

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA PLOJ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

LJUBLJANA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA PLOJ

**DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROSTAGLANDINA F2-ALFA KOT
POKAZATELJA BOLEČINE PRI ABLACIJI ENDOMETRIJA S TOPLOTNIM
BALONOM**

DETERMINATION OF PROSTAGLANDIN F2-ALPHA CONCENTRATION AS A PAIN
INDICATOR IN PATIENTS UNDERGOING THERMAL BALLOON ENDOMETRIAL
ABLATION

LJUBLJANA, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za usmeritve in strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Hvala vama, draga starša, ker sta mi omogočila študij, in za vso podporo ter razumevanje tekom študija.

Hvala tudi tebi, Gašper, za tvojo potrpežljivost in spodbudo. Ti in najina otroka ste mi motivacija v življenju.

Najlepša hvala tudi ostali družini in vsem prijateljem, ki ste mi stali ob strani.

Izjava

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

Anja Ploj

Ljubljana, junij 2015

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	MENSTRUACIJSKI CIKEL	1
1.2	NENORMALNE KRVAVITVE IZ MATERNICE.....	3
1.3	BOLEČINA.....	8
1.3.1	DEFINICIJA BOLEČINE.....	8
1.3.2	TEORIJA BOLEČINE.....	8
1.3.3	FIZIOLOGIJA BOLEČINE	9
1.3.4	BOLEČINSKI DRAŽLJAJI IN NJHOVI MEDIATORJI V TELESU.....	10
1.3.5	VRSTE BOLEČINE	10
1.3.6	ZDRAVLJENJE BOLEČINE	12
1.4	PROSTAGLANDINI	13
2	NAMEN DELA	17
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	METODA A (ELISA TEST PROIZVAJALCA ABCAM)	18
3.2	METODA B (EIA TEST PROIZVAJALCA CAYMAN)	23
3.3	ABLACIJA ENDOMETRIJA S TC TOPLOTNIM BALONOM	25
3.4	STATISTIČNA ANALIZA.....	28
4	REZULTATI	30
4.1	PRIMERJAVA METODE A IN METODE B	30
4.2	NATANČNOST METODE A.....	32
4.3	KORELACIJA MED SERUMOM IN PLAZMO (HEPARIN).....	35
4.4	OPIS SKUPIN	36
4.5	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	41
5	RAZPRAVA	50
6	SKLEP	54

7	LITERATURA	55
8	PRILOGE	59

POVZETEK

Disfunkcijske krvavitve so obilne, podaljšane in/ali pogoste krvavitve iz maternice v reproduktivnem obdobju žensk, ki niso organskega izvora. Negativno vplivajo na žensko zasebno, družabno in profesionalno življenje ter tako poslabšajo kakovost življenja. Ob neuspešnosti zdravljenja disfunkcijskih krvavitev z zdravili se poslužujemo kirurških tehnik. Med enostavnejše in manj invazivne metode spada ablacija endometrija s toplotnim balonom. Med in po posegu se lahko pojavi bolečina, katere vzrok naj bi bila povišana koncentracija endometrijskega prostaglandina F2-alfa.

V diplomski nalogi smo izvedli primerjavo dveh metod (metode A: ELISA test proizvajalca Abcam in metode B: EIA test proizvajalca Cayman), s katerima smo določali koncentracijo prostaglandinov F2-alfa v 100 vzorcih seruma. Gre za kompetitivna encimskoimunska testa dveh različnih proizvajalcev. Ugotovili smo, da je korelacija (povezanost) med meritvami, dobljenimi z obema metodama, odlična, saj je bil korelacijski koeficient (r) 0,99. Da sta metodi primerljivi, smo prikazali z Bland-Altmanovim testom. Odločili smo se, da bomo za določanje koncentracij prostaglandinov F2-alfa v naši študiji uporabili metodo A.

Na podlagi rezultatov, pridobljenih z metodo A, smo določali ponovljivosti v dnevu in med dnevi ter ugotovili, da sta odlični. Koeficienti variacije so bili pri ponovljivosti v dnevu manjši od 15 %. Med dnevi pa je bil koeficient variacije pri nizkih vrednostih koncentracij prostaglandinov F2-alfa 5,3 %, pri srednjih vrednostih 4,6 % in pri visokih vrednostih koncentracij prostaglandinov F2-alfa 4,4 %.

V nadaljevanju smo zbrali 87 vzorcev krvi in z metodo A analizirali prostaglandine F2-alfa v serumu in heparinizirani plazmi. Rezultati so pokazali, da je korelacija (povezanost) med njima odlična ($r = 0,99$).

Ugotavljali smo, kakšna je zaznava bolečine preko določitve koncentracije prostaglandinov F2-alfa. V analizo smo vključili 40 žensk z disfunkcijskimi krvavitvami. Ablacijo endometrija s Thermachoice II toplotnim balonom so opravili na Kliničnem oddelku za ginekologijo na UKC Ljubljana. Pacientke smo razdelili na dve skupini, in sicer na skupino, katerim je bil poseg opravljen v proliferacijski fazi menstruacijskega ciklusa, ter skupino, katerim je bil poseg opravljen v sekrecijski fazi. 1. skupina je vsebovala 14 pacientk, 2. skupina pa 26 pacientk. Vsaki pacientki so vzeli 3 epruvete venske krvi (tik pred posegom (t_1), takoj ob koncu posega (t_2) in 60 minut po zaključenem posegu (t_3)). Koncentracijo prostaglandinov F2-alfa smo določili v zamrznjenih vzorcih in sicer na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo

in biokemijo. Dokazali smo, da obstajajo statistično pomembne razlike v obeh skupinah med koncentracijami prostaglandinov F2-alfa pri časih t1, t2 in t3. Nismo pa uspeli ugotoviti razlike med skupinama, ker so rezultati preveč variabilni, da bi to lahko pokazali. Na podlagi naših rezultatov smo zavrnilo hipotezo, da so srednje vrednosti koncentracij prostaglandinov F2-alfa nižje pri pacientkah v proliferacijski fazi ciklusa kot v sekrecijski fazi, v kateri je debelina endometrija večja.

ABSTRACT

Dysfunctional uterine bleedings are heavy, prolonged and/or frequent bleedings from the uterus without an organic cause in women of reproductive age. Dysfunctional uterine bleedings can have a negative impact on women's personal, social and professional lives, and thus impair their quality of life. If treatment with drugs is not successful, surgical techniques are used. Thermal balloon endometrial ablation is one of the most simple and less invasive methods for treatment of dysfunctional uterine bleedings. Pain experienced in patients during and after the procedure is presumably caused by elevated concentration of endometrial prostaglandin F2-alpha.

In our research we compared two methods (method A: ELISA of manufacturer Abcam and method B: EIA of manufacturer Cayman), by which we determined the concentration of prostaglandin F2-alpha in 100 serum samples. This is a competitive assay of two different manufacturers. We found that the correlation between the measurements obtained by the two methods is perfect, since the correlation coefficient (r) is 0,99. With the Bland-Altman test we showed that the methods are comparable. We decided that we will use the method A in our study to determine the concentrations of prostaglandin F2-alpha.

Based on the results obtained with the method A we determined the intra-assay and inter-assay repeatability and found they are excellent. Intra-assay coefficients of variability were lower than 15 %. Inter-assay coefficients of variability at low concentrations of prostaglandin F2-alpha were 5,3 %, at middle concentrations 4,6 % and at high concentrations 4,4 %.

We collected 87 blood samples and determined prostaglandin F2-alpha concentrations in serum and heparinized plasma with method A. The results show that the correlation between them is excellent ($r = 0,99$).

In our research we were assessing the perception of pain through determining the concentration of prostaglandin F2-alpha. 40 women with defined dysfunctional uterine bleedings participated in the research. Endometrial ablation with Thermachoice thermal balloon was conducted in the Clinical Department of Gynaecology at the University Medical Centre Ljubljana. We divided them into two groups based on cycle phase, proliferative and secretory phase. There were 14 patients in the first group and 26 patients in the second group. We took 3 tubes of venous blood from every patient (right before the procedure (t_1), immediately after the end of the intervention (t_2) and 60 minutes after the completion of the procedure (t_3)). Determination of prostaglandin F2-alpha was performed in frozen samples at

the Clinical Institute of Clinical Chemistry and BioChemistry. We proved that there are statistically significant differences in both groups between the concentrations of prostaglandin F2-alpha at times t1, t2 and t3. But we have not managed to identify the differences between the two groups because the results are too variable, that this could be demonstrated. Based on our results, we rejected the hypothesis that the average concentrations of prostaglandin F2-alpha are lower in female patients in the proliferative phase of cycle than in the secretory phase, in which the endometrial thickness is greater.

SEZNAM OKRAJŠAV

AP	alkalna fosfataza
AchE	acetilholin esteraza
COX	ciklooksigenaza
CŽS	centralni živčni sistem
ELISA	encimskoimunski test
FSH	folikel stimulirajoči hormon
GnRH	gonadoliberin (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
KV	koeficient variacije
LH	luteinizirajoči hormon ali luteotropin
NSAR	nesteroidni antirevmatiki
NSB	nespecifična vezava vdolbinic
OD	optična gostota
OKC	kombinirani oralni kontraceptivi
PG	prostaglandini
pNpp	p-nitrofenilfosfat, dinatrijeva sol
TA	totalna aktivnost vdolbinic
TC	Thermachoice toplotni balon
TX	tromboksani
VAS	vizualna analogna skala za oceno bolečine

1 UVOD

1.1 MENSTRUACIJSKI CIKEL

Menstruacijski ciklus se začne v razvojni dobi med 9. in 16. letom starosti ženske, ko pričnejo v jajčnikih dozorevati jajčni mehurčki oz. jajčeca. Ciklus se preneha, ko jajčeca ne dozorevajo več; obdobje od zadnje menstruacije naprej imenujemo menopavza. Menopavza nastopa med 45. in 55. letom (1, 2). Dogodka omejujeta rodno (fertilno) obdobje v življenju vsake ženske. V tem obdobju se pojavljajo menstruacije, ki so znak spolne zrelosti (3).

Normalna menstruacija (menzes, čišča, perilo, perioda) je občasno (periodično) luščenje sekretorno spremenjene maternične sluznice (endometrija), in sicer kot posledica delovanja hipotalamo-hipofizno-ovarijskega sistema (3). Cikel lahko opredelimo glede na pogostost, trajanje in jakost menstrualne krvavitve, ki se običajno pojavlja na 28 dni. Za še normalni ciklus štejemo, če je interval daljši kot 21 dni in krajši kot 35 dni. Krvavitev navadno traja od 3 do 5 dni, če pa je daljša kot 7 dni, pomeni, da je nepravilna (patološka). Povprečna izguba krvi med menstruacijo je od 40 do 60 mL, prekomerna pa krvavitev, večja od 80 mL (1, 2, 3).

Normalen menstruacijski ciklus uravnavajo (3):

- hipotalamus
- možganski privesek (hipofiza)
- jajčnika (ovarija)
- maternična sluznica (endometrij) in drugi deli genitalnega trakta ter
- normalna medsebojna povezava med hipotalamusom, hipofizo in ovariji; ta mehanizem imenujemo mehanizem povratnih zvez ali medsebojnega delovanja (feedback mehanizem)

V jajčnikih poteka ciklično in vzporedno dozorevanje jajčec in tvorba spolnih hormonov: estrogenov, progesterona in androgenov. Ta dva procesa uravnavata hipotalamus in hipofiza. Hipotalamus z izločanjem gonadoliberina (*gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) nadzira izločanje dveh gonadotropnih hormonov folikulotropina ali folikle stimulirajočega hormona (FSH) in luteotropina ali luteinizirajočega hormona (LH) iz hipofize, ki delujeta na jajčnike (4). Ciklus najpogosteje opredeljujemo glede na spremembe v jajčnikih (ovarijski ciklus) in po spremembah v sluznici maternice (endometrijski ciklus) (5).

Slika 1 prikazuje potek faz menstruacijskega ciklusa. Začetek menstruacije pomeni prvi dan ciklusa in traja približno 3–5 dni. Maternična sluznica (endometrij) se razgradi, kar se pokaže

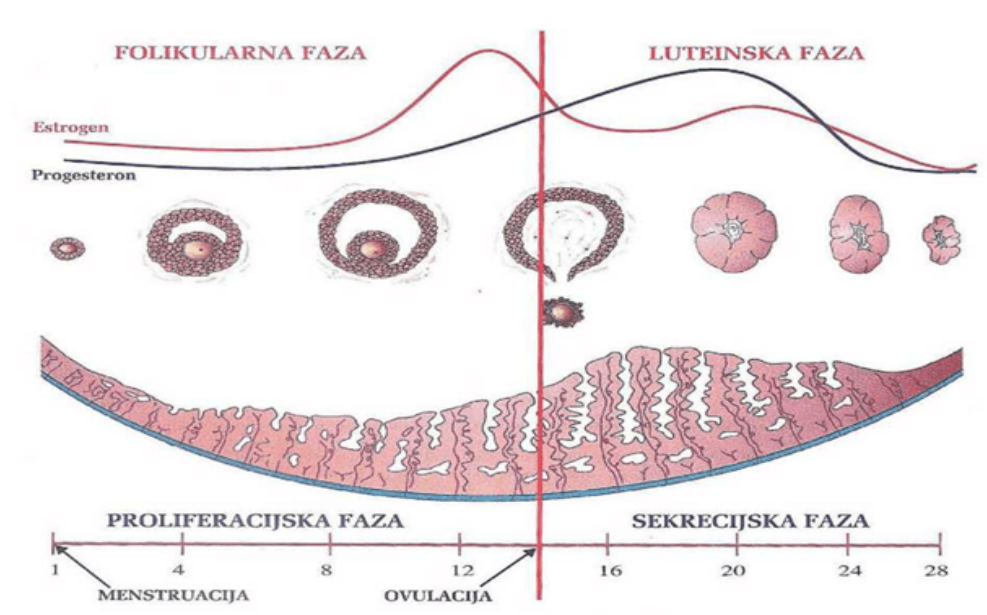
kot tekoča kri temne barve z delčki endometrija in sluzi. Delovanje jajčnikov je v tej fazi minimalno, zato je raven hormonov nizka. Ker je raven estrogena nizka, hipofiza pospešeno sprošča FSH nad LH. Ta proces se začne že na koncu prejšnjega ciklusa in se nadaljuje skozi to fazo (6).

Od 6. do 12. dne ciklusa poteka proliferacijska oz. folikularna faza. FSH stimulira razvoj foliklov, od katerih vsak vsebuje jajčece. Do konca se razvije le en folikel, iz katerega se sprostijo zrelo jajčece (2, 3, 6). Dozorevajoče jajčece sprošča estrogene, ki potujejo po krvi do hipotalamusa in hipofize ter zavrejo izločanje FSH. Vzpostavi se ravnotežje in zato v krvi ni nikoli preveč estrogenov ali FSH. Žleze se na ta način medsebojno uravnavajo (4). Povečana količina estrogenov pa hkrati povzroči povečano tvorbo in sproščanje LH (2, 6).

Naslednja faza se imenuje ovulacija, ki nastopi med 13. in 15. dnevom ciklusa. LH je skupaj s FSH omogočil sprostitve zrelega jajčeca iz počenega folikla. Endometrij se vidno zadebeli tekom 14 dni in je v času ovulacije debel 3–4 mm (2, 6).

Za ovulacijo sledi sekrecijsko oz. lutealno obdobje, ki traja od 16. do 28. dneva. Tu se pod vplivom LH prazen folikel spremeni v rumeno telesce, imenovano corpus luteum. Le-ta izloča hormon progesteron, ki deluje na sluznico maternice. Pod njegovim vplivom se debeli (5–6 mm), postane močno prekrvavljena in pripravljena na sprejem oplojenega jajčeca (2, 6).

Če pripotuje neoplojeno jajčece, se rumeno telesce degenerira, raven estrogenov ter progesterona pa pade. Padec hormonov povzroči krčenje arteriol, kar vodi v nekrozo endometrija. Na koncu visoke koncentracije prostaglandinov povzročijo krčenje materničnega mišičja – nastopi menstrualna krvavitev oz. prvi dan ciklusa (2, 6).



Slika 1: Predstavitev faz menstruacijskega ciklusa

1.2 NENORMALNE KRVAVITVE IZ MATERNICE

Nenormalne krvavitve iz maternice predstavljajo vzrok za približno tretjino obiskov žensk v ginekološki ordinaciji in približno četrtno manjših ali večjih operativnih posegov (2). Definirane so kot vsaka oblika krvavitve, ki je nepravilna po količini, trajanju ali pogostosti. Kot nenormalne označujemo krvavitve, ki so čezmerne (z izgubo krvi, večjo od 80 mL) in se pojavijo v času pričakovane menstruacije (menoragija), močne krvavitve v neprimernem času (metroragija), kombinacija obeh (menometroragija), krvavitve med dvema menstruacijama (medmenstrualna krvavitev) ali krvavitve, ki se pojavljajo v intervalih, daljših od 35 dni (oligomenoreja) (2, 7). Nenormalne krvavitve iz maternice so organskega ali funkcionalnega izvora (8).

Nenormalne krvavitve organskega vzroka

Organske vzroke nenormalnih krvavitev lahko razdelimo v tri glavne kategorije: medenična patologija, sistemske bolezni in jatrogene vzroke (preglednica I). Pri ugotavljanju organskih vzrokov nenormalnih krvavitev moramo preučiti zgodovino pacienta, opraviti zdravniški pregled, temeljito laboratorijsko in ginekološko preiskavo z ultrazvokom in odvzemom vzorca maternične sluznice (9, 10).

Preglednica I: *Organski vzroki nenormalnih krvavitev iz maternice (10)*

I. Medenična patologija	A. Benigna (nosečnost, miomi, adenomioza, endometrioza, polipi endometrija/materničnega vratu, medenične vnetne bolezni, okužbe genitalnega trakta/rodil) B. Maligna (karcinom reproduktivnega trakta, hiperplazija endometrija)
II. Sistemske bolezni	A. Motnje v strjevanju krvi (trombocitopatija, Von Willenbrandova bolezen, levkemija) B. Bolezni ščitnice C. Sistemska lupus eritematoza D. Jetrna obolenja
III. Jatrogeni vzroki	A. Zdravila (pomirjevala, antidepresivi, antikoagulantni, kortikosteroidi) B. Hormonsko nadomestno zdravljenje C. Kontracepcijski pripomočki in injekcije

Nenormalne krvavitve funkcionalnega izvora (disfunkcijske krvavitve)

Disfunkcijske krvavitve so obilne, podaljšane in/ali pogoste krvavitve iz maternice (11). Diagnozo lahko postavimo šele, ko izključimo organske vzroke za nenormalne krvavitve.

Pojavljajo se kadarkoli v obdobju med menarho in menopavzo, torej v reproduktivnem obdobju žensk. Lahko so anovulacijske ali ovulacijske (3, 10, 11).

Anovulacijske disfunkcijske krvavitve

Anovulacijske disfunkcijske krvavitve so posledica motnje delovanja povratnih zvez med hipotalamusom, možganskim priveskom in jajčniki. Pojavljajo se bolj na začetku ali na koncu reproduktivnega obdobja žensk, ko se izločanje hormonov še ni ustalilo oz. ko začnejo hormoni upadati. Ker ne pride do ovulacije, progesteron ne nastaja. Podaljšano delovanje estrogenov vodi do debelitve in hiperplazije maternične sluznice. Brez progesterona ne pride do sekretorne spremembe maternične sluznice in tako postane krhka, kar vodi do dolgotrajnega in nepravilnega luščenja endometrija. Rezultat je nepravilna krvavitev glede na pojavljanje, količino in trajanje (3, 9, 10, 11, 12, 13).

Ovulacijske disfunkcijske krvavitve

Pojavijo se pri 80 % žensk v reproduktivnem obdobju (13). Ovulacijske disfunkcijske krvavitve se kažejo s čezmernimi krvavitvami, ki so povezane s padcem progesterona pri pričakovanih menstruacijah vsakih 21–35 dni. Najpogosteje gre za nezadostno ali nepravilno, največkrat kratkotrajno delovanje rumenega telesca. To so krvavitve iz sekrecijsko preobraznega endometrija, zato so količinsko šibkejše kot krvavitve pri anovulacijskih motnjah. Vzroki za skrajšano lutealno fazo so osrednji ali periferni. Pri osrednji motnji gre za spremenjeno frekvenco in amplitudo izločanja GnRH, ki spremeni koncentracijo FSH, tako da je v celotnem ciklusu zmanjšana. Rumeno telesce doseže vrh delovanja takoj po ovulaciji, celotno izločanje progesterona je zmanjšano, preobrazba endometrija pa nepopolna. Poleg sprememb v osrednjih regulacijskih mehanizmih je lahko vzrok za skrajšano lutealno fazo periferni oz. ovarijski. Folikli niso zmožni normalne steroidogeneze zaradi motenj na ravni celic teke in granuloznih celic (12).

Po ovulaciji je zato luteinizacija nepopolna, izločanje progesterona je zmanjšano, življenjska doba rumenega telesca pa kratka. Pri nezadostnem delovanju rumenega telesca gre za lokalno okvarjene mehanizme oz. neusklajenost encimskih in hormonskih dejavnikov, ki so odgovorni za nastajanje rumenega telesca. Menstruacijski ciklusi so po ritmu normalni, menstruacijske krvavitve pa so dolgotrajnejše z značilnim predmenstruacijskim krvavim izcedkom (12). Pogosto se pojavljajo pri ženskah v 30. letih (13).

NAČINI ZDRAVLJENJA DISFUNKCIJSKIH KRVAVITEV

Odločitev za vrsto zdravljenja je odvisna od starosti bolnice, izpolnjenosti fertilne funkcije, načina življenja, splošnega zdravstvenega stanja in ginekološkega statusa (8). Zdravljenje je lahko farmakološko ali kirurško. Prvi izbor v reproduktivnem obdobju je zdravljenje z zdravili, če le-to ni uspešno ali so stranski učinki nevzdržni, pa zdravimo kirurško (2).

FARMAKOLOŠKO ZDRAVLJENJE

Je prvi in izbirni način zdravljenja. Odločimo se lahko za nehormonsko ali hormonsko zdravljenje. Prednost takega zdravljenja je predvsem v neinvazivnosti. Farmakološko zdravljenje pa ima tudi nekaj slabih lastnosti: uspešnost ne presega 50–60 %, zdravljenje je dolgotrajno (lahko vse do menopavze), stranski učinki se pojavljajo pri 40 %, pogosto ga bolnice odklanjajo ali slabo prenašajo, neredko pa je pri določenih bolnicah kontraindicirano. Zaradi vpliva na druge organe lahko nekatera od teh zdravil uporabljamo le krajši čas (2).

NEHORMONSKO ZDRAVLJENJE

Antifibrinolitiki (traneksamična kislina in epsilon-amino-kapronska kislina)

Ta zdravila zmanjšajo izgubo menstrualne krvi za približno 50 %, tako da inhibirajo fibrinolizo (14). Raziskave so pokazale, da so za zdravljenje obilnih krvavitev učinkovitejša od peroralnih gestagenov in nesteroidnih antirevmatikov (2, 15).

Nesteroidni antirevmatiki NSAR (diklofenak, ibuprofen, indometacin, meklofenamična kislina in mefenamična kislina)

NSAR zmanjšajo izgubo menstruacijske krvi za 12–50 % in sicer z vplivom na sintezo prostaglandinov. Pri zdravljenju disfunkcijskih krvavitev so manj uspešni od traneksamične kisline in danazola, ni pa ugotovljena razlika v učinkovitosti v primerjavi s peroralnimi gestageni, kombiniranimi peroralnimi kontraceptivi ali materničnim vložkom z levonorgestrelom (2).

HORMONSKO ZDRAVLJENJE

Kombinirani peroralni kontraceptivi OKC (kombinacija derivatov estrogena in progestagena)

So inhibitorji ovulacije, povzročijo atrofijo endometrija, vplivajo na koagulacijo in fibrinolizo ter zmanjšajo sintezo prostaglandinov v endometriju (2, 9). Študija ni pokazala razlike v učinkovitosti zdravljenja disfunkcijskih krvavitev v primerjavi z mefenamično kislino, danazolom ali naproksenom (15).

Peroralni gestageni

Delujejo antiestrogeno, ker zmanjšajo število estrogenskih receptorjev in zavirajo mitotično aktivnost celic. Uporabljajo se za urejanje menstrualnega ciklusa tako pri mladostnicah (za redne ovulacije) kot tudi pri perimenopavzalnih ženskah, pri katerih so pogosto prisotne anovulatorne disfunkcijske krvavitve (2).

Androgeni (danazol)

Je derivat 17- α -etinil-testosterona, ki inhibira ovulacijo in povzroči atrofijo endometrija. Izgubo menstrualne krvi lahko zmanjša kar za 86–90 %, vendar povzroča veliko stranskih učinkov: zvišanje telesne teže, androgene učinke, mišične krče, zato je uporaba omejena le na nekaj mesecev (9).

Agonisti GnRH

V prvi fazi delovanja intenzivno spodbujajo sintezo in sproščanje LH in FSH, čemur sledi inhibicija sinteze in sproščanja gonadotropinov. Dolgotrajna terapija ni priporočljiva zaradi pojava hipoestrogenizma in razvoja osteoporoze (2, 9, 15).

Maternični vložek z levonorgestrelom

Poleg kontracepcijskega učinka ga uporabljamo za zdravljenje disfunkcijskih krvavitev. Deluje tako, da stanjša maternično sluznico in poveča viskoznost sluzi v materničnem vratu, ki tako postane slabo prehodna za spermije (3). Izgubo menstrualne krvi zmanjša za kar 97 % (15). Pri tem je mnogo bolj učinkovit kot NSAR, OKC, antifibrinolitiki in druge farmakološke terapije. Primerjava s histerektomijo oz. kirurško ablacijo endometrija po enem in petih letih je pokazala enako izboljšanje zdravstvenega in psihosocialnega stanja ob minimalni invazivnosti in najnižji ceni (2).

KIRURŠKO ZDRAVLJENJE

Disfunkcijske krvavitve zdravimo tudi kirurško s abrazijo, histerektomijo ali z najsodobnejšim in minimalno invazivnim načinom odstranitve maternične sluznice – ablacijo endometrija (16).

Abrazija

Abrazija ali kiretaža je postopek, s katerim v splošni ali lokalni anesteziji z dilatatorji postopoma razširimo kanal materničnega vratu ter postrgamo sluznico iz materničnega vratu in maternične votline s pomočjo kirete. Ni dokončna rešitev problema, saj je njena uspešnost

manjša kot 40 % in je upravičena le pri močni, življenje ogrožajoči krvavitvi. Prednost kiretaže pa je v tem, da omogoča histološki pregled maternične sluznice (16).

Histerektomija

Histerektomija ali odstranitev maternice je lahko vaginalna ali abdominalna. Je edino zdravljenje, ki zagotavlja zanesljivo končno rešitev, vendar ima veliko možnih zapletov, celo umrljivost, potrebna je hospitalizacija bolnic in nekaj tednov okrevanja, kar je povezano z visokimi stroški zdravljenja. Možni stranski učinki so psihološke in hormonske motnje ter motnje v statiki medeničnega dna (16).

Ablacija endometrija

Gre za odstranitev bazalne plasti maternične sluznice za vsaj 5 mm zaradi njene sposobnosti obnavljanja (17). Prednosti pred histerektomijo so manjša pooperativna bolečina, krajše okrevanje in s tem povezani manjši stroški zdravljenja ter manj stranskih učinkov. Postopek je uspešen pri 85–90 % bolnicah (po posegu nimajo več menstruacije, ali pa je le-ta šibka ali normalna) (9). Obstajata dve generaciji metod ablacije endometrija: histeroskopske in nehisteroskopske. Histeroskopija je metoda, pri kateri s pomočjo tanke kamere (histeroskopa) pregledamo notranjost maternice skozi maternični vrat (18).

1. generacija – histeroskopske ablacije (16):

- transcervikalna resekcija endometrija z električno endozanko
- transcervikalna resekcija endometrija z električno endokroglico
- laserski razkroj endometrija z Nd-YAG laserjem

Prednost histeroskopske ablacije je, da nam omogoča neposreden pregled notranjosti maternične votline in je hkrati diagnostični in terapevtski postopek, saj omogoča histološki pregled odstranjene sluznice (2). Slabe strani so potreba po bolj izkušenih kirurgh, lokalni ali sistemski anesteziji, možnost preobremenitve bolnice s tekočino, predrtje maternice in predoperativno tanjšanje maternične sluznice z danazolom ali agonisti GnRH (19).

2. generacija – nehisteroskopske ablacije (16):

- ablacija s toplotnim balonom
- ablacija z bipolarnimi elektrodami
- ablacija s toplo krožečo fiziološko raztopino
- fototerapija
- mikrovalovna ablacija
- radiofrekvenčna ablacija

So enostavnejše in manj invazivne metode ablacije endometrija, kjer ni potrebna izkušnost kirurga v histeroskopski kirurgiji. Zaradi odsotnosti neposrednega nadzora nad operacijo lahko pride do predrtja maternice (2, 15). Od naštetih nehisteroskopskih metod na Ginekološki kliniki v Ljubljani od leta 2001 uporabljajo ablacijo endometrija s toplotnim balonom (Thermachoice, Gynecare, Johnson&Johnson, ZDA) (16).

1.3 BOLEČINA

Bolečina je del našega življenja, ki nas spremlja vse do smrti. Predstavlja pomemben medicinski, družbeni, socialni in ekonomski problem (20). Ima pomembno obrambno vlogo, saj nas obvešča o zunanji ali notranji nevarnosti za naše telo. Varuje nas pred trajnimi poškodbami, saj človek refleksno reagira na bolečino tako, da odstrani telo iz območja poškodbe (21). Bolečina je tudi klinični znak bolezni in je pomemben anamnestični in diagnostični podatek (20). Vendar pa določene bolečine, kot je bolečina po operaciji, nimajo biološkega smisla in predstavljajo problem, saj zmanjšajo kakovost življenja in poslabšajo socialno stanje. Zato je pomembno, da neznosno bolečino te vrste odpravimo ali vsaj olajšamo (20).

1.3.1 DEFINICIJA BOLEČINE

Definicija bolečine, ki jo je privzelo Mednarodno združenje za preučevanje bolečine (International Association for the Study of Pain), pravi, da je bolečina neprijetna senzorična in čustvena izkušnja, povezana z dejansko ali možno okvaro tkiva, in ki jo opisujemo z izrazi, ki opisujejo okvaro tkiva. Vendar vemo, da vsaka okvara tkiv ne povzroči bolečine (na primer zgodnja faza rakave bolezni) in da vsako bolečinsko stanje (na primer glavobol) ni posledica poškodbe tkiva. Na doživljanje bolečine močno vplivajo posameznikove izkušnje, vzgoja in družbeno pogojene vedenjske norme (5).

1.3.2 TEORIJA BOLEČINE

Mehanizme za zaznavo bolečine sta najbolj razložila Melzack in Wall v svoji teoriji vrat. Izpostavila sta, da ima osrednje živčevje pomembno vlogo pri sprejemanju in predelavi informacij o bolečini. Teorija vrat temelji na postavki, da škodljive dražljaje iz okolja zaznajo prosti živčni končiči, katerih tanka vlakna A δ in C v perifernih živcih posredujejo to informacijo v osrednje živčevje. Hkrati se vzdražijo tudi receptorji z nizkim pragom, ki

povečajo prevajanje po svojih debelih mieliniziranih vlaknih z naraščanjem jakosti dražljaja. Ti prilivi modulirajo vzdražnost sekundarnih nevronov (nenociceptivni aferentni priliv ga vzdraži, nociceptivni pa inhibira). Na modulacijo vzdražnosti sekundarnih nociceptivnih nevronov vplivajo tudi descendenti regulatorni mehanizmi iz višjih centrov (vrata priprejo) (22).

1.3.3 FIZIOLOGIJA BOLEČINE

Receptorje za zaznavanje bolečinskih dražljajev imenujemo nociceptorji. Ti pretvarjajo mehanične, kemične in/ali termične dražljaje v zaporedja akcijskih potencialov (transdukcija), ki po njihovih aksonih potujejo v zadnje robove hrbtenjače (transmisija) (22). Tu poteka večji del procesiranja in moduliranja le-teh in njihovo prevajanje na višje možganske nivoje in končno v možgansko skorjo, kjer bolečino zaznamo in se je zavemo (21). Poznamo tri vrste nociceptorjev (23):

- mehanoreceptorje z visokim pragom, ki se odzivajo na mehanične dražljaje
- mehano-termoreceptorje z visokim pragom, ki se odzivajo na mehanične in termične dražljaje
- polimodalne nociceptorje, ki imajo še višji prag vzdražnosti in se neselektivno odzivajo na mehanične, termične in kemične dražljaje

Vsem trem je skupno, da imajo visok prag vzdražnosti in slabo prilagodljivost na dražljaj, kar pomeni, da se na dlje časa trajajoč dražljaj ne prilagodijo s prenehanjem proženja akcijskih potencialov, temveč vzdržujejo proženje (5).

Poznamo dvojico različnih primarnih bolečinskih vlaken (23):

- vlakna A δ s premerom 2–5 μm in tanko mielinizirano ovojnico; imajo zelo veliko hitrost prevajanja bolečine (20 m/s) in prenašajo hitro, ostro, kratko in dobro lokalizirano bolečino
- vlakna C s premerom 0,2–1,5 μm , ki so nemielinizirana; njihova hitrost prevajanja bolečine je 2 m/s in so odgovorna za zakasnjeno bolečino, ki je običajno daljša, pekoča, še bolj neprijetna in slabo lokalizirana

Vlakna visceralnih nociceptorjev so tipa C in oživčujejo notranje organe, črevo in žile (5). Vlakna A δ in C se ob vstopu v hrbtenjačo cepijo in tvorijo sinapse z nevroni drugega reda. K istim nevronom se stekajo tudi vlakna visceralnih nociceptorjev. Sekundarni nevroni, ki prejemajo priliv iz primarnih nociceptivnih nevronov, so dveh vrst (22):

- nociceptivno specifični nevroni z visokim pragom vzdražnosti

- nevroni s široko dinamičnim razponom odzivanja, ki se odzovejo tudi na neškodljive dražljaje

Povezave nociceptivnih poti z retikularno formacijo so pomembne za stanje budnosti in usmerjeno pozornost. Povezave periakveduktalne sivine z limbičnim sistemom so pomembne za čustveno odzivanje na bolečino. Povezave s somatskimi motoričnimi nevroni so med drugim odgovorne za refleks umika (prizadeti ud umaknemo stran od vira bolečinskega dražljaja). Povezava med nociceptivnimi in eferentnimi potmi vegetativnega živčevja je odgovorna za vegetativne pojave ob bolečini (akutno bolečino spremljajo znaki aktivacije simpatikusa, ob visceralni bolečini pa prevlada parasimpatikus). Povezave nociceptivnih poti z možgansko skorjo pa so pomembne za lokalizacijo bolečine in za čustven odziv na njo (22).

1.3.4 BOLEČINSKI DRAŽLJAJI IN NJIHOVI MEDIATORJI V TELESU

Nekateri dražljaji neposredno vzdražijo nociceptorje (na primer toplota), vendar je večina bolečinskih dražljajev vezanih na sproščanje telesu lastnih snovi (endogenih algogenov), ki vzdražijo in/ali senzitivirajo nociceptorje (5). Poškodbi tkiva sledi vnetje, katerih mediatorji so algogeni (23). Mednje spadajo: H^+ ioni, serotonin, histamin, bradikinin in prostaglandini (5). Slednji ne vzdražijo nociceptorjev neposredno, ampak jih naredijo bolj občutljive in tako facilitirajo za učinke drugih endogenih algogenov ali fizikalnih ter kemičnih dražljajev iz okolja (23).

1.3.5 VRSTE BOLEČINE

Poznamo različne kriterije za razdelitev bolečine (22, 23):

Glede na pomen:

- fiziološka bolečina: ima opozorilno in obrambno funkcijo
- patološka bolečina: kronična bolečina, ki slabo vpliva na čustveno, psihično in socialno stanje bolnika

Glede na lokalizacijo:

- somatska bolečina (povrhnja ali globoka) ali visceralna
- lokalna (bolečino zaznamo tam, kjer deluje izvorni dražljaj), prenesena (primer: pri ishēmiji miokarda zaznamo bolečino v vratu, levi rami in roki, ker so oživčeni z istim hrbtenjačnim segmentom kot prizadeti visceralni organ) ali projecirana (primer: ob

udarcu v komolec je čutiti bolečino v podlahti in ulnarnem žlebu, ker tam leži ulnarni živec)

Glede na trajanje:

- akutna bolečina: izzveni s procesom celjenja poškodbe tkiva (primer: pooperativna bolečina)
- kronična bolečina: posledica dolgotrajnega draženja nociceptorjev (noniceptivna bolečina) ali posledica funkcijskih ali strukturnih sprememb živčevja (nevropatska bolečina)

AKUTNA BOLEČINA

Akutna bolečina je posledica poškodbe tkiva, vnetja ali bolezenskega procesa. Ima biološko koristno vlogo, saj nas prisili v imobilizacijo bolečega predela in tako pospeši celjenje in ozdravitev. Hudo akutno bolečino je potrebno ustrezno obravnavati in zdraviti, saj lahko vodi v kronično bolečino. Le-ta pa vpliva na zmanjšano zmožnost za delo, socialno izolacijo in depresijo (23). Primeri akutne bolečine so bolečine po operaciji ali poškodbi, bolečina, ki spremlja nekatere srčno-žilne bolezni, bolečine ob porodu.

Akutna pooperativna bolečina

Akutna pooperativna bolečina je kompleksna fiziološka reakcija na poškodbo (kože, mišic, kosti ali visceralnih organov) kot posledice kirurškega posega. Gre za nociceptivno bolečino, ki jo spremljajo tudi mehanizmi vnetne, visceralne in nevropatske bolečine (24). Je pričakovana bolečina in naj bi minila v nekaj dneh po operativnem posegu, običajno po zacelitvi operiranih tkiv (20). Jakost bolečine je blaga, srednje močna ali zelo močna. Odvisna je od načina kirurškega dela, bolnikovih predhodnih izkušenj z bolečino, psihofizičnega stanja bolnika, načina zdravljenja in praga za bolečino. Pomembno je, da akutno pooperativno bolečino obvladamo in jo odpravimo. Nezdravljena ali nezadostno obvladovana akutna pooperativna bolečina je povezana s številnimi kliničnimi in psihološkimi spremembami, ki povečajo stopnjo obolevnosti in umrljivosti, nenazadnje tudi s povečanimi celokupnimi stroški zdravljenja (24). Zapleti zaradi nezdravljene akutne pooperativne bolečine so začetni: pulmonalni (npr. pljučnica), srčno-žilni (npr. povišan krvni tlak), tromboembolični (npr. globoka venska tromboza) in drugi (upočasnjena peristaltika, podaljšano celjenje operativne rane, motnje spanja idr.) ali pozni: razvoj kronične bolečine in spremembe v vedenjskih vzorcih (24). Bolečine ne moremo objektivno izmeriti, zavedati se moramo, da je jakost bolečine subjektiven rezultat. Vsak posameznik isti bolečinski dražljaj občuti drugače. Za

merjenje akutne pooperativne bolečine so najbolj primerne številčna točkovna skala (skala z razponom 0–100 ali 0–10, na kateri bolnik označi številko, ki ustreza njegovi bolečini), besedna opisna lestvica (petstopenjska lestvica z oznakami: 0 – ni bolečine, 1 – blaga bolečina, 2 – zmerna bolečina, 3 – huda bolečina in 4 – nevzdržna bolečina) in najpogosteje uporabljena vizualna analogna skala (VAS) z vodoravno skalo dolžine 10 cm (25). Na sliki 2 je predstavljena VAS lestvica, pri kateri pacient nastavi drsno merilo med obraze, ki najbolj ponazarjajo njegovo bolečino. Na drugi strani VAS lestvice je številčna skala, iz katere odčitamo številko za oceno jakosti bolečine (20).



Slika 2: Vizualna analogna skala za oceno bolečine

1.3.6 ZDRAVLJENJE BOLEČINE

Bolečino lajšamo ali preprečujemo z zdravili, kirurškimi posegi in z dodatnimi postopki oz. z alternativnimi postopki (5).

ZDRAVILA, ki jih najpogosteje uporabljamo pri bolečini, so analgetiki, antidepresivi, antikonvulzivi, kortikosteroidi in lokalni anestetiki. Prijemališča v perifernih tkivih imajo predvsem salicilati, NSAR, kortikostereoidi in lokalni anestetiki. V osrednjem živčevju delujejo opioidi in triciklični antidepresivi. Pri bolečini po poškodbi živca so uspešnejši antidepresivi in nekatera antiepileptična zdravila, vendar ni uporabne razlage mehanizmov delovanja. Lokalni anestetiki pa zavirajo prevajanje vzbujenja po živčnih vlaknih (23).

ANALGETIKE delimo na nesteroidna protivnetna in protirevmatična zdravila (NSAR), na opoide ter na analgetike in antipiretike.

NSAR inhibirajo ciklooksigenazo (COX) ter tako zmanjšajo nastajanje prostaglandinov (PG) v telesu. Delujejo protivnetno (inhibirajo COX-2 in s tem zmanjšajo sintezo vazodilatatornih

PG, posledično se zmanjša vazodilatacija in nastajanje edemov), analgetično (zmanjša se sinteza PG na mestu vnetja ali poškodbe in s tem se zmanjša senzitivizacija nociceptorjev na živčnih končičih za vnetne mediatorje) in antipiretično (inhibirajo COX-2 in COX-3, s tem se zmanjša sinteza PG v hipotalamusu in pride do zmanjšanja hipertermije). Primeri so derivati očetne kisline in sorodne učinkovine (indometacin, diklofenak), oksikami (piroksikam), derivati propionske kisline (ibuprofen, naproksen), koksibi (celekoksib) in drugi (26).

Opioidni analgetiki zavirajo prevajanje bolečinskih dražljajev. Vežejo se na opioidne receptorje. Največ jih je v možganih, nahajajo pa se tudi v hrbtenjači, perifernem živčevju ter črevesju. So najmočnejši analgetiki in antitusiki. Med močne opioidne analgetike spadajo morfin, petidin, oksikodon, med šibke pa kodein, dihidrokodein in tramadol (26).

Analgetiki in antipiretiki, kot sta acetilsalicilna kislina in paracetamol. Prva deluje kot NSAR, je inhibitor COX na periferiji in v centralnem živčnem sistemu (CŽS), in ima analgetično, antipiretično ter protivnetno delovanje. Paracetamol inhibira COX v CŽS in deluje analgetično in antipiretično, ne pa tudi protivnetno. Obe učinkovini se uporabljata za lajšanje blage do srednje močne bolečine (26).

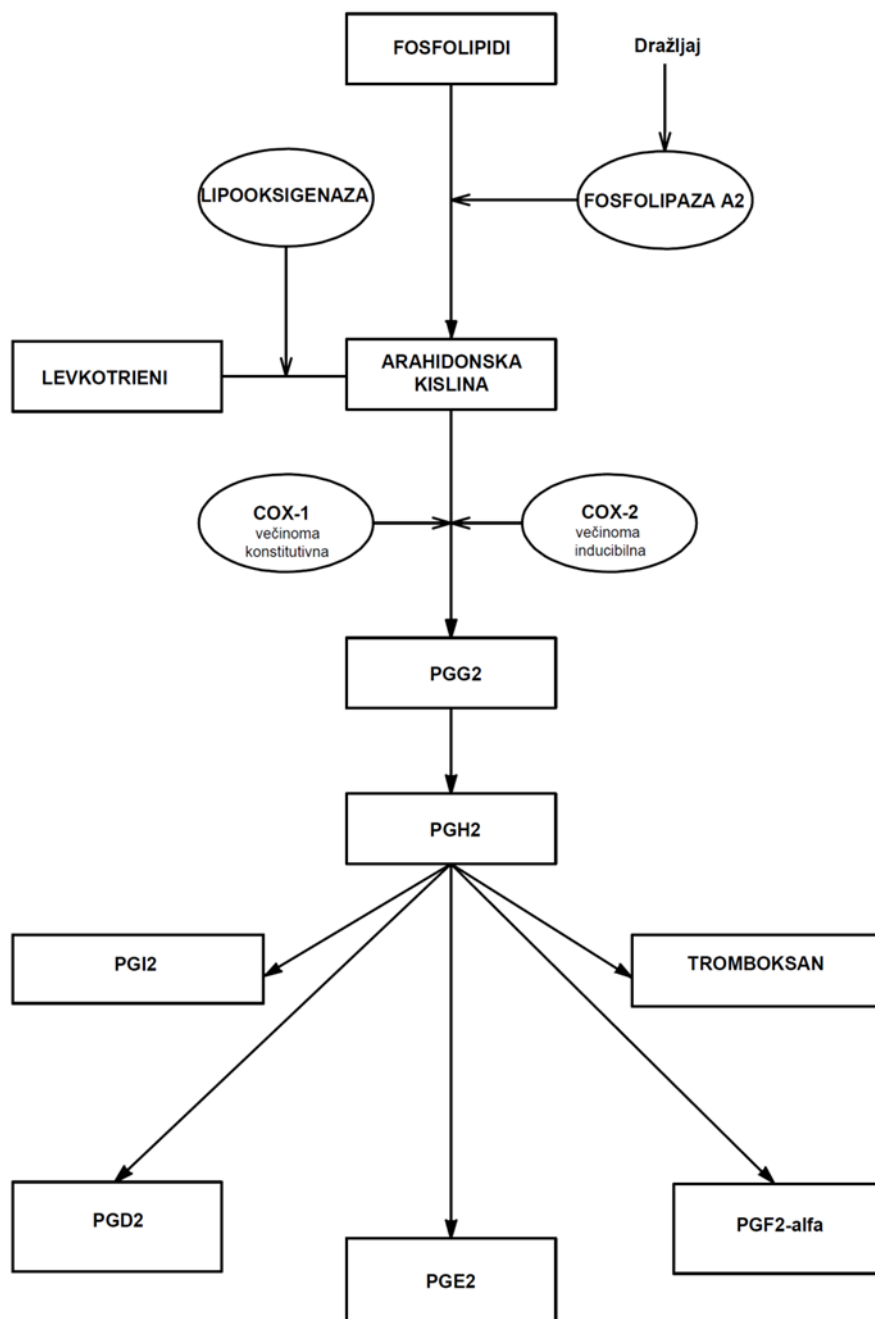
KIRURŠKI POSEGI se uporabljajo redkeje, ko druge metode za lajšanje oz. odpravo bolečine ne pomagajo. S kirurškimi posegi prekinemo nociceptivno transmisijo ali dosežemo deafferentacijo (okvaro v prevajanju senzornih dražljajev do CŽS). Učinki so običajno prehodni in bolečina, ki lahko sledi takemu posegu, je za bolnika še večja ovira. Uporabljajo se pri poznih zapletih rakavih boleznih in določenih okvarah živčevja (23).

DODATNI POSTOPKI so številni, npr. hlajenje na mestu akutne poškodbe, imobilizacija poškodovanega dela telesa, psihoterapevtska pomoč ljudem s kronično bolečino, transkutana električna nervna stimulacija (TENS) in akupunktura. Slednji sta uporabni, če niso prizadete aferentne poti (23).

1.4 PROSTAGLANDINI

Prostaglandini (PG) so biološko močno učinkovite snovi, ki vplivajo na številne funkcije v organizmu (27). Uvrščamo jih med eikozanoide, ki so oksigenirani derivati polinenasičenih maščobnih kislin z 20 ogljikovimi atomi. Mednje spadajo poleg PG še tromboksani (TX) in levkotrieni. Sinteza PG poteka iz arahidonske kisline, ki se ob dražljajih sprosti iz celičnih membran s pomočjo fosfolipaze A2. Kot vidimo iz slike 3, lahko iz arahidonske kisline s pomočjo lipooksigenaze nastanejo levkotrieni, po ciklooksigenazni poti pa s pomočjo COX1

in COX2 nastanejo PG in tromboksani (28). Vmesni intermediat za sintezo je prostaglandin H2 (PGH2), ki nastane z delovanjem encima prostaglandin endoperoksid sintaze.



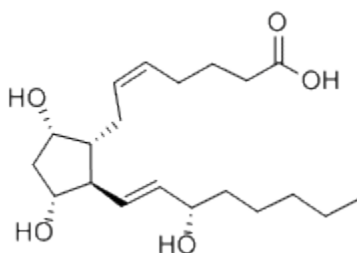
Slika 3: Shema nastanka eikozanoidov (26)

Poznamo 4 glavne bioaktivne PG, ki se sintetizirajo in vivo. To so prostaglandin E2 (PGE2), prostaciklini (PGI2), prostaglandin D2 (PGD2) in prostaglandin F2-alfa (PGF2-alfa) (28). Preglednica II prikazuje fiziološke učinke PG.

Preglednica II: Fiziološki učinki prostaglandinov (26)

Tkivo/Organ	PG/TX	Učinki v tkivu/organu
Reproduktivni organi	PGF2-alfa (odsotnost nosečnosti) PGE2 (odsotnost nosečnosti) PGF2-alfa in PGE2 (nosečnost)	Kontrakcija maternice Relaksacija maternice Kontrakcija maternice in povečanje frekvence popadkov
Kardiovaskularni sistem	TXA2 in PGI2 TXA2 PGE2 in PGI2 TXA2 in PGF2-alfa	Agregacija trombocitov Propustnost žilnih sten Vazodilatacija arterij Vazokonstrikcija ven
Respiratorni sistem	PGE2 TXA2 in PGF2-alfa	Dilatacija bronhov Konstrikcija bronhov
Renalni sistem	PGE2 in PGI2 PGE2 in PGI2 PGE2	Pretok krvi in GF Izločanje renina Inhibicija hidroosmotskih učinkov ADH
Prebavni sistem	PGE2 in PGI2	Zaščita sluznic
Imunski sistem	PGE2 in PGI2	Inhibicija T, B limfocitne proliferacije
CŽS	PGE2 PGD2 PGE2 in PGI2	Vročina Spanje Bolečina

PROSTAGLANDIN F2-ALFA



Slika 4: Strukturna formula PGF2-alfa

PGF2-alfa se sintetizira iz PGH2 s pomočjo PGF sintaze. Veže se na prostaglandin F receptor, ki se spoji z G proteinom in tako dvigne koncentracijo prostih kalcijevih ionov (28). Najbolj stabilen metabolit PGF2-alfa, ki nastane z biosintezo in vivo, je 15-keto-13,14-dihidroprostaglandin PGF2-alfa. Ima daljšo razpolovno dobo kot izhodna spojina in se v plazmi in urinu pojavlja v višjih koncentracijah, med obdelavo vzorca ne tvori artefaktov ter natančno odraža stopnjo sinteze in sproščanja matične spojine v obtok (29). Prisoten je v periferni

plazmi in urinu tako pri bazalnem fiziološkem stanju kot pri določenih patoloških stanjih, kot sta akutno in kronično vnetje. PGF2-alfa, ki v največji meri nastaja s pomočjo COX v ženskem reproduktivnem sistemu, ima pomembno vlogo pri ovulaciji, luteolizi, krčenju gladkih mišic maternice in sprožitvi poroda ali splava v zgodnji nosečnosti (28). Za sprožitev splava se uporablja karboprost, sintetični analog PGF2-alfa. Prepričljivi dokazi podpirajo hipotezo, da primarno dismenorejo (bolečo menstruacijo), povzroča povišana sinteza in sproščanje endometrijskega PGF2-alfa med menstruacijo. Presežena koncentracija PGF2-alfa tako poveča kontrakcijo gladkih mišic maternice in vazospazem arteriol, kar vodi v ishemijo in boleče krče (29). Nedavne študije so pokazale, da ima PGF2-alfa pomembno vlogo tudi pri renalni funkciji, vazokontrakciji ven, miokardni disfunkciji, konstrikciji bronhov, poškodbi možganov in bolečini. Študije poročajo tudi o povišanju biosinteze PGF2-alfa pri osteoartritisu. Agonisti na prostaglandin F receptorjih, kot je latanoprost, pa se uporabljajo za zmanjšanje očesnega tlaka pri zdravljenju glavkoma (28).

2 NAMEN DELA

Prostaglandin F2-alfa nastaja v telesu iz arahidonske kisline s pomočjo encima ciklooksigenaze. Učinek povišane sinteze in sproščanje prostaglandinov F2-alfa v ženskem reproduktivnem sistemu je povečana kontrakcija gladkih mišic maternice in vazospazem arteriol, kar vodi do bolečih krčev.

V diplomski nalogi bomo najprej primerjali dva encimskoimunska testa za določanje koncentracije prostaglandinov F2-alfa. Metodo A predstavlja kompetitiven ELISA test proizvajalca Abcam, metodo B pa kompetitiven EIA test proizvajalca Cayman. Preverili bomo, ali sta metodi določanja koncentracij primerljivi. Nato se bomo odločili, katero izmed teh dveh metod bomo uporabili določanje koncentracij prostaglandinov F2-alfa v naši študiji.

Preverili bomo natančnost izbrane metode. Izvedli bomo ponovljivost v dnevu in med dnevi ter ovrednotili, ali je ponovljivost dobra.

Določali bomo tudi korelacijo koncentracij prostaglandinov F2-alfa, izmerjenih v serumu in heparinizirani plazmi z izbrano metodo.

V diplomski nalogi bomo določali koncentracije prostaglandina F2-alfa kot pokazatelja bolečine pri pacientkah, ki so se odločile za poseg ablacije endometrija s toplotnim balonom. Pacientke bomo razdelili na dve skupini, glede na to, v kateri fazi menstruacijskega ciklusa bodo opravili poseg. Želimo dokazati, da se koncentracije med skupinama statistično razlikujejo. Postavili si bomo hipotezo, da so srednje vrednosti koncentracij prostaglandinov F2-alfa nižje pri pacientkah v proliferacijski fazi ciklusa (1. skupini) kot v sekrecijski fazi (2. skupini). Tako bi potrdili domnevo, da je priporočljivo opraviti poseg takoj po menstruacijski krvavitvi, ko je debelina endometrija manjša, ali pa endometrij preoperativno stanjšati s kontraceptivi, ki hkrati tudi zmanjšajo sintezo prostaglandinov.

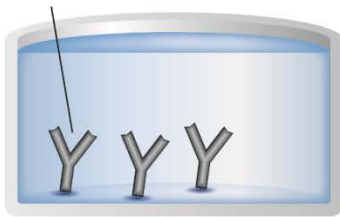
3 MATERIALI IN METODE

3.1 METODA A (ELISA TEST PROIZVAJALCA ABCAM)

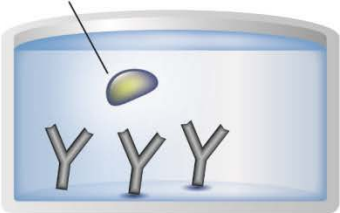
ELISA oz. encimskoimunski test je biokemijska metoda, ki se uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu ter predstavlja eno izmed najbolj občutljivih in specifičnih imunskih testov za kvantitativno določanje antigenov ali protiteles.

Kvantitativne meritve PGF2-alfa v serumu venske krvi smo na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo izvedli s pomočjo kompleta PGF2-alfa in vitro kompetitivnega ELISA testa proizvajalca Abcam (30). Ploščice z vdolbinicami so prevlečene z opičjimi anti-ovčjimi-IgG protitelesi. V vdolbinice damo standardne ali vzorčne raztopine, skupaj z antigenom PGF2-alfa, konjugiranim z alkalno fosfatazo (AP), in poliklonalnimi ovčjimi protitelesi, specifičnimi za PGF2-alfa. Po inkubaciji speremo presežek reagentov in dodamo substrat p-nitrofenilfosfat, dinatrijevo sol (pNpp). Po kratki inkubaciji se encimska reakcija ustavi in nastane rumeno obarvanje, ki ga detektira analizator Personal Lab ADALTIS pri valovni dolžini 405 nm. Intenzivnost rumenega obarvanja je obratno sorazmerna količini PGF2-alfa, ki se je vezala na ploščico. Postopek ELISA prikazuje slika 5.

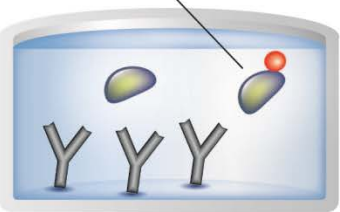
vezano protitelo



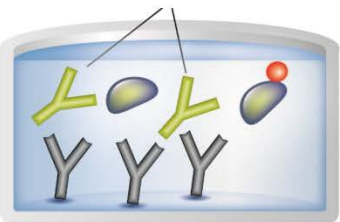
vzorec



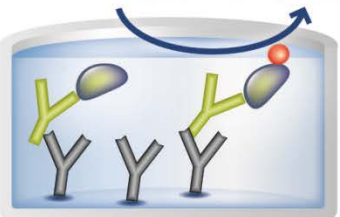
označen AP konjugat



tarčno specifično protitelo



substrat **obarvan produkt**



Reagente in vzorce smo pripravili, kot je bilo opisano v navodilu.

V ustrezne vdolbinice smo dodali standarde in vzorce.

V ustrezne vdolbinice smo dodali označen AP konjugat.

V ustrezne vdolbinice smo dodali PGF2-alfa protitelesa. Inkubirali smo pri sobni temperaturi.

V vse vdolbinice smo dodali pNpp substrat. Inkubirali smo pri sobni temperaturi. V vse vdolbinice smo dodali stop raztopino. Takoj smo detektirali.

Slika 5: Prikaz postopka ELISA (30)

Komplet PGF2-alfa in vitro kompetitivna ELISA vključuje:

- mikrotitrsko ploščico z opičjimi anti-ovčjimi-IgG protitelesi (slika 6)
- PGF2-alfa konjugat alkalne fosfataze
- PGF2-alfa protitelo
- PGF2-alfa standard
- pufer
- 20× koncentrat izpiralnega pufra
- pNpp substrat
- stop raztopino

Vsebina kompleta se je hranila pri 4 °C, razen konjugat alkalne fosfataze in standarda, ki sta se hranila pri –20 °C.



Slika 6: Mikrotitrsko ploščica

Uporabili smo še naslednje materiale:

- nastavljive pipete
- avtomatsko pipeto
- Eppendorf epruvete
- deionizirano vodo
- etanol
- Vortex
- analizator Personal Lab (proizvajalec Adaltis, Italija)

Priprava reagentov

Vse reagente in vzorce smo pred uporabo uravnali na sobno temperaturo (18–25 °C):

- PGF2-alfa konjugat alkalne fosfataze

- 1× izpiralni pufer smo pripravili tako, da smo 5 mL 20× izpiralnega pufera razredčili v 95 mL deionizirane vode in temeljito premešali

Priprava standardov

Razredčene standarde smo pripravili tik pred uporabo, saj jih je potrebno porabiti v 60 minutah od priprave:

- 500.000 ng/L osnovne standardne raztopine smo uravnali na sobno temperaturo
- devet epruvet smo označili s številkami 1–8 in eno epruveto z B₀
- v epruveti 1 smo pripravili standard 1 s koncentracijo 50.000 ng/L tako, da smo zmešali 100 µL 500.000 ng/L osnovne standardne raztopine in 900 µL ustreznega topila
- v epruvete 2–8 smo dodali 750 µL ustreznega topila
- standard 2 smo pripravili, da smo v epruveto 2 dodali 250 µL standarda 1
- standard 3 smo pripravili, da smo v epruveto 3 dodali 250 µL standarda 2
- postopek smo ponovili še z epruvetami 4–8

Preglednica III: Postopek redčenja standarda (30)

Standard	Redčimo	Volumen za redčenje (µL)	Volumen topila (µL)	Začetna konc. (ng/L)	Končna konc. (ng/L)
1	Standard	100	900	500.000	50.000
2	Standard 1	250	750	50.000	12.500
3	Standard 2	250	750	12.500	3.125
4	Standard 3	250	750	3.125	781,25
5	Standard 4	250	750	781,25	195,31
6	Standard 5	250	750	195,31	48,83
7	Standard 6	250	750	48,83	12,2
8	Standard 7	250	750	12,2	3,05
B ₀	Nič	-	750	-	0

Priprava vzorcev

Zamrznjene vzorce smo odtajali in uravnali na sobno temperaturo ter jim dodali inhibitor prostaglandin sintetaze indometacin.

Izvedba testa

- v vdolbinice za nespecifično vezavo (NSB) in B₀ smo dodali 100 µL ustreznega standardnega topila (pufra)
- v ustrezne vdolbinice smo dodali po 100 µL vzorcev, standardov in B₀

- v NSB smo dodali 50 μ L pufra
- v vse vdolbinice, razen v vdolbinice za totalno aktivnost (TA) in slepe vdolbinice, smo dodali 50 μ L PGF2-alfa konjugata alkalne fosfataze
- v vse vdolbinice, razen v TA, slepe vdolbinice in v NSB, smo dodali 50 μ L PGF2-alfa protiteles (vse uporabljene vdolbinice so se obarvale zeleno, razen NSB, ki se je obarvala modro, slepe vdolbinice in TA so bile v tej fazi prazne)
- ploščico smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi na stresalniku mikrotitrskih ploščic
- izpraznili smo vsebino iz vdolbinic in nato vsako vdolbinico izprali z dodatkom 400 μ L 1 \times izpiralnega pufra, izpiranje smo ponovili še dvakrat
- po zadnjem izpiranju smo izpraznili vsebino vdolbinic z vpojnim papirjem, da smo odstranili morebitne ostanke izpiralnega pufra
- v TA smo dodali 5 μ L PGF2-alfa konjugata alkalne fosfataze
- v vse vdolbinice smo dodali 200 μ L pNpp substrata in inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi brez stresanja
- v vse vdolbinice smo dodali 50 μ L stop raztopine in takoj izmerili absorbanco pri 405 nm

Izračun

Koncentracijo PGF2-alfa za vzorce smo interpolirali s pomočjo umeritvene krivulje. Sprva smo izračunali neto optično gostoto (OD, angl. Optical Density) vezanega proteina za vsak standard in vzorec tako, da smo povprečni OD vzorca NSB odšteli od povprečnega OD vezanega proteina. Nato smo izračunali vezavo vsakega para vdolbinic s standardi kot odstotek maksimalne vezave vdolbinic (B_0) s pomočjo naslednje formule:

$$\text{Odstotek vezave} = (\text{Neto OD} / \text{Neto } B_0 \text{ OD}) \times 100$$

Zatem smo narisali krivuljo odvisnosti odstotka vezave in neto OD v odvisnosti od koncentracije PGF2-alfa v standardih. Koncentracije v vzorcih smo izračunali s pomočjo neto OD vrednosti in narisane krivulje.

Ocena metode

- proizvajalec navaja mejo detekcije za serum 6,71 ng/L

3.2 METODA B (EIA TEST PROIZVAJALCA CAYMAN)

EIA oz. encimskoimunski test je kompetitivna metoda za kvantitativno določanje protiteles ali antigenov.

Ploščice z vdolbinicami so prevlečene z mišjim anti-zajčjimi IgG protitelesi. V vdolbinice dodamo standarde ali vzorčne raztopine skupaj z antigenom PGF2-alfa, konjugiranim z acetilholinesterazo (AChE), in zajčjimi protitelesi, specifičnimi za PGF2-alfa. Po inkubaciji speremo presežek reagentov in dodamo Ellmansov reagent, ki vsebuje substrat za AChE. Produkt te encimske reakcije je značilne rumene barve, ki absorbira pri 412 nm. Intenzivnost obarvanja določamo spektrofotometrično. Absorbanca je obratno sorazmerna s koncentracijo PGF2-alfa v serumu.

Komplet PGF2-alfa in vitro EIA vsebuje:

- mikrotitrsko ploščico z mišjimi anti-zajčjimi Ig protitelesi
- PGF2-alfa konjugat z AChE
- PGF2-alfa protitelo
- PGF2-alfa standard
- pufer
- koncentrat izpiralnega pufra
- Ellmansov reagent

Vsebina kompleta se je hranila pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uporabili smo še naslednje materiale:

- nastavljive pipete
- avtomatsko pipeto
- Eppendorf epruvete
- deionizirano vodo
- etanol
- Vortex
- analizator Personal Lab (proizvajalec Adaltis, Italija)

Priprava standardov

Razredčene standarde smo uporabili tik pred uporabo:

- 100 μL osnovne standardne raztopine (50.000 ng/L) smo uravnali na sobno temperaturo in ji dodali 900 μL deionizirane vode in nastalo raztopino označili kot standard 0 (5000 ng/L)
- 8 epruвет smo označili s številkami 1–8
- v epruветi 1 smo pripravili standard 1 s koncentracijo 500 ng/L tako, da smo zmešali 100 μL standarda 0 in 900 ml pufra
- v epruветe 2–8 smo dodali 750 μL pufra
- standard 2 smo pripravili tako, da smo v epruветo 2 dodali 500 μL standarda 1
- standard 3 smo pripravili, da smo v epruветo 3 dodali 500 μL standarda 2
- postopek smo ponovili še z epruветami 4–8

Preglednica IV: Koncentracije standardov

Standard	Koncentracija (ng/L)
1	500
2	200
3	80
4	32
5	12,8
6	5,1
7	2,0
8	0,8

Priprava vzorcev

Zamrznjene vzorce smo odtajali in uravnali na sobno temperaturo.

Izvedba testa

- v vdolbinice za nespecifično vezavo (NSB) smo dodali 100 μL pufra, v B_0 pa 50 μL pufra
- v ustrezne vdolbinice smo dodali po 50 μL vzorcev in 50 μL standardov
- v vse vdolbinice, razen v vdolbinice za totalno aktivnost (TA) in slepe vdolbinice, smo dodali 50 μL PGF2-alfa konjugata AChE

- v vse vdolbinice, razen v TA, slepe vdolbinice in v NSB, smo dodali 50 µL PGF2-alfa protiteles
- ploščico smo inkubirali 18 ur pri 4 °C
- izpraznili smo vsebino iz vdolbinic in nato vsako vdolbinico izprali z izpiralnim pufrom, izpiranje smo ponovili še štirikrat
- v TA smo dodali 5 µL PGF2-alfa konjugata AChE
- v vse vdolbinice smo dodali 200 µL Ellmansovega reagenta in inkubirali 90 minut v temi pri sobni temperaturi s stresanjem
- izmerili smo absorbanco pri 412 nm s pomočjo analizatorja Personal Lab Adaltis
- odčitali smo koncentracijo PGF2-alfa

3.3 ABLACIJA ENDOMETRIJA S TC TOPLOTNIM BALONOM

Je bila prva nehisteroskopska tehnika, omenjena leta 1994. Poleg že omenjenih prednosti nehisteroskopskih ablacij, so prednosti TC še, da ni potrebna splošna narkoza, bolnica zapusti bolnišnico že nekaj ur po posegu, okrevanje pa je zelo hitro (16). Pacientkam se menstruacijske krvavitve normalizirajo, zmanjšajo ali pa jih izgubijo. Uspešnost je okoli 90 % (preglednica V). Slaba stran je sorazmerno močna bolečina po posegu (prisotna pri približno 25 % bolnic) in cena toplotnega balona, ki pa jo odtehta dejstvo, da je poseg narejen v dnevni bolnišnici, brez splošne anestezije in kirurške ekipe. Če poseg ni uspešen, ga lahko ponovimo, naredimo kirurško ablacijo, vstavimo maternični vložek z levonorgestrelom ali pa naredimo histerektomijo (2).

Trenutno so na tržišču tri generacije TC. TC I vsebuje balon iz lateksa, znotraj katerega tekočina ne kroži. Leta 1998 je prišla nova generacija TC II s silikonskim balonom z znotraj krožečo tekočino, kar zagotavlja enakomerno temperaturo po vsem balonu. Naš postopek smo izvedli s TC II. Od leta 2004 je na tržišču tretja generacija TC. Silikonski balon pri TC III je fleksibilnejši, kar omogoča boljše prilagajanje balona maternični votlini (17, 31, 32).

Preglednica V: *Uspešnost ablacije endometrija s toplotnim balonom – pregled literature (16)*

Avtor	Število bolnic	Uspešnost (%)
N. N. Amso s sod. (1998)	300	88–100
D. F. Loffer s sod. (2002)	58	95
T. J. Clark s sod. (2005)	50	80
E. A. Elgarib s sod. (2006)	50	86

Predoperativni diagnostični postopki (2, 32):

- ginekološki pregled in natančna anamneza
- vaginalni ultrazvok za oceno velikosti in zgradbe maternice
- histeroskopija z odvzemom vzorca maternične sluznice ali zgolj odvzem vzorca maternične sluznice tik pred posegom oz. izvid kiretaže, če je bila le-ta izvedena (16)

Indikacije za zdravljenje s toplotnim balonom (2, 32):

- disfunkcijske krvavitve
- neuspešnost oz. stranski učinki farmakološkega zdravljenja
- ohranitev maternice
- dolžina maternice 4–10 cm

Kontraindikacije za zdravljenje s toplotnim balonom (2, 32):

- malignost genitalnega trakta (materničnega vratu, maternice, jajcevodov, jajčnikov)
- hiperplazija endometrija
- ženske z anatomskimi ali patološkimi nepravilnostmi maternice
- nosečnost
- akutna okužba splovil in/ali sečil
- ženske, ki bi še želele zanositi
- ženske, ki pričakujejo amenorejo kot rezultat
- ženske, ki imajo vstavljen maternični vložek

Postopek ablacije s toplotnim balonom

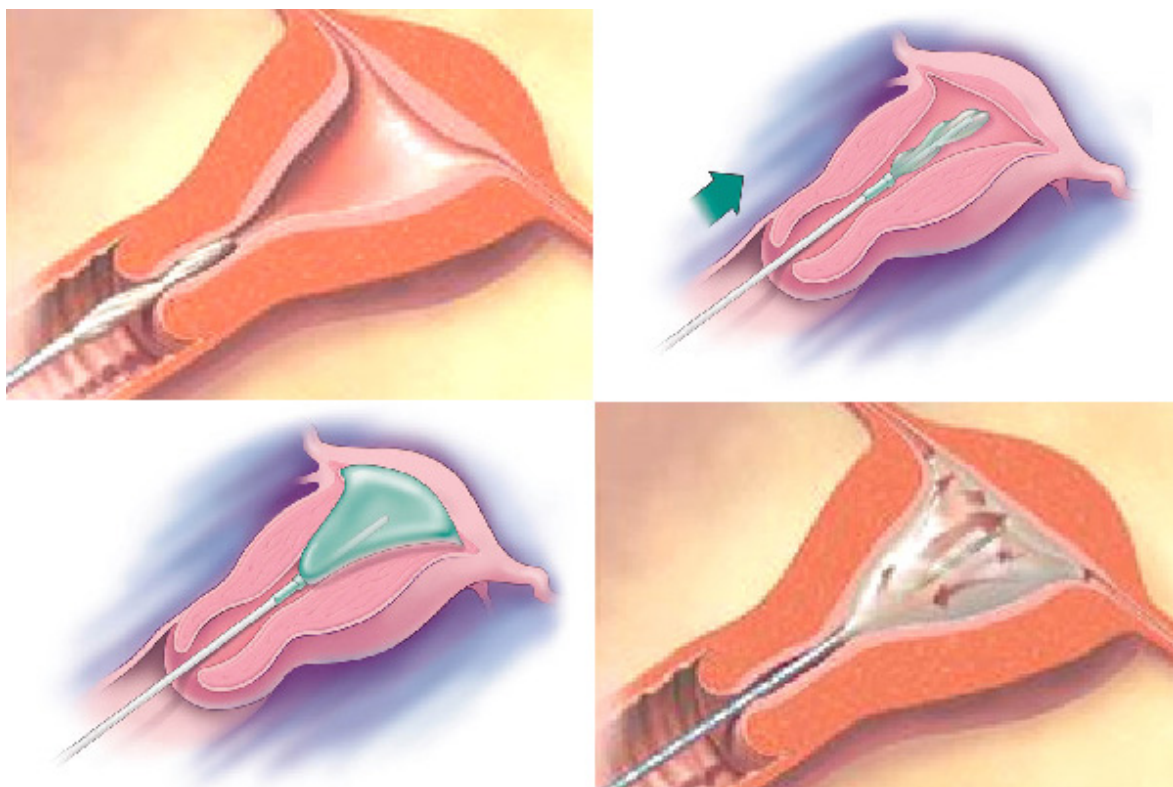
Ablacijo endometrija s Thermachoice II toplotnim balonom so opravili na Kliničnem oddelku za ginekologijo na UKC Ljubljana. Pred samim postopkom ni potrebno predoperativno tanjšati maternične sluznice, je pa zaželeno, da se poseg opravi takoj po menstruaciji. Bolečino lahko ublažimo z analgetiki, lokalnimi anestetiki in pomirjevali. Bolnica eno uro pred posegom običajno dobi injekcijo nesteroidnega protivnetnega zdravila, ki prepreči ali zmanjša morebitne krče med posegom in po njem, ter anksiolitik. Lokalni anestetik pa se vbrizga v maternico. Če ima bolnica med in/ali po posegu zmerno do hudo bolečino, je potrebno intravenozno dodajanje analgetikov oz. anestetikov.

Napravo sestavljata kateter s silikonskim balonom in grelnim sistemom dolžine 16 cm in premera 4 mm, ter generator, ki prikazuje in nadzoruje temperaturo, tlak in čas postopka (slika 7).



Slika 7: *Gynecare Thermachoice: kateter s silikonskim balonom in generator*

Kateter z balonom uvedemo v maternico brez dilatacije cervikalnega kanala. Nato napolnimo s 30 ml 5 % glukoze, ki kroži (slika 8). Tlak v balonu je med 160 in 180 mm Hg. Grelni sistem znotraj balona segreje tekočino na 87 ± 5 °C za 8 minut. Po osmih minutah, kolikor traja postopek, se segrevanje avtomatično izključi in balon se hitro ohladi (2, 15, 16, 32, 33).



Slika 8: *Shematski prikaz postopka ablacije s toplotnim balonom (36)*

Farmakološka terapija

Ker smo želeli v našem primeru ugotoviti vlogo prostaglandinov pri bolečini, smo namesto NSAR uporabili 100 mg tramadola intramuskularno, ker le-ta ne vpliva na sintezo prostaglandinov. Eno uro pred samim posegom so pacientke vzele peroralno 5 mg diazepam. Kot lokalni anestetik pa smo uporabili 1 % ksilokain. Predvidevamo, da so v našem primeru

pacientke prejele dodatno analgezijo, zaradi premočne bolečine med in po operativnem posegu, vendar teh podatkov nimamo.

Pooperativni potek

1.–3. dan: Pojavi se rožnat izcedek ali krvavitev iz maternice in pride do blagih ali močnejših krčev, ki trajajo 2–12 ur.

3.–7. dan: Izcedek je krvavkast in voden brez prisotne bolečine.

6.–7. dan: Izcedek je obilnejši, lahko so prisotni koščki sluznice.

1.–2. mesec: Pojavi se lahko močnejša krvavitev.

Odvzem vzorca

Vsaki preiskovanki so odvzeli tri epruvete venske krvi:

- tik pred posegom ($t_1 = 0$ min)
- ob koncu posega (trajanje posega je bilo enotno za vse in je trajalo $t_2 = 8$ min)
- 60 minut po posegu (t_3)

Koncentracijo PGF2-alfa smo določili iz zamrznjenih vzorcev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo z metodo A, ki je opisana v poglavju Materiali in metode.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Pri preučevanju kliničnega pomena določanja koncentracije prostaglandina PGF2-alfa kot pokazatelja bolečine pri ablaciji endometrija s toplotnim balonom smo z zgoraj opisanimi metodami pridobili podatke o preučevani spremenljivki. Vse teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05. Interval zaupanja, ki ga določata njegova spodnja in zgornja meja, je interval, v katerem se z dano gotovostjo (v našem primeru 95 %) nahaja ocenjevani parameter. To pomeni, da se z verjetnostjo tveganja α (5 %) parameter nahaja v tem intervalu. Za analizo pridobljenih podatkov smo uporabili programski paket SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) za Windows, verzija 17.0. in računalniški program MedCalc. Uporabili smo naslednje statistične metode:

Kolmogorov-Smirnov test

S Kolmogorov-Smirnovim testom smo preverili normalnost porazdelitve naše spremenljivke. Testirali smo ničelno hipotezo, ki pravi, da se koncentracija PGF2-alfa porazdeljuje normalno.

Friedmanov test

Naša spremenljivka se ne porazdeljuje statistično značilno normalno, zato smo uporabili neparametrični Friedmanov test za več odvisnih spremenljivk. S tem testom smo preverili, ali se v skupini koncentracije PGF2-alfa pri časih t1, t2 in t3 statistično razlikujejo.

Mann-Whitney test

Ali se skupini med seboj statistično razlikujeta, smo preverili tudi z Mann-Whitneyevem u-testom za 2 neodvisni spremenljivki, ki se uporablja, ko spremenljivke niso normalno porazdeljene. Testirali smo ničelno hipotezo, ki pravi, da so povprečne vrednosti koncentracij PGF2-alfa nižje pri pacientkah v proliferacijski fazi (1. skupini) ciklusa kot v sekrecijski fazi (2. skupini).

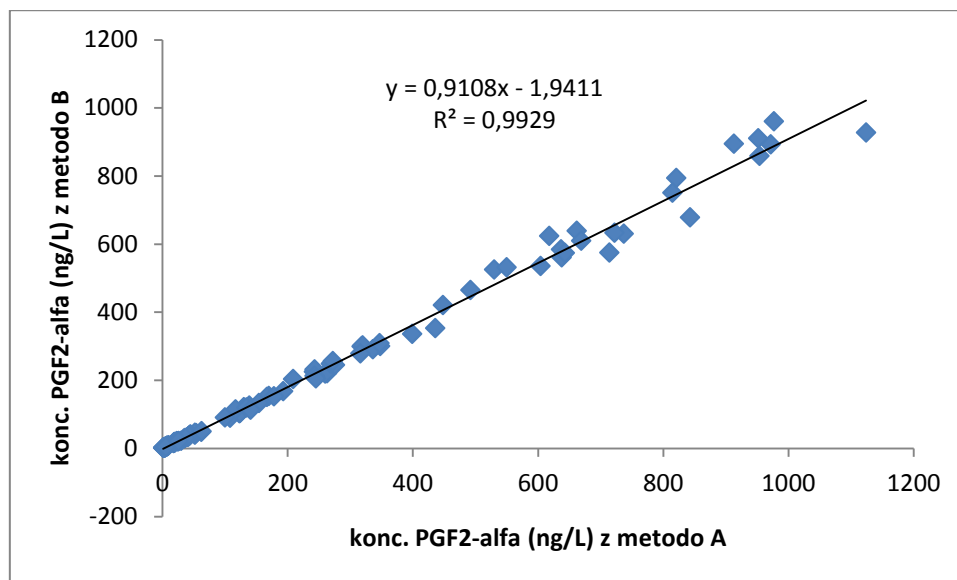
Bland-Altmanov test

Skladnost med metodama smo analizirali z grafičnim postopkom Blanda in Altmana. Ta grafična metoda primerja dve tehniki merjenja, pri čemer so razlike prikazane glede na povprečje obeh tehnik določanja koncentracij PGF2-alfa.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA METODE A IN METODE B

Koncentracijo PGF2-alfa smo na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo določili s pomočjo kompleta PGF2-alfa in vitro kompetitivnega ELISA testa proizvajalca Abcam (metoda A) ter dobljene rezultate primerjali s tistimi, dobljenimi s pomočjo kompleta PGF2-alfa in vitro kompetitivnega EIA testa proizvajalca Cayman (metoda B). Zbrali smo 100 vzorcev seruma, ki je ostal kot biološki material po opravljenih naročenih analizah. Vzorce smo zbirali 2 meseca. Vrednosti, ki smo jih dobili, so predstavljene v prilogi 2. Srednja vrednost koncentracije PGF2-alfa, izračunana po metodi A, je 252,6 ng/L, po metodi B pa 228,1 ng/L.

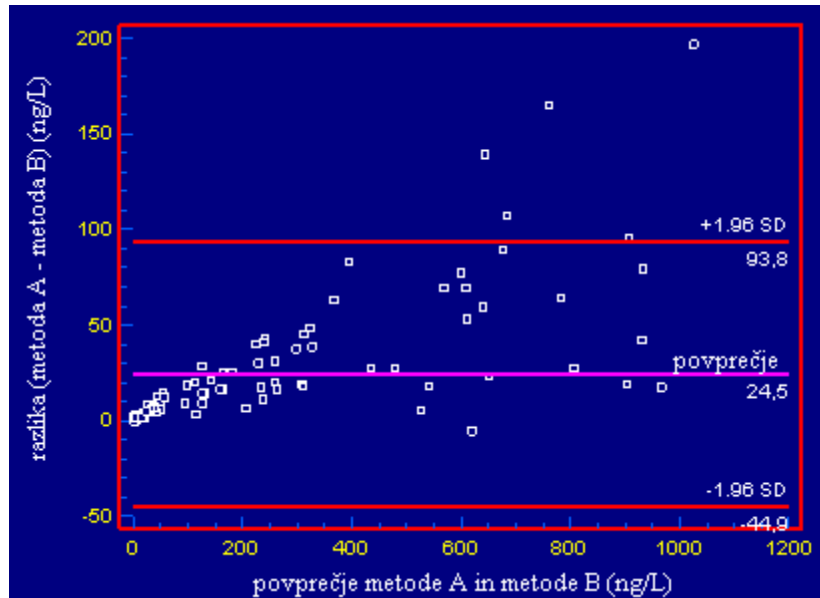


Graf 1: Izmerjene vrednosti koncentracij PGF2-alfa (ng/L) z obema metodama

Graf 1 prikazuje razpršenost rezultatov meritev, pri čemer lahko vizualno ocenjujemo morebitna odstopanja. Vidimo, da je stopnja ujemanja med meritvami določenimi z obema metodama dobra. Enačba premice je $y = 0,9108x - 1,9411$, korelacijski koeficient (r) pa 0,99, kar pomeni, da je korelacija med rezultati obeh metod odlična.

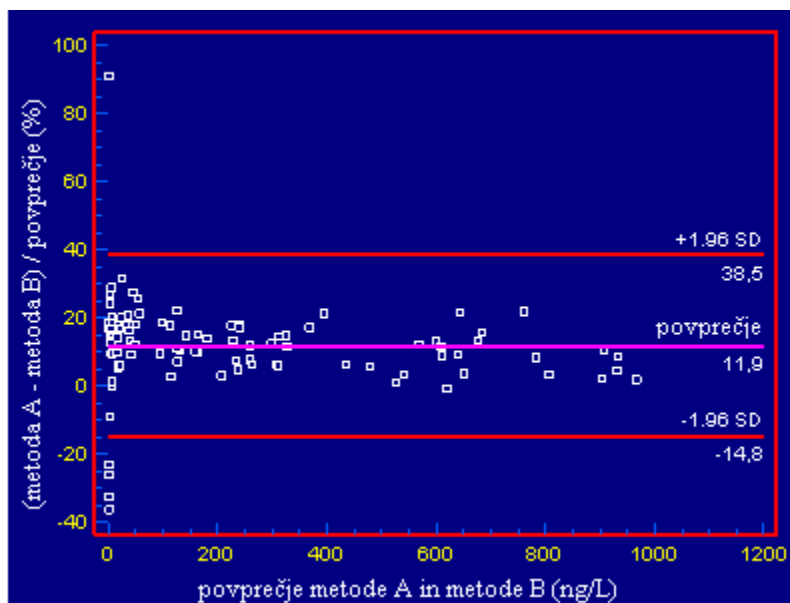
Za še bolj natančno primerjavo med metodama uporabimo Bland-Altmanov test, ki nam pokaže, kakšne so razlike med dvema uporabljenima metodama. Z Bland-Altmanovim diagramom prikažemo povprečje razlik oz. odstotek razlik. Odstopanje izračunamo kot

razliko med metodo A in metodo B. S tem prikažemo stopnjo ujemanja. Kadar z eno metodo dobimo visoke rezultate in nato podobne še z drugo, je povprečje njihovih parnih razlik blizu nič. Večje kot so razlike, bolj se primerjani metodi med seboj glede na meritve razlikujeta.



Graf 2: Bland-Altmanov diagram razlik med koncentracijami PGF2-alfa, pridobljenimi z metodo A in metodo B. Vodoravna vijolična črta prikazuje povprečno razliko med metodama. Rdeči vodoravni črti prikazujeta meje skladnosti (povprečje $\pm 1,96$ SD).

Iz grafa 2 vidimo, da je povprečje razlik 24,5 ng/L, kar pomeni, da smo z metodo A dobili višje vrednosti kot z metodo B. Spodnja meja razlik je $-44,9$ ng/L, zgornja pa 93,8 ng/L. Torej graf 2 prikazuje dobro stopnjo ujemanja obeh metod, saj je le 5 vrednosti razlik izven meja skladnosti. S tem lahko potrdimo, da sta metodi določanja koncentracij PGF2-alfa primerljivi.



Graf 3: Bland-Altmanov odstotek razlik med koncentracijami PGF2-alfa, pridobljenimi z metodo A in metodo B. Vodoravna vijolična črta prikazuje povprečni odstotek razlik. Rdeči vodoravni črti prikazujeta meje skladnosti (povprečje $\pm 1,96$ SD).

Iz grafa 3 vidimo, da se metoda A in metoda B v povprečju razlikujeta za 11,9 %. Metodi sta primerljivi. Odločili smo se, da bomo za določanje koncentracij PGF2-alfa v naši študiji uporabili metodo A, saj je cenovno ugodnejša.

4.2 NATANČNOST METODE A

Natančnost nekega postopka pove, kako se ponavljajo rezultati, ki smo jih dobili na povsem enak način. Prikazuje sipanje oz. ponovljivost rezultatov. Koefficient variacije (KV) je statistični kazalec in prikazuje razpršenost statističnih enot okoli aritmetične sredine. Večji kot je KV, večja je variabilnost preučevane spremenljivke. Ponovljivost metode izračunamo s pomočjo enačbe: $KV (\%) = 100 \times (SD/srednja\ vrednost)$. Meritve smo izvedli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

Natančnost oz. ponovljivost v dnevu smo določili z meritvijo šestih vzorcev z metodo A. Trije vzorci so predstavljali plazmo in trije vzorci so predstavljali serum s tremi različnimi koncentracijami PGF2-alfa. Vsak vzorec smo znotraj istega dne izmerili večkrat ($n = 15$). Preglednica VI podaja rezultate, ki smo jih dobili.

Preglednica VI: *Koncentracije PGF2-alfa (ng/L), ki smo jih izmerili iz vzorcev plazme in vzorcev seruma za preverjanje ponovljivosti v dnevu*

N	Plazma-1 (ng/L)	Plazma-2 (ng/L)	Plazma-3 (ng/L)	Serum-1 (ng/L)	Serum-2 (ng/L)	Serum-3 (ng/L)
1	0,238	293	28,8	21,8	416	33,4
2	0,249	308	27,7	21,9	389	31,3
3	0,356	315	29,4	21	407	30,4
4	0,18	308	29,7	20,2	366	30,3
5	0,203	316	27,8	22,6	433	30,9
6	0,289	333	28,2	21,8	427	32,3
7	0,241	317	28,1	22,2	407	29,9
8	0,289	317	27,7	21,3	436	30,9
9	0,254	321	29	20,7	404	33,5
10	0,274	305	28	20,8	399	33,1
11	0,238	298	29,6	21,3	427	31
12	0,486	319	28,2	21,3	391	30,8
13	0,326	307	27,8	22,3	389	30,3
14	0,538	303	27,3	22,2	419	34,4
15	0,37	288	27,1	20,9	406	33,9

Nato smo določili minimalno in maksimalno vrednost koncentracij PGF2-alfa in izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo ter KV.

Preglednica VII: *Opisne statistike vrednosti koncentracij PGF2-alfa (ng/L) za ponovljivost v dnevu*

	Plazma-1	Plazma-2	Plazma-3	Serum-1	Serum-2	Serum-3
MIN (ng/L)	0,18	288,00	27,10	20,20	366,00	29,90
MAX (ng/L)	0,54	333,00	29,70	22,60	436,00	34,40
SRED. VR. (ng/L)	0,30	309,87	28,29	21,49	407,73	31,76
SD (ng/L)	0,10	11,25	0,79	0,67	18,61	1,46
KV (%)	32,04	3,63	2,80	3,11	4,56	4,61
N	15	15	15	15	15	15

Proizvajalec navaja, da je za metodo ELISA dovoljen KV do 15 %. Iz preglednice VII vidimo, da temu kriteriju ustrezajo vsi vzorci, razen vzorec plazma-1. Le-ta ima zelo nizke vrednosti koncentracij PGF2-alfa (srednja vrednost = 0,30 ng/L). V klinični praksi običajno ne najdemo tako nizkih koncentracij PGF2-alfa, zato tudi ne dajemo pozornosti tako nizkim vrednostim. Ponovljivost v dnevu je dobra.

Ponovljivost med dnevi smo določili z meritvijo treh vzorcev serumov v 10 dneh z metodo A, vsako meritev vzorca smo izvedli štirikrat. Rezultate merjenja podaja preglednica VIII.

Preglednica VIII: *Koncentracije PGF2-alfa (ng/L), ki smo jih izmerili iz vzorcev za preverjanje ponovljivosti med dnevi*

Dan	Datum	Vzorec 1 (ng/L)		Vzorec 2 (ng/L)		Vzorec 3 (ng/L)	
1	10.09.2012	17.5	17.3	63.4	63.0	261	282
	10.09.2012	19.1	18.7	64.3	66.5	277	272
2	11.09.2012	18.0	19.6	64.4	66.1	278	288
	11.09.2012	17.6	17.5	63.5	64.7	275	283
3	12.09.2012	18.3	19.3	69.2	63.8	303	283
	12.09.2012	18.0	18.8	63.9	66.2	263	271
4	13.09.2012	15.6	16.8	65.2	63.1	269	265
	13.09.2012	17.3	19.1	69.7	63.6	303	276
5	14.09.2012	18.2	17.8	69.3	66.4	280	265
	14.09.2012	19.0	17.9	76.2	59.8	294	272
6	17.09.2012	18.2	17.7	65.6	64.9	298	293
	17.09.2012	17.9	17.8	66.2	63.9	267	272
7	18.09.2012	17.2	17.9	65.2	65.4	275	282
	18.09.2012	16.8	18.9	66.5	64.9	293	282
8	19.09.2012	16.6	17.1	66.4	62.4	293	284
	19.09.2012	19.6	19.4	66.2	64.8	281	281
9	20.09.2012	17.4	18.9	64.8	62.4	280	283
	20.09.2012	18.5	17.3	64.7	67.3	274	257
10	21.09.2012	16.0	17.1	59.3	60.8	264	249
	21.09.2012	18.4	17.3	70.1	70.9	294	287

Nato smo določili minimalno in maksimalno vrednost koncentracij PGF2-alfa in izračunali srednjo vrednost, standardno deviacijo ter koeficient variacije (KV). Vrednosti so predstavljene v preglednici IX.

Preglednica IX: Opisne statistike vrednosti koncentracij PGF2-alfa (ng/L) za ponovljivost med dnevi

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3
MIN (ng/L)	15,6	59,3	249
MAX(ng/L)	19,6	76,2	303
SRED. VR. (ng/L)	17,935	65,375	278,725
SD (ng/L)	0,940625	3,03626	12,15522
KV (%)	5,25	4,64	4,36

Iz preglednice IX je razvidno, da so KV ustrezni. To nam pove, da je ponovljivost med dnevi dobra.

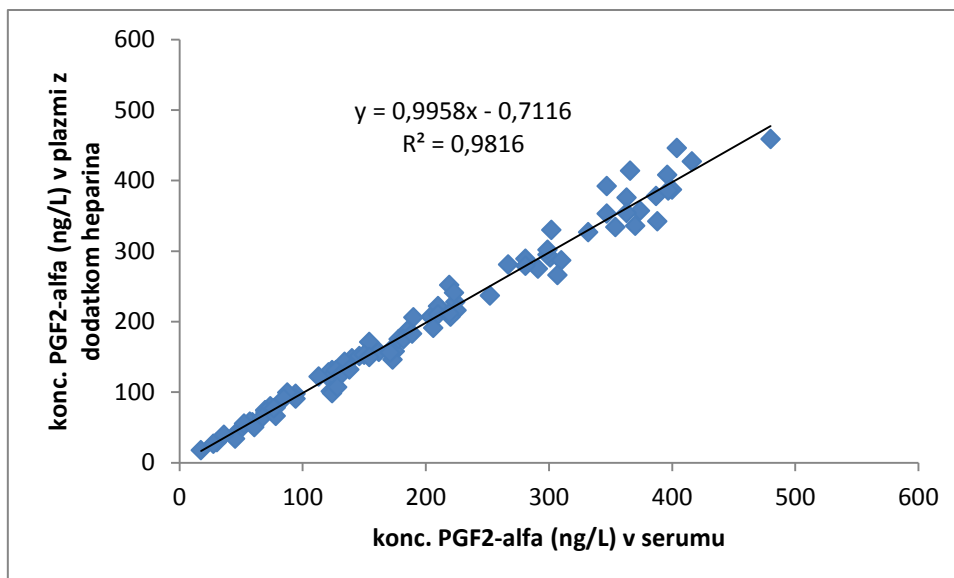
4.3 KORELACIJA MED SERUMOM IN PLAZMO (HEPARIN)

Naredili smo primerjavo med koncentracijami PGF2-alfa v vzorcih seruma in heparizirane plazme, določenimi z metodo A. Imeli smo 87 vzorcev. Vzorce smo en mesec zbirali od pacientov, ki so prihajali na odvzem krvi. Vsakemu so odvzeli dve epruveti krvi, eno brez antikoagulant in drugo z antikoagulantom (heparinom). Iz biološkega materiala, ki je ostal od analiz, smo dobili naše vzorce. Vrednosti koncentracij PGF2-alfa so predstavljene v Prilogi 1.

Preglednica X: Opisne statistike vrednosti koncentracij PGF2-alfa (ng/L) v vzorcih seruma in plazme (heparin)

	Serum	Plazma (heparin)
N	87	87
Sred. vred. (ng/L)	198,2	196,7
MIN (ng/L)	17,5	17,7
MAX (ng/L)	480	495

Vrednosti med serumom in plazmo (heparin) so popolnoma primerljive. Korelacija koncentracij PGF2-alfa med serumom in plazmo (heparin) je prikazana v grafu 4.

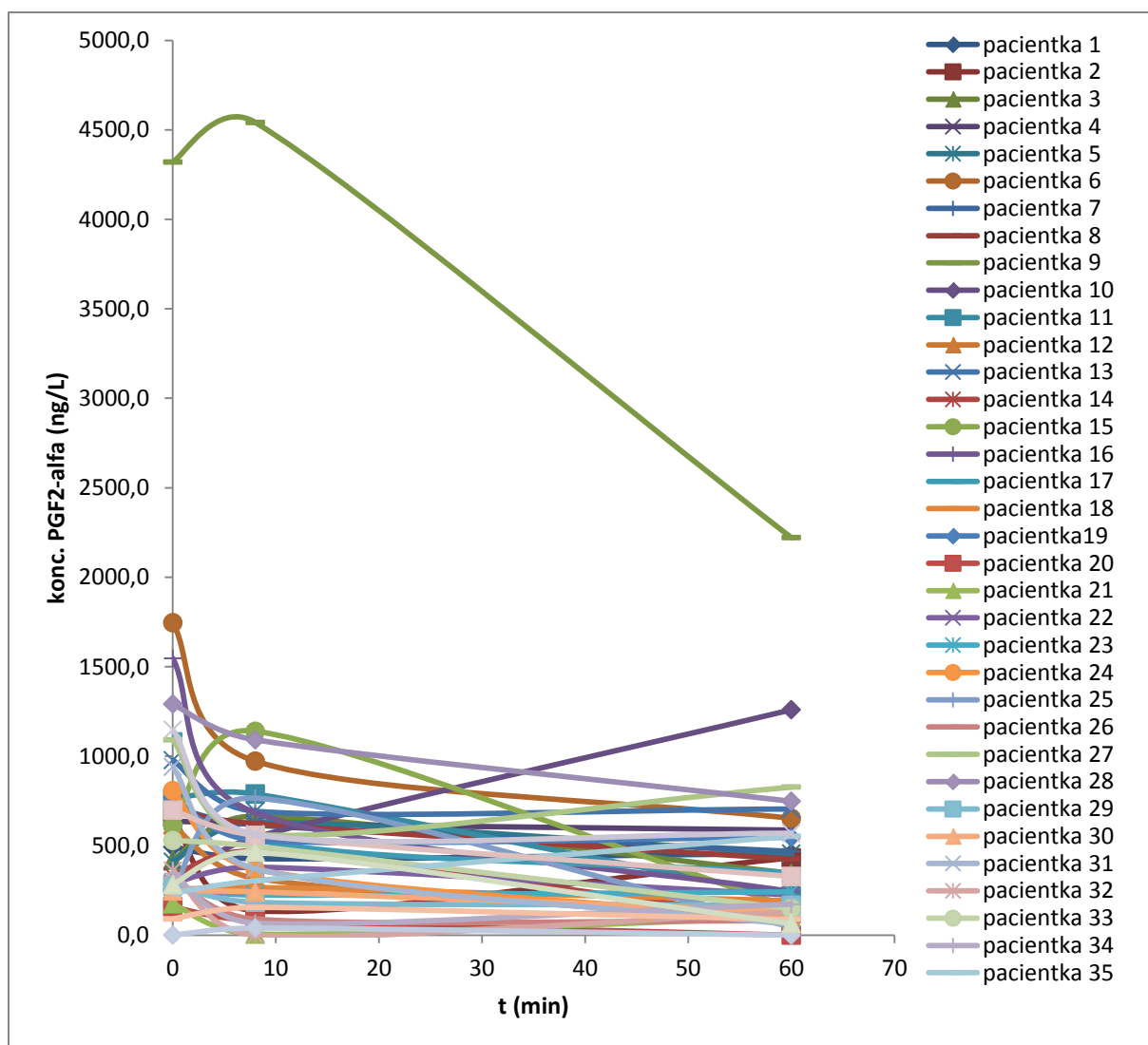


Graf 4: Izmerjene vrednosti koncentracij PGF2-alfa (ng/L) v serumu in plazmi z dodatkom heparina

Enačba premice je $y = 0,9958x - 7,116$, korelacijski koeficient (r) pa 0,99. To pomeni, da je korelacija (povezanost) med serumom in plazmo (heparin) odlična, praktično linearna.

4.4 OPIS SKUPIN

V študijo smo vključili 40 perimenopavzalnih žensk z definiranimi disfunkcijskimi krvavitvami, ki so se odločile za kirurško zdravljenje, ablacijo endometrija s Thermachoice II toplotnim balonom. Posege so opravili na Kliničnem oddelku za ginekologijo na UKC Ljubljana. Razdelili smo jih v dve skupini, glede na to, v kateri fazi menstruacijskega ciklusa so opravili poseg, proliferacijski ali sekrecijski fazi. V prvi skupini je bilo 14 pacientk, katerim je bil poseg opravljen v proliferacijski fazi ciklusa. Povprečna starost teh preiskovank je bila 43,4 let, in sicer od minimalne starosti 34 let do maksimalne 50 let. Drugo skupino je sestavljalo 26 pacientk s povprečno starostjo 44,9 let, katerim je bil poseg opravljen v sekrecijski fazi. Najmlajša je imela 37 let, najstarejša pa 52 let.



Graf 5: Koncentracija PGF2-alfa (ng/L) v odvisnosti od časa (min) za vseh 40 pacientk

Iz grafa 5 je razvidno, da ima daleč najvišjo povprečno vrednost koncentracij PGF2-alfa pacientka z zaporedno številko 9. Najnižjo vrednost koncentracije PGF2-alfa pa ima pacientka z zaporedno številko 37. Obe omenjeni pacientki sta iz druge skupine (poseg opravljen v sekrecijski fazi).

V preglednici XI smo izračunali povprečne vrednosti koncentracij PGF2-alfa in standardne odklone med tremi različnimi merjenji za vseh 40 pacientk. Zaradi prevelikega odstopanja smo iz nadaljnjih izračunov izključili pacientko z zaporedno številko 9, katere povprečna vrednost koncentracije PGF2-alfa znaša 3694,47 ng/L in je kar trikrat višja od naslednje najvišje povprečne vrednosti koncentracije PGF2-alfa. Standardni odklon te pacientke je 1280,83 ng/L, kar razberemo iz preglednice XI.

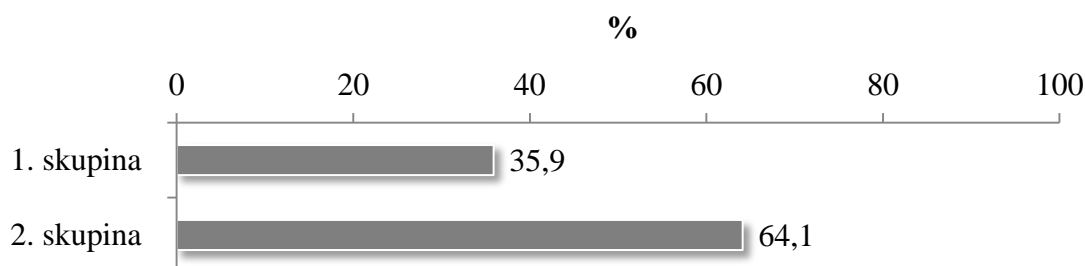
Preglednica XI: Povprečne vrednosti koncentracij PGF2-alfa med tremi različnimi merjenji za 40 pacientk

Pacientka	Skupina	Povprečna konc. PGF2-alfa (ng/L)	Standardni odklon (ng/L)
9	2	3694,47	1280,83
6	2	1123,9	561,87
28	1	1043,9	274,96
27	2	827,57	264,3
16	1	825,43	663
13	2	792,2	161,55
40	1	760,6	335,08
10	1	697,13	504,3
17	2	667,1	402,29
15	1	636,73	492,94
19	1	616,07	134,07
4	1	615,93	26,06
7	2	600,5	125,53
11	2	589,53	322,05
8	2	580,17	139,02
38	1	528,8	187,08
5	2	498,9	116,24
3	2	476,8	166,82
1	2	459,47	33,42
31	1	457,3	446,14
24	2	423,03	360,84
2	2	408,63	261,08
33	2	391,63	211,11
35	2	364,23	167,51
25	2	357,27	369,71
12	2	337,3	269,44
22	1	297,87	78,34
14	2	296,6	191,1
39	2	271,07	199,4
23	2	244,5	21,23
18	1	237,83	39,75
29	1	210,33	60,45
30	2	207,6	64,74
34	2	194,8	139,26
26	1	164,27	137,29
32	1	163,33	183,06
36	2	111,6	37,87
21	2	93,83	84,62
20	2	79,77	79,11
37	2	13,37	23,07

Naš vzorec po izločitvi pacientke pod zaporedno številko 9 predstavlja 39 pacientk, razdeljenih v dve skupini:

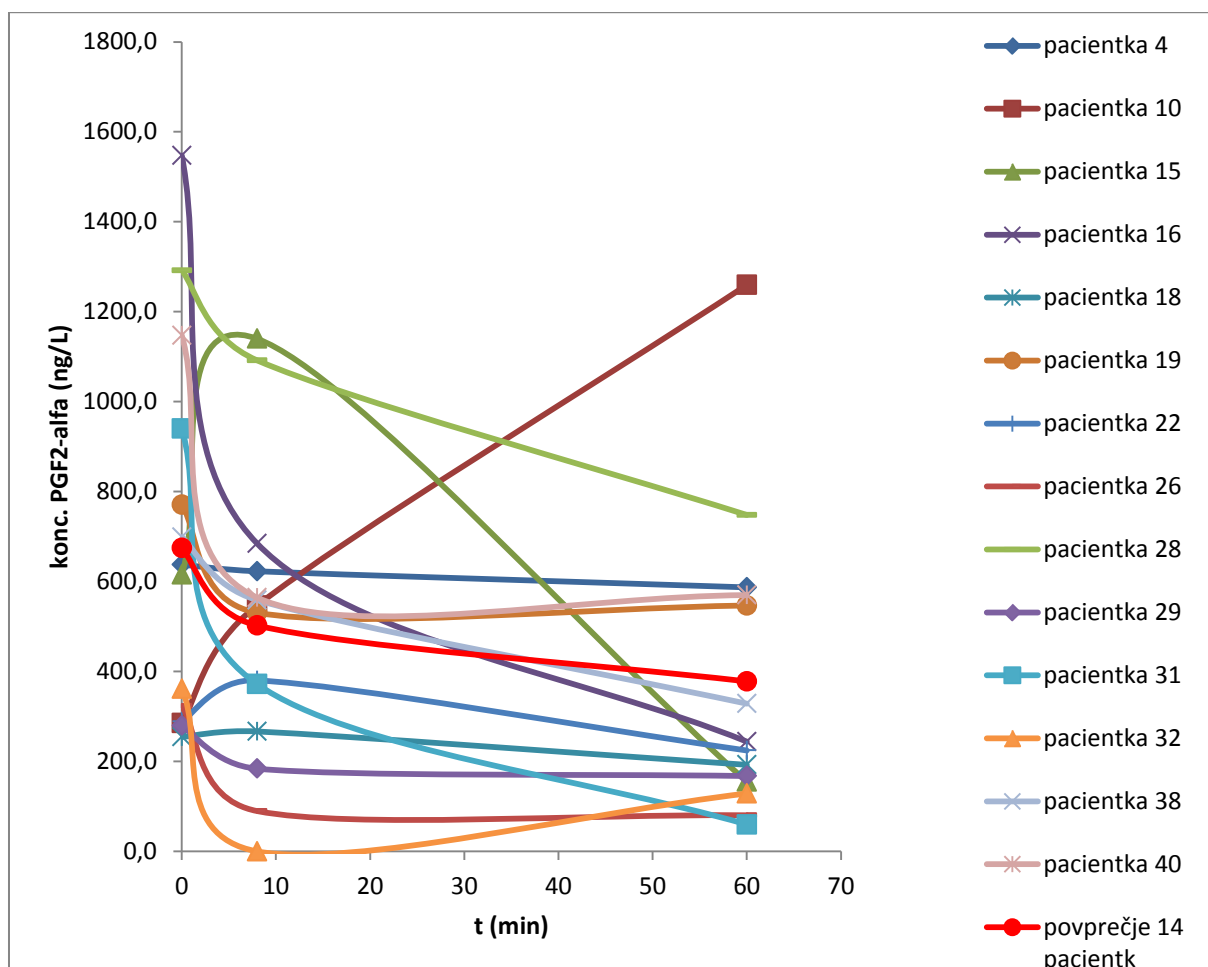
1. skupina: 14 pacientkam smo opravili postopek v PROLIFERACIJSKI FAZI
2. skupina: 25 pacientkam smo opravili postopek v SEKRECIJSKI FAZI

Procentualno je predstavljeno v grafu 6.



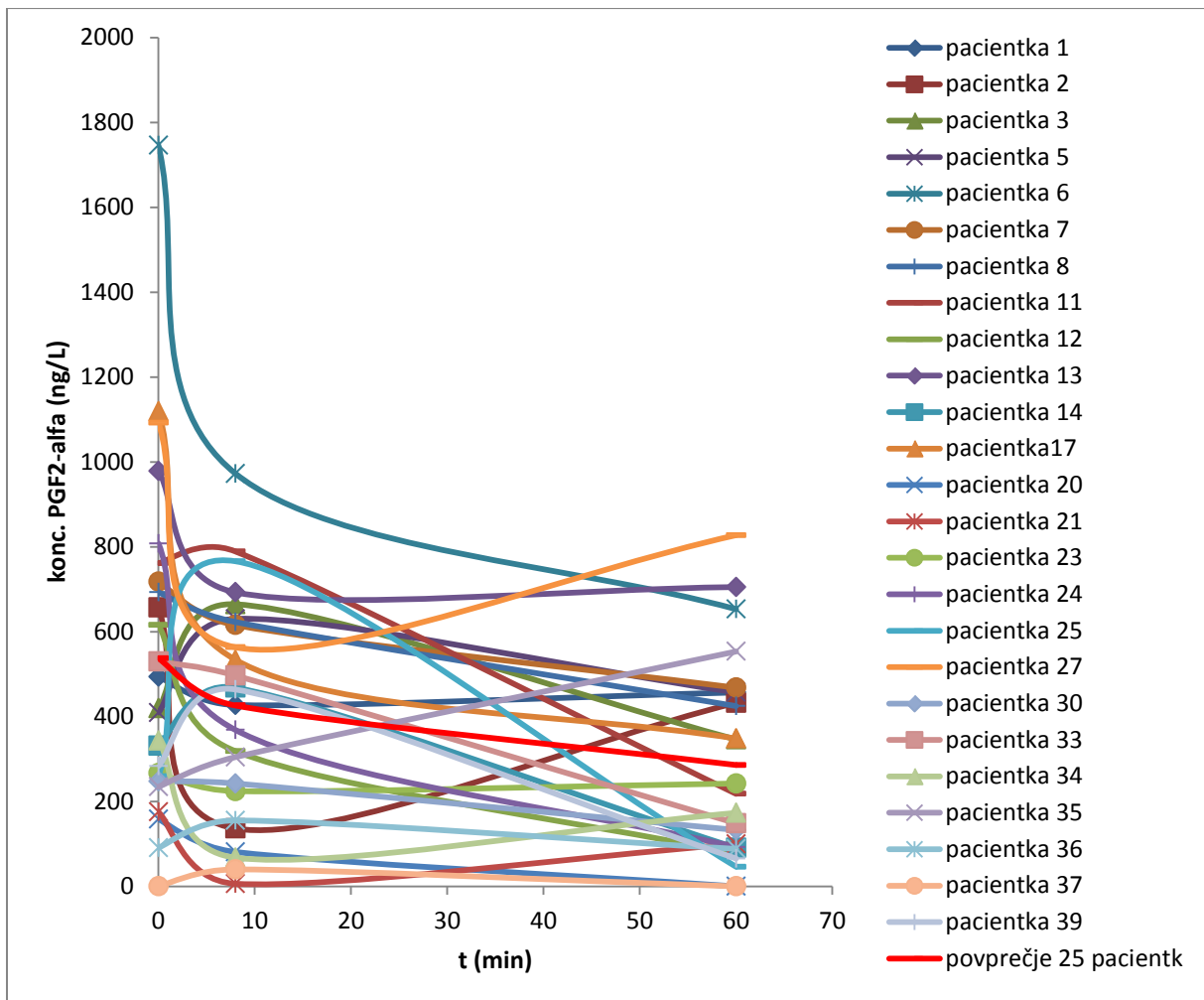
Graf 6: Vzorec pacientk glede na fazo izvedbe postopka

Vzorec v večji meri predstavljajo pacientke iz 2. skupine oz. iz sekrecijske faze (64,1 %).



Graf 7: Koncentracija PGF2-alfa (ng/L) v odvisnosti od časa (min) za 14 pacientk v 1. skupini.

Iz grafa 7 lahko razberemo, da pri sedmih pacientkah koncentracija PGF2-alfa s časom pada. Pri eni pacientki koncentracija PGF2-alfa narašča, medtem ko pri treh pri času t2 naraste in nato pade pri času t3. Pri treh pacientkah koncentracija pri času t2 pade in se pri t3 malo zviša.



Graf 8: Koncentracija PGF2-alfa (ng/L) v odvisnosti od časa (min) za 25 pacientk v 2. skupini

Iz grafa 8 pa vidimo, da pri devetih pacientkah koncentracija pada s časom, pri eni narašča. Da koncentracija pri času t2 naraste in nato pri t3 pade, se izkaže pri osmih pacientkah, obratno pa da pri t2 pade in se nato pri t3 dvigne, pa pri sedmih pacientkah.

4.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

V nadaljevanju bomo predstavili rezultate statistične analize koncentracij PGF2-alfa pri obeh skupinah pacientk. Vse teste smo opravili pri stopnji značilnosti 0,05. To pomeni, da se z verjetnostjo tveganja α (5 %) parameter nahaja v tem območju.

OPISNA STATISTIKA

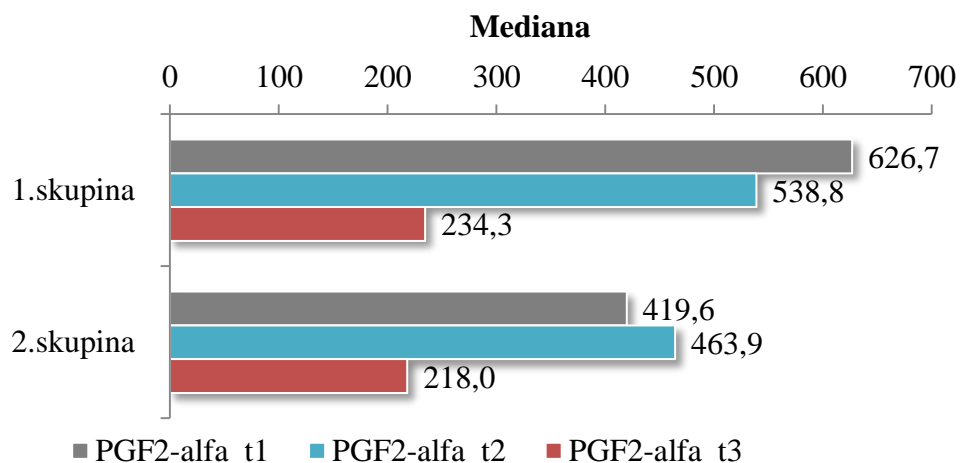
Predstavili smo vrednosti median, aritmetične sredine in standardnih odklonov za vseh 39 pacientk, ter kakšne so vrednosti znotraj posamezni skupini. To smo tudi grafično prikazali.

Preglednica XII: *Opisne statistike vrednosti koncentracij PGF2-alfa merjenih pri časih t1, t2 in t3*

Deskriptivna statistika

Skupina		PGF2-alfa_t1	PGF2- alfa _t2	PGF2- alfa _t3
1. skupina	Mediana (ng/L)	626,7	538,8	234,3
	Aritmetična sredina (ng/L)	674,4	502,4	378,0
	N	14	14	14
	Standardni odklon (ng/L)	421,2	330,9	333,7
2. skupina	Mediana (ng/L)	419,6	463,9	218,0
	Aritmetična sredina (ng/L)	537,3	426,1	286,0
	N	25	25	25
	Standardni odklon (ng/L)	396,2	263,3	236,2
Skupaj	Mediana (ng/L)	494,1	468,1	224,4
	Aritmetična sredina (ng/L)	586,5	453,5	319,0
	N	39	39	39
	Standardni odklon (ng/L)	405,3	287,4	274,5

Razlika med vrednostim koncentracije PGF2-alfa je pri časih t1 in t2 podobna, medtem ko se občutno nižje vrednosti kažejo pri t3. V nadaljevanju smo prikazali srednje vrednosti koncentracij PGF2-alfa.



Graf 9: Vrednosti median (ng/L) v posamezni skupini glede na čas merjenja

Iz grafa 9 vidimo, da v 1. skupini vrednost median s časom pada. V 2. skupini pa je vrednost mediane pri času t2 višja kot pri času t1. Pri času t3 pa je vrednost mediane dosti nižja.

TEST NORMALNE PORAZDELJENOSTI KONCENTRACIJ PGF2-ALFA

Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo za določanje normalne porazdelitve koncentracije PGF2-alfa:

H_0 : Koncentracija PGF2-alfa se porazdeljuje normalno.

H_1 : Koncentracija PGF2-alfa se ne porazdeljuje normalno.

Informacijo o porazdeljenosti naše spremenljivke smo dobili s testom Kolmogorov-Smirnov.

Preglednica XIII: Normalnost porazdelitve spremenljivk koncentracije PGF2-alfa

	Kolmogorov-Smirnov ^a	
	df	p
Konc. PGF2-alfa_t1	39	0,033
Konc. PGF2-alfa_t2	39	0,200*
Konc. PGF2-alfa_t3	39	0,005

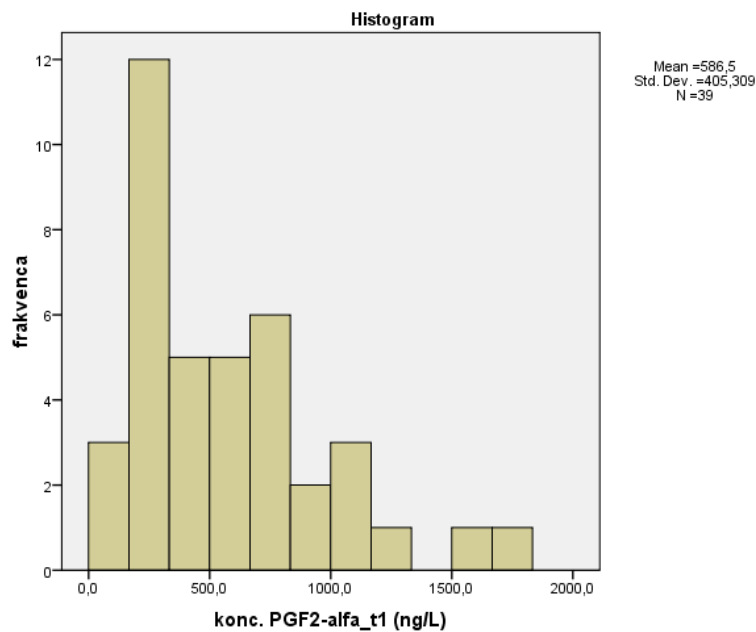
* To je spodnja meja prave signifikance.

a. Lilliefors-ov popravek signifikance.

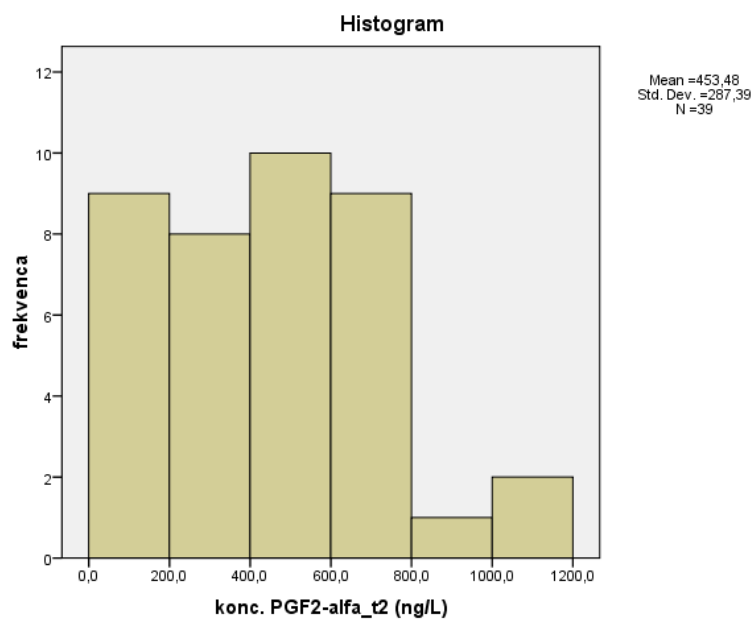
Teste smo naredili pri stopnji značilnosti 0,05. To pomeni, da se z verjetnostjo tveganja α (5 %) parameter nahaja v tem intervalu. Iz preglednice XIII je razvidno, da je stopnja

značilnosti pri Kolmogorov-Smirnovem testu za koncentracijo PGF2-alfa pri času t1 0,033 in času t3 0,005 in je nižja od 0,05. To pomeni, da se ti podatki ne porazdeljujejo statistično značilno normalno. To prikažeta tudi grafa 10 in 12, kjer so koncentracije PGF2-alfa grupirane v stolpce oz. razrede in višina stolpca je sorazmerna s frekvenco razreda. Porazdelitev je asimetrična v desno. Koncentracije PGF2-alfa pri času t3 pa se porazdeljujejo normalno. To nam pokaže graf 11.

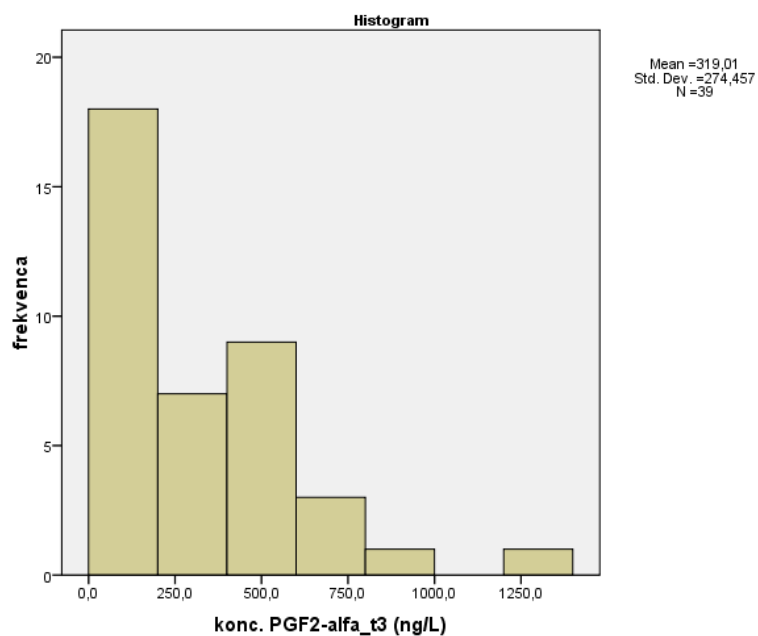
V našem primeru podatki ne porazdeljuje normalno, zato zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno.



Graf 10: Histogram porazdelitve koncentracije PGF2-alfa (ng/L) pri času t1, pri katerem smo s Kolmogorov-Smirnovim testom dokazali, da porazdelitev ni normalna



Graf 11: Histogram porazdelitve koncentracije PGF2-alfa (ng/L) pri času t2, pri katerem smo s Kolmogorov-Smirnovim testom dokazali, da je porazdelitev normalna



Graf 12: Histogram porazdelitve koncentracije PGF2-alfa (ng/L) pri času t3, pri katerem smo s Kolmogorov-Smirnovim testom dokazali, da porazdelitev ni normalna

NEPARAMETRIČNI FRIEDMANOV TEST

Koncentracije PGF2-alfa se ne porazdeljujejo statistično značilno normalno, zato smo uporabili neparametrični Friedmanov test za več odvisnih spremenljivk. Z njim smo preverili, ali so statistično pomembne razlike znotraj obeh skupinah med koncentracijami PGF2-alfa pri časih t1, t2 in t3.

Preglednica XIV: Rezultati Friedmanovega testa v 1. skupini

Rangi

	Povprečni rang
PGF2-alfa_t1	2,64
PGF2-alfa_t2	2,00
PGF2-alfa_t3	1,36

Testna statistika

N	14
Hi-kvadrat	11,571
df	2
p	0,003

a. Friedmanov test

Izkazalo se je, da so statistično pomembne razlike med koncentracijami PGF2-alfa pri časih t1, t2 in t3, če uporabimo stopnjo značilnosti 0,05 oz. manj kot 5 %. P vrednost je 0,003.

Preglednica XV: Rezultati Friedmanovega testa v 2. skupini

Rangi

	Povprečni rang
PGF2-alfa_t1	2,56
PGF2-alfa_t2	2,04
PGF2-alfa_t3	1,40

Testna statistika

N	25
Hi-kvadrat	16,880
df	2
p	<0,0005

a. Friedmanov test

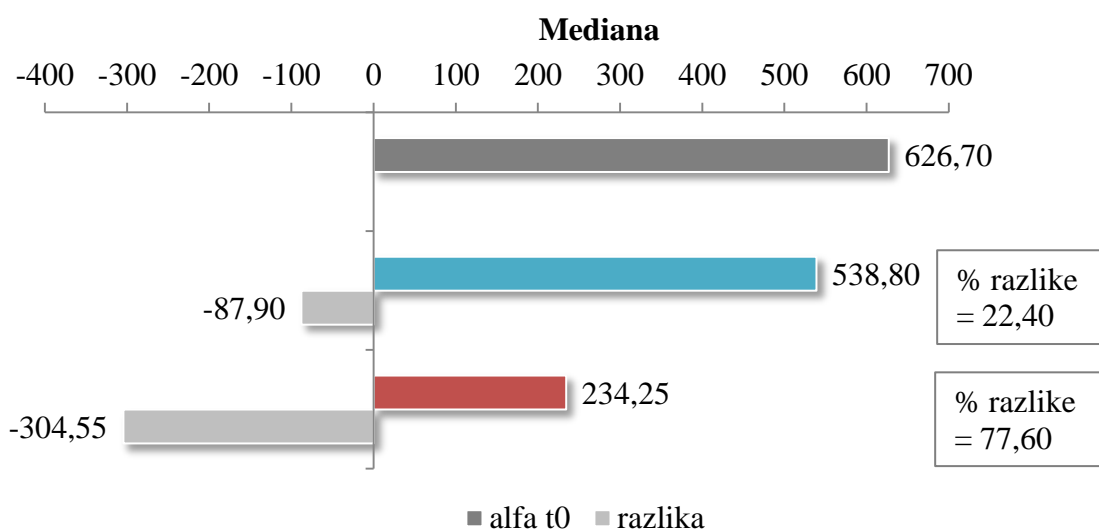
Preglednica XV nam pokaže, da so razlike v koncentracijah PGF2-alfa pri časih t1, t2 in t3. Dobljena p vrednost je manjša od 0,05.

RAZLIKE MEDIAN V PRVI IN DRUGI SKUPINI

Pogledali smo razliko med drugim in prvim odvzemom krvi, ter med tretjim in drugim odvzemom. Pripravili smo preglednici XVI in XVII ter grafa 13 in 14.

Preglednica XVI: Izračunane razlike median za 1. skupino

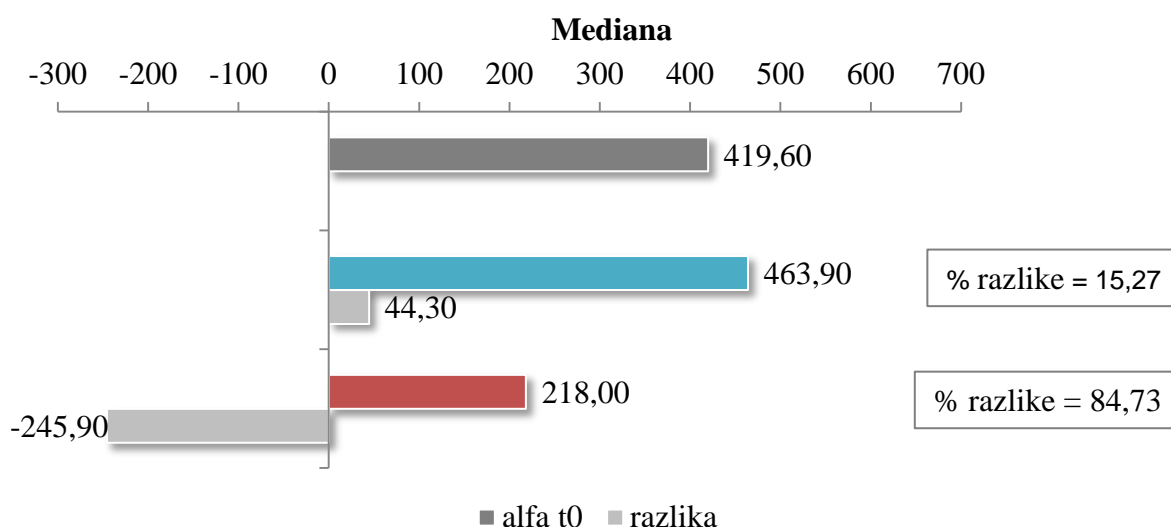
Me	Alfa t0	Razlika	Absolutne vrednosti	% razlike
t1	626,70			
t2	538,80	-87,90	87,90	22,40
t3	234,25	-304,55	304,55	77,60
	1399,75	-392,45	392,45	100,00



Graf 13: Odstotek razlike v 1. skupini

Preglednica XVII: Izračunane razlike median za 2. skupino

Me	Alfa t0	Razlika	Absolutne vrednosti	% razlike
t1	419,60			
t2	463,90	44,30	44,30	15,27
t3	218,00	-245,90	245,90	84,73
	1101,50	-201,60	290,20	100,00



Graf 14: Odstotek razlike v 2. skupini

Vidimo, da je med prvim in drugim časom % razlike nižji v 2. skupini kot v 1.. Med drugim in tretjim časom pa je % razlike višji v 2. skupini. Obe razliki sta v 1. skupini negativni, medtem ko je v 2. skupini prva razlika (med prvim in drugim časom) pozitivna, druga (med drugim in tretjim časom) pa negativna.

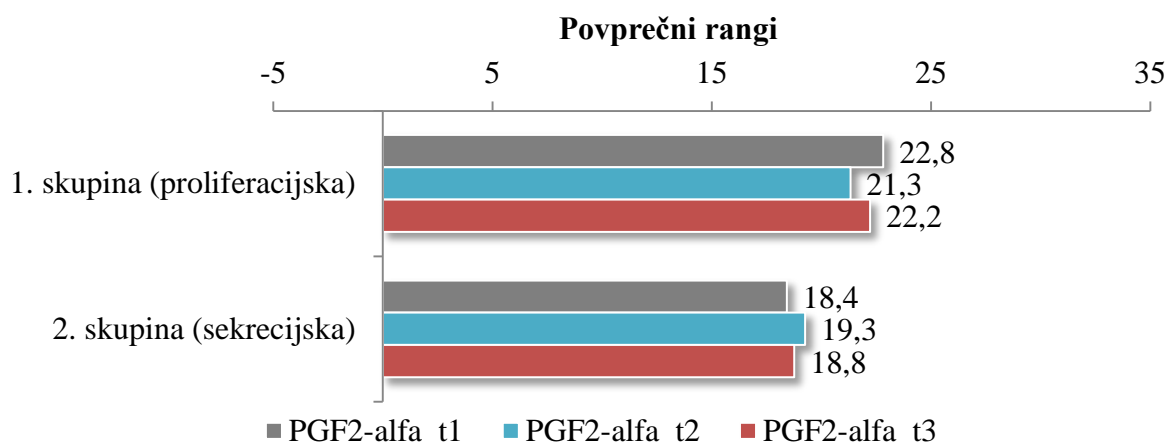
MANN-WHITNEYEV TEST ZA PREVERJANJE RAZLIK MED SKUPINAMA

Postavili smo hipotezo in jo preverili z Mann-Whitneyevim testom.

H1: Srednje vrednosti koncentracij PGF2-alfa so nižje pri pacientkah v proliferacijski fazi (1. skupini) ciklusa kot v sekrecijski fazi (2. skupini).

Preglednica XVIII: Rangi pri spremenljivki PGF2-alfa za različne čase merjenja glede na skupini

Rangi			
	Skupina	N	Povprečni rang
PGF2-alfa_t1	1. skupina	14	22,82
	2. skupina	25	18,42
	Skupno	39	
PGF2-alfa_t2	1. skupina	14	21,32
	2. skupina	25	19,26
	Skupno	39	
PGF2-alfa_t3	1. skupina	14	22,21
	2. skupina	25	18,76
	Skupno	39	



Graf 15: Povprečni rangi v posamezni skupini in v različnih časih merjenja

Preglednica XVIII in graf 15 nam prikazeta, katera skupina ima večjo vrednost koncentracij PGF2-alfa. V našem primeru jih ima 1. skupina, saj ima večjo vrednost povprečnih rangov kot 2. skupina. Zanima nas, ali je ta razlika med skupinama pri 5 % stopnji tveganja statistično značilna (preglednica XIX).

Preglednica XIX: Rezultati Mann-Whitneyevega testa

Testna statistika

	PGF2-alfa_t1	PGF2-alfa_t2	PGF2-alfa_t3
Mann-Whitney U	135,50	156,50	144,00
p (2-stransko)	0,247	0,588	0,364

a. Spremenljivka grupiranja: skupina

Neparametrični test Mann-Whitney za preverjanje razlik med skupinama (preglednica XX) ne kaže statistično pomembnih razlik, saj je vrednost stopnje značilnosti večja od 0,05. Hipotezo zato zavračamo.

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo med seboj primerjali dve imunokemijski metodi, in sicer metodo ELISA (metoda A) in metodo EIA (metoda B). Naš namen je bil ugotoviti, ali sta metodi med seboj primerljivi. V analizo smo vzeli 100 vzorcev seruma in z obema metodama določili koncentracije PGF2-alfa. Korelacija med rezultati obeh metod je odlična, saj je korelacijski koeficient (r) 0,99. Tudi stopnja ujemanja obeh metod je visoka, saj je le 5 vrednosti razlik izven meja skladnosti. Torej sta metodi primerljivi. Odločili smo se, da bomo za določanje koncentracij PGF2-alfa v naši študiji uporabili metodo A, saj je cenovno ugodnejša.

Za metodo A smo preverili natančnost. Izvedli smo ponovljivost v dnevu in med dnevi. Ponovljivost v dnevu smo določili z meritvijo 6 vzorcev in vsak vzorec smo znotraj istega testa izmerili večkrat ($n = 15$) in izračunali KV. Ponovljivost med dnevi smo določili z meritvijo treh vzorcev v 10 dneh in izračunali KV. Izkazalo se je, da je ponovljivost v dnevu in med dnevi odlična.

Na 87 vzorcih smo določali tudi korelacijo koncentracij PGF2-alfa v serumu in heparinizirani plazmi. Plazma je biološki material, ki je priporočen za analizo, vendar v Sloveniji še vedno veliko delamo s serumi. S tem pa je daljši tudi čas, ki ga porabimo za analize, saj moramo pri serumih počakati, da se kri koagulira in nato odstraniti strdek. Rezultati so pokazali, da je korelacija (povezanost) med njima odlična, praktično linearna, saj je korelacijski koeficient (r) 0,99.

Jakost bolečine po operaciji, ki jo zaznava vsak posameznik, je odvisna od načina kirurškega dela, pacientovih izkušenj, praga za bolečino, okolice in zdravljenja. V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kakšna je zaznava bolečine preko določitve koncentracije PGF2-alfa. Večja je koncentracija PGF2-alfa, močnejša naj bi bila bolečina.

Mnenja o povezavi med točno koncentracijo PGF2-alfa in bolečino so deljena. Na to kažeta tudi naslednji študiji. V randomizirani pilotni študiji, ki so jo opravili na 24 pacientkah, ki so trpele za dismenorejo, so povezali koncentracijo PGF2-alfa z bolečino. Pacientke so zdravili s spinalno manipulacijo. Gre za nefarmakološko terapijo za zdravljenje bolečine. Pacientkam so merili bolečino z VAS skalo 15 minut pred terapijo in 60 minut po zaključeni terapiji. Ob istih časih so jim vzeli vzorce krvi, da so določili koncentracije PGF2-alfa v plazmi. Po terapiji je bila bolečina signifikantno manjša. To znižanje pa je bilo povezano s pomembnim znižanjem plazemske koncentracije PGF2-alfa (29).

Obstaja študija (35), ki pa kaže na to, da je bolečina povezana s samim trajanjem postopka in ne s koncentracijo sproščenega PGF2-alfa. Ta študija je bila narejena na dveh skupinah pacientk. Prvi skupini so opravili ablacijo endometrija z Nova Sure metodo (ablacija z bipolarnimi elektrodami), drugi skupini pa s Thermachoice. V prvem primeru (Nova Sure) je poseg trajal 2 minuti, v drugem (Thermachoice) pa 8 minut. Vrednosti PGF2-alfa se statistično niso razlikovale med skupinami, so pa pacientke, katerim so opravili poseg z Nova Sure, zaznale manjšo med- in pooperativno bolečino.

Ne glede na drugo študijo, smo se odločili, da je koncentracija sproščenega PGF2-alfa kriterij za bolečino, vendar v naši diplomski nalogi nismo izvajali meritev za oceno bolečine z vizualno ali numerično skalo.

Vzrok za bolečino med posegom naj bi bil sproščeni PGF2-alfa. Zato se običajno za preoperativno pripravo uporabljajo NSAR, ki zavirajo encim COX in s tem zmanjšajo sintezo prostaglandinov ter posledično bolečino.

Pri vseh 40 pacientkah so izvedli enak kirurški poseg, ablacijo endometrija s Thermachoice II toplotnim balonom, in enako farmakološko terapijo. Eno uro pred posegom so aplicirali 100 mg tramadola intramuskularno namesto NSAR, ker tramadol ne vpliva na sintezo prostaglandinov, katerih vlogo pri bolečini želimo pojasniti. Istočasno so pacientke peroralno zaužile tableto s 5 mg diazepamom za pomiritev. Tik pred samimi posegom so jim aplicirali lokalni anestetik 1 % ksilokain. Vsaki pacientki so odvzeli tri epruvete venske krvi (tik pred posegom (t1), takoj ob koncu posega (t2) in 60 minut po zaključenem posegu (t3)).

Pacientka pod zaporedno številko 9 ima povprečno vrednost koncentracije PGF2-alfa 3694,47 ng/L in je trikrat višja od naslednje najvišje povprečne vrednosti koncentracije PGF2-alfa. Pričakovali bi, da se pri tej pacientki postopek ablacije ne bo zaključil zaradi premočne bolečine. Vendar je bila uspešnost postopka 100 %, pri nobeni pacientki ni prišlo do prekinitve postopka ablacije. Pacientka pod zaporedno številko 9 ima verjetno zelo visok prag bolečine in je zaradi prevelikega odstopanja nismo upoštevali pri nadaljnjih analizah.

Pacientke smo razdelili v dve skupini glede na endometrijski cikel: 1. skupino – proliferacijsko fazo (14 pacientk) in 2. skupino – sekrecijsko fazo (25 pacientk).

1. skupina: pri sedmih pacientkah koncentracija PGF2-alfa pada s časom, predvidevamo, da se je bolečina zmanjšala, torej je bila farmakološka terapija z analgetikom in lokalnim anestetikom učinkovita. Pri eni pacientki pride do porasta koncentracije s časom in s tem do večjega občutenja bolečine, tu zdravila za preprečitev bolečine niso bila učinkovita. Pri treh pacientkah koncentracija pri t2 naraste, nato pa pri t3 pade. Prišlo je torej do porasta bolečine med oz. takoj po operaciji. Tem pacientkam je bila verjetno aplicirana dodatna analgezija oz.

anestezija, vendar teh podatkov nimamo. Obstaja pa študija (34), ki pravi, da se močna bolečina med posegom pojavi kar pri 25 % pacientk, katerim opravijo poseg ablacije endometrija s toplotnim balonom. Pri treh pacientkah pa koncentracija pri t2 pade, nato pa se pri t3 malo zviša, kar kaže na to, da so učinki zdravil za preprečitev bolečine popustili ali pa so za ta porast krivi kakšni drugi mehanizmi za zaznavo bolečine.

2. skupina: pri devetih pacientkah koncentracija pada s časom, pri eni pa narašča. Pri osmih pacientkah koncentracija pri t1 naraste, nato pa pri t3 pade. Tu je bila mogoče tudi aplicirana dodatna analgezija oz. anestezija. Pri sedmih pa koncentracija pri t2 pade, nato pa se pri t3 zviša.

Debelina endometrija je v proliferacijski fazi okrog 3–4 mm, na koncu sekrecijske faze pa znaša 5–6 mm. V kohortni študiji so dokazali pozitivno korelacijo med debelino endometrija in stopnjo medoperativne in pooperativne bolečine (34). Debelejši je endometrij, močnejša je bolečina. Zato je priporočljivo opraviti poseg takoj po menstruacijski krvavitvi ali pa endometrij preoperativno stanjšati s peroralnimi kontraceptivi. V našem primeru bi pričakovali, da so v 1. skupini koncentracije PGF2-alfa nižje kot v 2., saj je debelina endometrija pri pacientkah v 2. skupini večja, vendar vidimo, da so koncentracije PGF2-alfa višje pri pacientkah iz 1. skupine. Pričakovati je, da koncentracija PGF2-alfa pade od časa t1 do t2, saj pričakujemo, da sta analgetik in lokalni anestetik prispevala k temu. To se pokaže v 1. skupini, saj vrednosti padejo za 22,40 %. Medtem ko v 2. skupini vrednosti od t1 do t2 narastejo za 15,27 %. Mogoče ta padec vrednosti koncentracij med t1 in t2 pri 1. skupini vseeno kaže na to, da je postopek ablacije smiselno opraviti v proliferacijski fazi ciklusa. To je lahko vpliv debeline endometrija, če je bila farmakološka terapija pri obeh skupinah enaka. Pacientke 1. skupine so lahko imele že v osnovi višje koncentracije PGF2-alfa. Razlika med t2 in t3 je za 1. skupino 77,60 % in za 2. skupino 84,73 %. Pri obeh skupinah vrednosti padejo.

Preverili smo, kako se porazdeljuje naša spremenljivka, koncentracija PGF2-alfa, ob različnih časih. Izvedli smo Kolmogorov-Smirnov test in videli, da se večina naših podatkov ne porazdeljuje statistično značilno normalno. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili za neparametrični Friedmanov test. Z njim smo preverili, ali so statistično pomembne razlike znotraj obeh skupinah med koncentracijami PGF2-alfa pri časih t1, t2 in t3. Rezultati so pokazali, da so statistično pomembne razlike ($p < 0,05$). Postavili smo hipotezo, da so srednje vrednosti koncentracij PGF2-alfa nižje pri pacientkah v 1. skupini kot v 2. skupini. Uporabili smo neparametrični Mann-Whitneyev U-test za preverjanje razlik med skupinama. Ta je

pokazal vrednost stopnje značilnosti večjo od 0,05. To pomeni, da ni statistično pomembne razlike med skupinama, zato smo hipotezo zavrnil.

V našem primeru lahko, da res ni bilo statistično pomembnih razlik v koncentraciji PGF2-alfa med skupinama, ali pa je na to vplivalo, da so pacientke v 1. skupini imele že v osnovi višje koncentracije PGF2-alfa pri času t1 ali da so dodatna anestezija oz. analgezija zbrisale razlike med skupinama.

Na naše rezultate je lahko vplivalo tudi dejstvo, da sta bili skupini neenakomerni in sta vsebovali relativno majhno število pacientk. Pomagali nam bi tudi podatki o debelini endometrija, ker je možno, da so imele pacientke obeh skupin patološko spremenjeno debelino endometrija.

6 SKLEP

Želeli smo ugotoviti zaznavo bolečine med in po posegu ablacije endometrija s toplotnim balonom z določitvijo koncentracije prostaglandinov F2-alfa, ob predpostavki, da sta v medsebojni korelaciji. Obstajajo različne poti za to. Dobro bi bilo, da bi imeli pri naši raziskavi podatke kvalitativnih skal za oceno bolečine, kot sta vizualna analogna skala ali numerična skala. Kljub temu se moramo zavedati, da bi bil tak rezultat merjenja subjektiven podatek. Vemo, da na jakost bolečine vpliva več dejavnikov, med katere spadajo tudi bolnikovo psihofizično stanje, njegove predhodne izkušnje z bolečino in prag za bolečino.

V diplomski nalogi smo najprej primerjali dve encimskoimunski metodi. Ugotovili smo naslednje:

- Korelacija med rezultati obeh metod je dobra in tudi stopnja ujemanja je zelo visoka. Metodi A in B sta med seboj primerljivi. Obe metodi sta primerni za določanje koncentracij prostaglandinov F2-alfa. Mi smo se odločili, da bomo v nadaljevanju uporabili metodo A.

Preverili smo natančnost metode A in izvedli ponovljivost v dnevu in med dnevi.

- Ponovljivost v dnevu in med dnevi je odlična.

Primerjali smo koncentracije prostaglandinov F2-alfa, izmerjene z metodo A v vzorcih seruma in vzorcih heparinizirane plazme.

- Rezultati so pokazali, da je korelacija (povezanost) med njima odlična.

V raziskavi smo ugotavljali pomen koncentracije prostaglandinov F2-alfa kot pokazatelja bolečine pri ablaciji endometrija s Thermachoice toplotnim balonom. Prišli smo do naslednjih rezultatov:

- Obstajajo statistično pomembne razlike znotraj obeh skupin med koncentracijami prostaglandinov F2-alfa.
- Na podlagi naših rezultatov nismo dokazali statistično pomembne razlike med skupinama oz. da faza menstrualnega ciklusa vpliva na povečano sproščanje prostaglandinov F2-alfa, ker so rezultati koncentracij prostaglandinov F2-alfa preveč variabilni.

7 LITERATURA

1. Kolenc M.: Porodništvo, Zavod Republike Slovenije za šolstvo in šport, Ljubljana, 1993: 20-23.
2. 6. Spominski sestanek akad. prof. dr. Lidije Andolšek-Jeras, Nepravilne krvavitve iz maternice v rodnem obdobju, Zbornik, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, 2010.
3. Borko E., Takač I.: Ginekologija, Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola, Maribor, 2006: 35-46 , 97-109, 229-231.
4. Kocijančič A.: Knjiga o klimakteriju, EWO, Ljubljana, 1995, 15-21.
5. Bresjanac M., Rupik M.: Patofiziologija s temelji fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 161-162, 119-123.
6. Johnson T.: Knowledge and attitudes regarding the menstrual cycle, oral contraceptives, and sport performance: The conceptualization and development of a questionnaire for athletic coaches, <http://diginole.lib.fsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2594&context=etd> (dostopano: januar 2014)
7. Quint EH, Smith YR: Abnormal uterine bleeding in adolescents. *Journal of Midwifery & Women's Health* 2003; 48; 186-191.
8. Sodobni postopki v odkrivanju in zdravljenju patologije maternične votline, Zbornik prispevkov, Slovensko društvo za reproduktivno medicino, Ljubljana, 1998: 14-17, 76-80.
9. Engstrom JL, Rose R, Brill IA, Polhill MK, Lukanich MC, Fritz L: Midwifery care of the woman with menorrhagia. *Journal of Nurse-Midwifery* 1999; 44; 89-105.

10. Chen BH, Giudice LC: Dysfunctional uterine bleeding. *Western Journal of Medicine* 1998; 169; 280-284.
11. Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji, Zbornik, Slovensko društvo za reproduktivno medicino, Ljubljana, 2001: 37.
12. Meden-Vrtovec H.: Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji, Klinični center, SPS Ginekološka klinika, Ljubljana, 2002, 131-140.
13. Farrell E: Dysfunctional uterine bleeding. *Australian Family Physician* 2004; 33; 906-908.
14. Porteous A, Prentice A: Medical management of dysfunctional uterine bleeding. *Reviews in Gynaecological Practice* 2003; 3; 81-84.
15. Bongers MY, Mol BWJ, Brölmann HAM: Current treatment of dysfunctional uterine bleeding. *Maturitas* 2004; 47; 159-174.
16. Ribič-Pucelj M.: Endoskopske operacije v ginekologiji, Radovljica, 2007: 385-402
17. Hurskainen R: Managing drug-resistant essential menorrhagia without hysterectomy. *Best Practice&Research Clinical Obstetrics&Gynaecology* 2006; 20; 681-694.
18. Klinični oddelek za reprodukcijo UKC Ljubljana, <http://www.reprodukcija.si/preiskave/histeroskopija/> (dostopano: marec 2014).
19. Apgar BS, Kaufman AH, Uche GN, Kittendorf A: Treatment of menorrhagia. *American Family Physician* 2007; 75; 1813-1819.
20. Obrhan S: Ocenjevanje in merjenje akutne pooperativne bolečine, Obzornik zdravstvene nege 2000; 34: 215-20.
21. 1. seminar o bolečini, Zbornik predavanj, Slovensko združenje za zdravljenje bolečine in Splošna bolnišnica Maribor, 1997: 17-53.

22. Ribarič S.: Seminarji iz patološke fiziologije, 1. izd., UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2008: 201-208.
23. Ribarič S.: Temelji patološke fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 263-270.
24. Faganeli N.: Zdravljenje in vodenje akutne pooperativne bolečine. Farmacevtski vestnik 2012; 63: 10-13.
25. 9. seminar o bolečini, Zbornik predavanj, Slovensko združenje za zdravljenje bolečine in Splošna bolnišnica Maribor, 2005: 173-177.
26. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Klinicna_farmacija/Bolecina/Mrhar_Bolecina.pdf (dostopano marec 2015).
27. Antolič G.: Prostaglandini. Obzornik zdravstvene nege 1978; 12: 157-161.
28. Ricciotto E., FitzGerald G.: Prostaglandins and Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31: 986-1000.
29. Kokjohn K., Schmid D., Triano J., Brennan P.: The effect of spinal Manipulation on Pain and Prostaglandin Levels in Women with Primary Dysmenorrhea. Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics 1992; 15: 279-285.
30. [http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133041/documents/ab133041%20-%20PGF2%20alpha%20ELISA%20Kit%20vs%20\(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133041/documents/ab133041%20-%20PGF2%20alpha%20ELISA%20Kit%20vs%20(website).pdf) (dostopano: februar 2015).
31. Munro MG: Gynecare ThermaChoice Uterine Balloon Therapy System: Minimal dilation and technical changes for enhanced coverage. Supplement to OBG management 2009; 11-16.

32. Vilos GA, Edris F: Second-generation endometrial ablation technologies: the hot liquid balloons. *Best Practice&Research Clinical Obstetrics&Gynaecology* 2007; 21; 947-967.
33. Cooper KG: Outpatient endometrial ablation. *Best Practice&Research Clinical Obstetrics&Gynaecology* 2005; 19; 713-726.
34. Grulović B, Ribič MP, Krnić M, Kokić V: Impact of prostaglandin F2-alpha and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) on pain in patients undergoing thermal balloon endometrial ablation. *Collegium Antrpologicum* 2013; 37; 1185-1190.
35. Laberge P., Sabbah R., Fortin C., Gallinat A.: Assessment and Comparison of intraoperative and postoperative pain associated with NowaSure and ThermaChoice ablation systems. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 2003; 10; 223-232.
36. <http://soscentre.in/ua/obstetrics-gynaecology/> (dostopano: maj 2014)

8 PRILOGE

Priloga 1: *Koncentracije PGF2-alfa (ng/L) določene iz 87 vzorcev*

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Serum	Plazma
1	281	289
2	301	291
3	224	228
4	140	148
5	171	159
6	363	376
7	146	151
8	310	287
9	204	207
10	299	295
11	291	275
12	347	353
13	400	387
14	281	279
15	94,4	97,5
16	127	126
17	175	158
18	178	175
19	225	216
20	370	336
21	354	334
22	219	252
23	210	222
24	162	157
25	73,8	80
26	69,5	74,6

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Serum	Plazma
27	124	131
28	210	210
29	307	266
30	416	427
31	30,3	29,2
32	59,1	57,1
33	121	128
34	220	207
35	299	302
36	332	327
37	71	72,9
38	134	143
39	388	342
40	374	357
41	48,6	46,3
42	185	187
43	17,5	17,7
44	45,1	34,2
45	57,1	58
46	70	71,7
47	94,4	91
48	78,2	78,3
49	87,5	99,6
50	122	120
51	154	171
52	150	153
53	182	175
54	206	191
55	127	131
56	189	183
57	190	206

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Serum	Plazma
58	387	378
59	347	392
60	363	354
61	67,4	64,5
62	131	125
63	78,3	66,5
64	123	101
65	173	146
66	171	156
67	27,5	27
68	36,1	39,6
69	52,5	55,5
70	84,7	90,9
71	113	122
72	154	150
73	223	241
74	302	330
75	366	414
76	404	446
77	60,8	50,3
78	76,7	77,1
79	124	98,4
80	128	107
81	138	132
82	219	212
83	267	281
84	252	237
85	396	408
86	480	459
87	397	386

Priloga 2: Koncentracije PGF2-alfa (ng/L) določene iz 100 vzorcev z metodo A in metodo B

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Metoda A	Metoda B
1	954	859
2	348	300
3	130	121
4	242	225
5	243	232
6	123	103
7	637	584
8	193	168
9	108	89,6
10	604	535
11	618	624
12	318	299
13	170	154
14	167	151
15	263	220
16	260	219
17	1,45	1,23
18	124	104
19	530	525
20	269	249
21	276	245
22	243	213
23	7,75	6,32
24	1124	927
25	53,7	44,9
26	117	114
27	821	794
28	19,3	18,2
29	19,3	18,3

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Metoda A	Metoda B
30	320	302
31	448	421
32	6,88	6,89
33	62,1	48
34	4,94	4,5
35	40,6	33
36	43,1	37,8
37	336	291
38	41,6	34,8
39	952	910
40	139	125
41	662	639
42	51,9	39,4
43	737	630
44	3,07	2,64
45	972	893
46	209	203
47	7,25	7,17
48	843	678
49	347	309
50	51,6	45,7
51	1,56	1,97
52	3,72	4,07
53	6,34	5,58
54	977	960
55	44,6	40,7
56	34,3	28,8
57	492	465
58	8,19	7,05
59	5,85	4,38
60	245	205

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Metoda A	Metoda B
61	2,52	2,09
62	154	133
63	272	256
64	669	610
65	6,76	6,16
66	1,75	2,43
67	134	120
68	10	8,57
69	550	532
70	22,6	21,3
71	913	894
72	815	751
73	638	561
74	1	1,3
75	722	633
76	141	113
77	714	575
78	24,1	20,4
79	1,54	2,23
80	29,9	21,8
81	25,8	21,2
82	42,5	36,1
83	8,01	6,66
84	4,93	4,19
85	6,36	5,38
86	3,76	1,41
87	36,4	30,4
88	62,5	50,5
89	19,4	15,9
90	4,22	3,31
91	643	574

Vzorec	Konc. PGF2-alfa (ng/L)	
	Metoda A	Metoda B
92	399	336
93	178	153
94	436	353
95	100	91
96	316	279
97	18,1	15,7
98	17,3	15,7
99	5,15	3,94
100	25,8	21,1