali skupino bolnic s kontrolno skupino. V analizo smo vključili meritve 9-ih bolnic in 54-tih domnevno zdravih preiskovank.

Za kontrolno skupino smo ugotovili, da je bila povprečna vrednost testosterona $1,9 \pm 0,8$ nmol/L. Najnižja izmerjena vrednost je bila 0,5 nmol/L, najvišja pa je dosegla vrednost 3,9 nmol/L. Referenčno območje za testosteron je 1,0 - 3,0 nmol/L, v tem območju se je nahajalo 81,5% vseh meritev. Pod referenčnim območjem je bilo 5,6% meritev in nad referenčnim območjem 12,9%.

Pri meritvah SHBG smo dobili povprečno vrednost 57 ± 27 nmol/L. Najnižja izmerjena vrednost je bila 17 nmol/L, kot najvišjo smo dobili 144 nmol/L. Referenčni interval 18 -114 nmol/L je zavzel 92,6% vseh meritev, pod referenčnim območjem je bilo 1,9% meritev in nad referenčnim območjem se je nahajalo 5,5%.

Dobljene vrednosti se dobro ujemajo s posameznim referenčnim območjem. Povprečna vrednost dobljena za SHBG se uvrsti med povprečne vrednosti, ki so bile pridobljene na podeželski populaciji na Kitajskem, kjer so raziskovali razne prehranske vplive na plazemske koncentracije nekaterih analitov vključno s SHBG in večjih raziskav na območju ZDA, kjer so iskali povezave med SHBG ter sladkorno boleznijo tip 2. (3, 23)

Pri skupini bolnic smo dobili povprečno vrednost testosterona $3,1 \pm 1,1$ nmol/L. Najnižja izmerjena vrednost je bila 1,3 nmol/L, najvišja pa 4,8 nmol/L. V intervalu referenčnega območja je bilo 44,4% vrednosti, nad referenčnim pa se je nahajalo 55,6%.

Za meritve SHBG smo dobili povprečno vrednost 31 ± 20 nmol/L. Kot najnižjo izmerjeno vrednost smo dobili 13 nmol/L, kot najvišjo pa 72 nmol/L. V referenčnem območju se je nahajalo 66,7% meritev, pod njim pa 33,3%.

Variacija za SHBG je izpadla zelo visoka, vzrok so lahko mnogi procesi v organizmu, ki imajo vlogo pri sintezi ali majhna populacija, ki je bila vključena v analizo.

Pridobljeni povprečji za SHBG in testosteron se približata angleški študiji, ki se je ukvarjala s SHBG kot morebitnim markerjem za inzulinsko rezistenco. (28)

5.2. PRIMERJAVA MED KONTROLNO SKUPINO IN SKUPINO BOLNIC

Kot eno izmed ključnih nalog smo si zadali primerjavo med skupino bolnic in kontrolno skupino. Analiza je pokazala, da so prisotne statistično značilne razlike med skupinama pri obeh merjenih hormonih.

V primeru testosterona se je izkazalo, da je povprečna vrednost v skupini bolnic za 1,6-krat večja kot pri kontrolni skupini. Povprečje za skupino bolnic je namreč 3,1 nmol/L, za kontrolno skupino pa 1,9 nmol/L. Analiza s t-testom nam potrjuje trend, ki je opazen, če primerjamo povprečja, saj je prisotna statistično značilna razlika ($p=0,0002$).

Vrednosti dobljene za SHBG, ki so bile izmerjene pri skupini bolnic, nam dajo povprečje 31 nmol/L, kar je v primerjavi s povprečjem kontrolne skupine (57 nmol/L) opazno nižje. Zadevo nam je potrdil T-test, pri katerem je, kot tudi za testosteron, bila prisotna statistično značilna razlika ($p=0,0089$).

Iz dobljenih rezultatov se lahko sklepa o korelaciji med bolezenskim stanjem in spremembami v koncentracijah analitov. Opažene razlike se navajajo v številnih študijah, vendar niso siguren pokazatelj zaradi heterogenosti obolenja.

5.3. SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST POSAMEZNEGA TESTA TER KOMBINACIJE TESTOV

Za meritve testosterona in SHBG smo potrdili, da obstaja statistično značilna razlika med skupinama, zato smo preverili še uporabnost v diagnostiki. Izračunali smo specifičnost in občutljivost posameznega testa ter njune kombinacije. Glede na test smo uporabili različne kriterije, ki delijo vrednosti na pravilno pozitivne, pravilno negativne, nepravilno negativne in nepravilno pozitivne.

Posamezen test, ki meri bodisi testosteron ali SHBG, slabo zaznava obolele, saj je občutljivost izpadla razmeroma nizka. Izboljšanje je opazno ob združitvi obeh testov v kombinacijo, kjer se vsak pozitiven izid pri enem ali obeh testih šteje kot pozitiven. Za iskanje zdravih sta se posamična testa boljše odrezala kot kombinacija, saj je specifičnost za kombinacijo nekoliko slabša.

6. SKLEP

Namen dela je bil dokaz kliničnega pomena meritev testosterona in SHBG ter uporabe njune kombinacije.

Tekom dela smo prišli do sledečih ugotovitev:

- V kontrolni skupini so povprečne vrednosti testosterona nižje in SHBG višje kot v skupini bolnic ter se gibljejo v srednjem območju med povprečno vrednostjo dobljeno z študijo, za katero so opravljali meritve na ženskah s kitajskega podeželja leta 1996 (23) in povprečnimi vrednostmi, ki so bile pridobljene na območju ZDA med leti 2006 in 2012 (3).
- Izmerjene vrednosti testosterona so statistično značilno višje v skupini bolnic in izmerjene vrednosti SHBG so statistično značilno nižje v skupini bolnic, kar sledi trendu, ki je nakazan v raziskavi povezave med inzulinsko rezistenco ter SHBG leta 2003 (28).
- Za posamezen analit je občutljivost slabša kot če uporabimo kombinacijo obeh.
- Kot najzanesljivejša metoda za uporabo v rutinskem delu bi bila kombinacija obeh.
- Zaradi heterogenosti izmerjenih vrednosti v skupinah bi bilo zaželeno razširiti preiskavo na večji vzorec preiskovank.

7. LITERATURA

1. Kidson, W. 2011. Polycystic ovary syndrome. Australian doctor. Dostopano 17.10.2012,
<http://www.australiandoctor.com.au/cmspages/getfile.aspx?guid=4aadb9b-0ab7-446d-8e89-3542e63d2869>
2. Košir, R., Meden-Vrtovec, H., Vloga metformina pri obravnavi bolnic s sindromom policističnih jajčnikov. Zdravstveni Vestnik (2009) : številka 78 : strani 137-140
3. Le, T. N., Nestler, J. E., Straus III, J. F., Wickham, E. P., Sex hormone binding globulin and type 2 diabetes mellitus. Trends in Endocrinology & Metabolism (2012) : številka 1 : strani 32-40
4. Salem, H. M., Hadhoud, K. M., Saad, M. S. S., Baraka, A., Study of Sex Hormone-Binding Globulin in Type 2 Diabetes Mellitus. Journal of American Science (2011) : številka 12 : strani 1266-1271
5. Keck, C., Neulen, J., Behre, M. H., Breckwoldt, M., Endokrinologie Reproduktionsmedizin Andrologie 2.Auflage, Stuttgart: New York: Georg Thieme Verlag (2002): strani 2-16.
6. Linos, D., van Heerden, J. A., Adrenal Glands Diagnostic Aspects and Surgical Therapy, Berlin Heidelberg : Springer-Verlag (2005) : strani 23-25
7. Jameson, J.L., Harrison's Endocrinology 2nd edition. ZDA : McGraw-Hill Companies, Inc. (2010) : strani 216-220, 245, 249-250, 259-263, 267-268, 271-272
8. Štiblar-Martinčič, D., Cör, A., Cvetko, E., Marš, T., Legan, M., ANATOMIJA, histologija, fiziologija. Ljubljana : Medicinska fakulteta (2008) : strani 83-87, 89-90

9. Lovejoy, D. A., Neuroendocrinology An Integrated Approach. Chichester-England : John Willey & Sons Ltd. (2005) : strani 254-255, 279-282, 290-293
10. Nieschlag, E., Behre, H. M., Testosterone Action Deficiency Substitution. Cambridge : Cambridge University Press (2004) : stran 23
11. Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition. ZDA : The McGraw-Hill Companies, Inc. (2008) : strani 301-303
12. Azziz, R., CONTROVERSY IN CLINICAL ENDORCRINOLOGY Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. The Journal of Clinial Endocrinology & Metabolism (2006) : številka 3 : strani 781-785
13. Martin, K. A., Chang, R. J., Ehrmann, D. A., idr., Evaluation and Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guidline. The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2008) : številka 4 : strani 1107-1119
14. Tišler, M., Vpliv različnih postopkov zunajtelesne oploditve na koncentracijo steroidnih hormonov v krvi. Diplomsko delo, Ljubljana (2012) : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
15. Blake, M. A., Boland, G. W. L., Adrenal Imaging, Totowa : Humana Press (2009) : stran 66
16. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. Dostopano: 13.12.2012, <http://www.endotext.org/male/male3/maleframe3.htm>
17. Bowen, R. A., Steroidogenesis. Dostopano 18.11.2012, <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/steroidogenesis.html>
18. Dockter, K., Reproductive System. Dostopano 24.7.2012, <http://kristindockter.wikispaces.com/Reproductive+System>

19. Menstrual Cycle. WIKIMEDIA-COMMONS. Dostopano 24.7.2012,
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle.png>
20. Burger, H. G., Androgen production in women. Princeton : Elsevier Science Inc. (2002): strani 3-5
21. Mulhall, J. P., Incrocci, L., Goldstein, I., Rosen, R., Cancer and Sexual Health. New York : Humana Press (2011) : strani 55-57
22. Awakumov, G. V., Cherkasov, A., Muller, Y. A., Hammond, G. L., Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. Molecular Cell Endocrinology (2010) : številka 316 : strani 13-23
23. Gates, J. R., Parpia, B., Cambell, T. C., Chen, J., Association of dietary factors and selected plasma variables with sex hormone-binding globulin in rural Chinese women. The American Journal of Clinical Nutrition (1996) : številka 63 : strani 22-24
24. DiaSorin : TESTO-CTK (P3093), Navodila za uporabo
25. Kaihola, L., The gamma counting handbook. Turku : Wallac Oy (1997)
26. Siemens Medical : IMMULITE® SHBG, Navodila za uporabo
27. Symple ROC Curve Analysis. Kurt Rossman Laboratories. Dostopano 10.1.2013,
<http://www.vassarstats.net/roc1.html>
28. Jayagopal, V., Kilpatrick, E. S., Jennings, P. E., Hepburn, D. A., Atkin, S. L., The Biological Variation of Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) in Polycystic Ovarian Syndrome: Implications for SHBG as a Surrogate Marker of Insulin Resistance. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2003) : strani 1528-1533

29. Zadeh-Vakili, A., Tehrani, F. R., Hashemi, S., Amouzegar, A., Azizi, F., Relationship between Sex Hormone Binding Globulin, Thyroid Stimulating Hormone, Prolactin and Serum Androgens with Metabolic Syndrome Parameters in Iranian Women of Reproductive Age. *Journal of Diabetes & Metabolism* (2012) : številka 8 : strani 1-6