

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd



Bakalářská práce

Stanovení parametrů ovariální funkce

Autor: Barbora Jará

Vedoucí práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitelka: RNDr. Michala Vosátková, MBA

2022

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Název práce: Stanovení parametrů ovariální funkce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitelka: RNDr. Michala Vosátková, MBA

Vypracovala: Barbora Jará

Hladiny hormonů řídících funkce ovarií jsou důležitými ukazateli vývoje i zdravotního stavu ženského organismu. Pro správné diagnostické postupy je důležité laboratorní vyšetření a správná interpretace výsledků. Z hormonů ovariálních funkcí je nejčastěji testována hladina estradiolu, progesteronu, luteinizačního a folikulostimulačního hormonu. Používají se separační a imunochemické metody. Pro běžnou klinickou praxi jsou imunochemické metody vhodné zejména svou dostupností, relativní přesností, nenáročností a rychlostí zpracování. Jejich nedostatkem je nemožnost standardizace jednotlivých metodických přístupů. Sérii vyšetření a interpretaci výsledků získaných pomocí imunochemických metod lze provádět pouze v rámci jednoho pracoviště.

Klíčová slova: estradiol, imunochemické metody, ECLIA, CMIA, RIA

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Thesis title: Determination of ovarian function parameters

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph. D.

Consultant: RNDr. Michala Vosátková, MBA

Created by: Barbora Jará

The levels of hormones that control of ovaria are important markers of development and health status of the female organism. Laboratory examination and correct interpretation of the results are important for proper diagnostic procedures. Among the hormones of ovarian function, the level of estradiol, progesterone, luteinizing and follicle-stimulating hormones is most often tested. Separation and immunochemical methods are used. For common clinical practice, immunochemical methods are particularly suitable due to their availability, relative accuracy, unpretentiousness, and speed of processing. The impossibility of standardizing individual methodological approaches represents the shortcoming of these methods. A series of examinations and interpretation of results can be performed using immunochemical methods only within one workplace.

Keywords: estradiol, immunochemical methods, ECLIA, CMIA, RIA

Děkuji své vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph. D. a školitelce RNDr. Michale Vosátkové, MBA za pomoc, rady, odborné vedení a vstřícnost.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Obsah

Úvod a cíl práce	8
1. Teoretická část.....	9
1.1 Funkční anatomie vaječníků.....	9
1.1.1 Ovariální cyklus.....	10
1.1.2 Menstruační (<i>endometriální</i>) cyklus.....	11
1.2 Hormonální řízení ovariálních funkcí	11
1.2.1 Steroidní hormony.....	11
1.2.2 Transportní proteiny pro steroidní hormony	12
1.2.3 Jaderné receptory	12
1.2.4 Steroidogeneze	12
1.2.5 Eliminace steroidních hormonů	14
1.2.6 Androstendion.....	14
1.2.7 Estradiol.....	14
1.2.8 Progesteron	15
1.3 Peptidové hormony	16
1.3.1 Receptory peptidových hormonů a hypotalamo-hypofyzárních hormonů	16
1.3.2 Inhibin A.....	17
1.3.3 Choriový gonadotropin	17
1.3.4 Antimülleriánský hormon.....	17
1.3.5 Hormony hypofýzy	18
1.3.6 Regulece a hypotalamo-hypofyzární systém.....	18
1.3.7 Gonadoliberin.....	18
1.3.8 Luteinizační hormon.....	18
1.3.9 Folikulostimulační hormon.....	19
1.4 Metody stanovení parametrů ovariálních funkcí	19
1.4.1 Separační metody.....	19
1.4.2 Imunochemické metody	21
1.4.3 Dělení imunochemických metod.....	21

1.4.4	Vliv věku na hormony ovariálních funkcí	22
2.	Experimentální část.....	24
2.1	Metody	24
2.1.1	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza	24
2.1.2	Chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza.....	25
2.1.3	Radioimunoanalýza.....	25
2.1.4	Imunoradiometrická analýza	26
2.2	Výsledky.....	27
3.	Diskuse	31
4.	Závěr.....	33
	Seznam použitých zkratk.....	34
	Použitá literatura	35
	Seznam obrázků	37
	Zdroje obrázků	37
	Seznam tabulek	37

Úvod a cíl práce

Sledování ovariální funkce se v současné době dostává do popředí hned z několika důvodů. Jednak jako součást diagnostiky v rámci reprodukční medicíny, dále při sledování plodnosti žen po onkologické léčbě. Ovaria se podílí na sexuálním vývoji ženy, metabolismu lipidů, vývoji kostí a reprodukci. Funkce ovaríí je zajištěna ovariálním a endometriálním cyklem. Nejčastěji stanovované parametry jsou hormony: estradiol, progesteron, luteinizační hormon, folikulostimulační hormon, androstendion, inhibin A a choriový gonadotropin. Tyto hormony mají mezi sebou určitou provázanost, navzájem se doplňují a ovlivňují. Dalším důvodem monitorování ovariální funkce je pravidelné sledování zdravých žen. V posledních letech přibývá případů ovariální dysfunkce, která zapříčiňuje neplodnost, syndrom polycystických vaječníků, rozvoj vrozených chorob a nádorů. Včasné odhalení dysfunkce ovaríí dává šanci na obnovu ovariální funkce. V určitých případech ani včasná diagnostika nezabrání trvalé dysfunkci, především u genetických poruch. Dle ÚZIS od roku 2010 do roku 2019 přibylo dvojnásobné množství neplodných párů, zhruba u 39 % bylo příčinou ovariální selhání a v 61 % se prokázaly jiné důvody, související například s imunologickými problémy, endometriózou a genetickými problémy.

Vyšetřované hormony se stanovují imunochemickými metodami i separačními metodami. Nejvyužívanější rutinní analýzou je elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA).

Cílem teoretické části práce bylo popsat jednotlivé hormony řídící funkci ovaríí včetně jejich syntézy, mechanického účinku, degradace a biologickou funkci. Dalším úkolem pak bylo zhodnotit současné analytické možnosti vyšetřování jednotlivých hormonů z hlediska provedení, dostupnosti a možných úskalí. Dále pak podrobněji popsat metody imunochemické, jako dostupný způsob stanovení všech běžných parametrů.

Cílem experimentální části práce bylo porovnávat přesnost a správnost imunochemických metod ECLIA, CMIA, RIA a IRMA při stanovení vybraných hormonů v séru pacientek.

1. Teoretická část

1.1 Funkční anatomie vaječnicků

Ovaria (vaječnický) jsou párový retroperitoneálně umístěný orgán. Jedno *ovarium* váží 6-10 g. *Ovaria* zajišťují produkci steroidních hormonů, zrání a tvorbu vajíček. Steroidní hormony ovarií lze zařadit do dvou skupin, estrogenů a gestagenů. Steroidní hormony ovarií spolu s hypofyzárními hormony regulují menstruační cyklus (1).

Ovaria jsou tvořena povrchovým jednovrstevným epitelem s kubickými až dlaždicovými buňkami a mikrokly na apikálním povrchu. Pod epitelem se nachází vrstvy pojivové tkáně, *tunica albuginea* a *stroma ovarii*. *Tunica albuginea* obsahuje kolagenní vazivo a myofibroblasty. *Stroma ovarii* je tvořeno řídkým vazivem s kolagenními a retikulárními vlákny. Nachází se zde také specializované fibroblasty s tukovými kapénkami, nervy, krevní a mízní cévy. Místo vstupu cév do vaječnicku nazýváme *hilum*, které obsahuje intersticiální buňky *hilu* produkující androgeny. Parenchym rozdělujeme na dvě části, centrální dřevnou a vnější korovou. Ve dřevně se vyskytují krevní cévy. V kůře nacházíme folikuly a různá stádia vyvíjejícího se žlutého tělíska (2).

Ženské pohlavní buňky vznikají ze zárodečných *gonocytů*, které se nadále diferencují v *oogonie*. *Oogonie* jsou kulaté buňky s cytoplasmou, jež obsahuje Balbianiho tělíska-shluky organel. V 5. měsíci, vývoje *oogonie*, dosahují počtu 5-7 milionů. Zdvojením chromatid v jádře *oogonie* se vytvoří primární oocyt, který je složen z kubických folikulárních buněk. Folikulární buňky obklopuje *zona pellucida* a jejich střed je tvořen vrstvou *theca folliculi*. Oocyt nadále vstupuje do buněčného cyklu meiózy, kdy vzniká sekundární oocyt s haploidním redukováným počtem chromatid. Sekundární oocyt je tvořen kubickými folikulárními buňkami ve vrstvách. U folikulárních buněk se *theca folliculi* rozděluje na *theca folliculi interna*, která obsahuje thekální buňky produkující androgeny, a *theca folliculi externa*. Sekundární oocyt nadále zůstává v klidu až do pohlavní vyspělosti, kdy může dojít k dalšímu buněčnému dělení. Při dalším vývoji je oocyt obklopen *zonou pellucidou* a navíc *coronou radiatou*, takto zralý (Graafův) folikul je posléze vypuzen mimo *ovaria*. Pokračuje v dalším buněčném dělení, kde buď projde ovulací, nebo dojde k oplození oocytu. Několik folikulů je přeměněno na *corpus luteum*, tvořený *theca folliculi interna* obsahující granulózní i thekální buňky. Buňky si navyšují počet svých receptorů pro luteinizační hormon (LH). Při navázání LH dochází k produkci steroidních hormonů, především progesteronu. Tento mechanismus vede k udržení těhotenství, při neoplození oocytu dochází k zániku *corpus luteum*. Folikulostimulační hormon (FSH) ovlivňuje jednotlivá stádia folikulů od plochých po vrstvu kubických buněk (2).

Hematofolikulární bariéra ochraňuje folikuly a je složená z bazálních buněk membránového endotelu a z granulózních buněk bazální membrány. Hematofolikulární bariéra propustí pouze malé molekuly (do velikosti 500 kDa) a jedná se o určitou ochranu před protilátkami. Protilátky mohou vznikat kvůli „crossing-over“ při meióze, kdy se genetická výbava teprve rekombinuje a mohla by být rozpoznána imunitním systémem jako cizí. Dalším mechanismem vedoucím k zániku folikulů je atrézie folikulů, programovaný zánik. Během cyklu dozrává 6-12 folikulů z 300-500 tisíc folikulů vytvořených ve vaječnících, tento zbytek folikulů podléhá atrézii (2).

Luteogeneze, tj. vývoj žlutého tělíska začíná prasknutím folikulu ve *stroma ovarii* a vzniká červená sraženina zvaná *corpus rubrum* (červené tělísko). Stěna kolem sraženiny je tvořena granulózními a thekálními buňkami. Prorůstání *corpus rubrum* vazivem, leukocyty a erytrocyty se přetváří v *corpus rubrum*. Toto přetvoření vede k vytvoření *corpus luteum*, které má na povrchu zmnožené receptory pro LH. Funkcí *corpus luteum* je sekrece zejména progesteronu, estrogenů i androgenů. Při neoplození *corpus luteum* degeneruje, podléhá apoptóze, zmnožuje se vazivo a zbytky jsou odstraňovány fagocytózou. Při oplození se corpus luteum zvětšuje a v cytoplasmě se objevují eozinofilní vakuoly. Při oplození a uhníždění zárodka dochází k produkci lidského choriového gonadotropinu (hCG). Vylučování progesteronu přechází z větší části na placentu a zároveň se produkuje hormon relaxin. Relaxin tlumí stahy děložního svalstva, uvolňuje sponu stydkou, křížokyčelní kloub a křížokostrční spojení (2).

1.1.1 Ovariální cyklus

Ovariální cyklus zahrnuje změny spojené s kůrou vaječníků, zráním folikulů a tvorbou hormonů. Délka jednoho cyklu se pohybuje kolem 28 dní a rozdělujeme do tří fází (2).

První fáze je folikulární-proliferační a trvá od 1. do 14. dne cyklu. Dochází k vývoji folikulů vlivem působení FSH a tvorbou estrogenů. Zároveň estrogeny tlumí zpětnovazebně účinek FSH a tento mechanismus způsobí, že plně se vyvine pouze jeden folikul zhruba z 12 folikulů. Dochází ke zvýšenému vyplavování estrogenů a zároveň se vyplavuje LH. Když se dokončí 1.fáze *meiózy*, vzniká sekundární *oocyt* a nastává fáze ovulace (2).

Druhou fází je ovulace a trvá 12-14 den cyklu. Během ovulace vzniká *stigma folliculare*, vyvýšenina na povrchu vaječníků a stává se místem, kde se vypudí sekundární *oocyt*. Sekundární *oocyt* obsahuje kolem sebe buňky tvořící *coronu radiatu* a vyžrávání se zastaví ve 2.fázi *meiózy* v metafázi. *Oocyt* se vypudí do vejcovodu a je

připraven k oplodnění. Zároveň v této fázi je zde nejvyšší vzestup hladin FSH a LH (3) (2).

Třetí fáze je luteální-sekreční a trvá 15-28 den cyklu. Dochází k luteogenezi a k sekreci progesteronu v *corpus luteum*. Při oplodnění se snižuje hladina LH a zvyšuje se hladina progesteronu. Takto se připravuje a udržuje tělo pro případné těhotenství. Když nedojde k oplodnění, pak *corpus luteum* po 10-12 dnech zaniká, snižuje se hladina progesteronu a estrogenů. Začne sekrece FSH a nová folikulární fáze (2).

1.1.2 Menstruační (*endometriální*) cyklus

Jedná se o změny děložní sliznice spojené s hormonální hladinou estrogenů a progesteronů. Je též podobný k ovariálnímu cyklu. Zahrnuje fázi menstruační, proliferační a sekreční (2).

Fáze menstruační probíhá mezi 1.-4. dnem cyklu, pouze v případě neoplodnění vajíčka. Pojí se s nízkou hladinou progesteronu. Dochází k ischemickým změnám ve *stratum functionale endometrii*. Stáhnou se tepny a dojde k prokrvení celé vrstvy endometria. Část endometria se odloučí a vyplaví do pochvy. Krvácení je zastaveno stahem děložní svaloviny a tepen (2).

Fáze proliferační probíhá mezi 5.-14 dnem cyklu. Obnoví se *stratum basale endometrie* vlivem estrogenů, k proliferaci buněk sliznice. Fáze končí den po ovulaci vyvinutím tepen (2).

Fáze sekreční probíhá mezi 15.-28. dnem cyklu. Dochází ke snížení proliferace vlivem progesteronu. Buňky v epitelu se zvětšují a shromažďují glykogen. Dojde k predeciduální reakci, zvětšují se buňky naplněné glykogenem a lipidovými kapénky, tyto buňky posléze budou sloužit k výživě zárodku během uhnízdění v děloze. Prokrví se sliznice, která je vysoká 6-7 mm. Když není vajíčko oplodněno, hladina estrogenů a progesteronu se snižuje. Stáhnou se tepny, je vyvolána ischemie *endometria* a nastává menstruační fáze (2).

1.2 Hormonální řízení ovariálních funkcí

1.2.1 Steroidní hormony

Nejčastějším ukazatelem ovariální funkce je hladina steroidních hormonů. Jejich koncentrace v krvi je poměrně nízká a nejsou organismem tvořeny do zásoby. Steroidní hormony ovlivňují signální dráhy, růst, reprodukci i metabolismus. Můžeme je rozdělit do 6 skupin: glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny, estrogeny, gestageny a kalcitriol. Jsou lipofilní a v krvi jsou většinou vázané na plazmatickou bílkovinu. Základem

jejich struktury je cholesterolové jádro. Typická je přítomnost oxoskupiny na třetím uhlíku a dvojná vazba mezi čtvrtým a pátým uhlíkem. Postranní řetězec mají kratší než cholesterol (3; 4).

1.2.2 Transportní proteiny pro steroidní hormony

Jedná se o plazmatické bílkoviny transportující steroidní hormony k místu účinku, většinou k endokrinním žlázám. V krvi jsou nejčastěji steroidní hormony transportovány navázané na albumin a pouze v malém množství se vyskytují ve volné formě. Estrogeny jsou v krvi navázané na albumin a globulin vázající sexuální hormony (SHBG). Progesteron je v krvi vázán na bílkovinu albumin a v menším množství na transkortin (4; 5).

1.2.3 Jaderné receptory

Na povrchu buněk jsou přítomné intracelulární nukleární receptory pro steroidní hormony. Receptor je v jádře i v cytoplazmě a je specifický s vysokou afinitou. Jedná se o proteiny vázající lipofilní část hormonu. Steroidní hormony jsou rozpustné v tucích a jsou schopné procházet buněčnou membránou. Váží se na specifický cytoplazmatický receptor a dochází k přerušení předchozí vazby receptoru s proteinem nazvaným „heat shock“ protein (HSP). Vazba receptoru s hormonem vyvolá konformační změnu. Vzniklá konformace proniká do jádra a navazuje se na DNA, kde ovlivní transkripci genů. Přímo se váže na sekvenci nukleotidů zvaných hormone response element (HRE), která je typická pro každý hormon a ovlivňuje transkripci jen určitých genů. Tento proces ovlivňuje aktivitu polymeráz a množství mRNA. Vytvářejí se indukované proteiny a jejich počet ovlivňuje vznik specifické buněčné odpovědi (6; 5).

1.2.4 Steroidogeneze

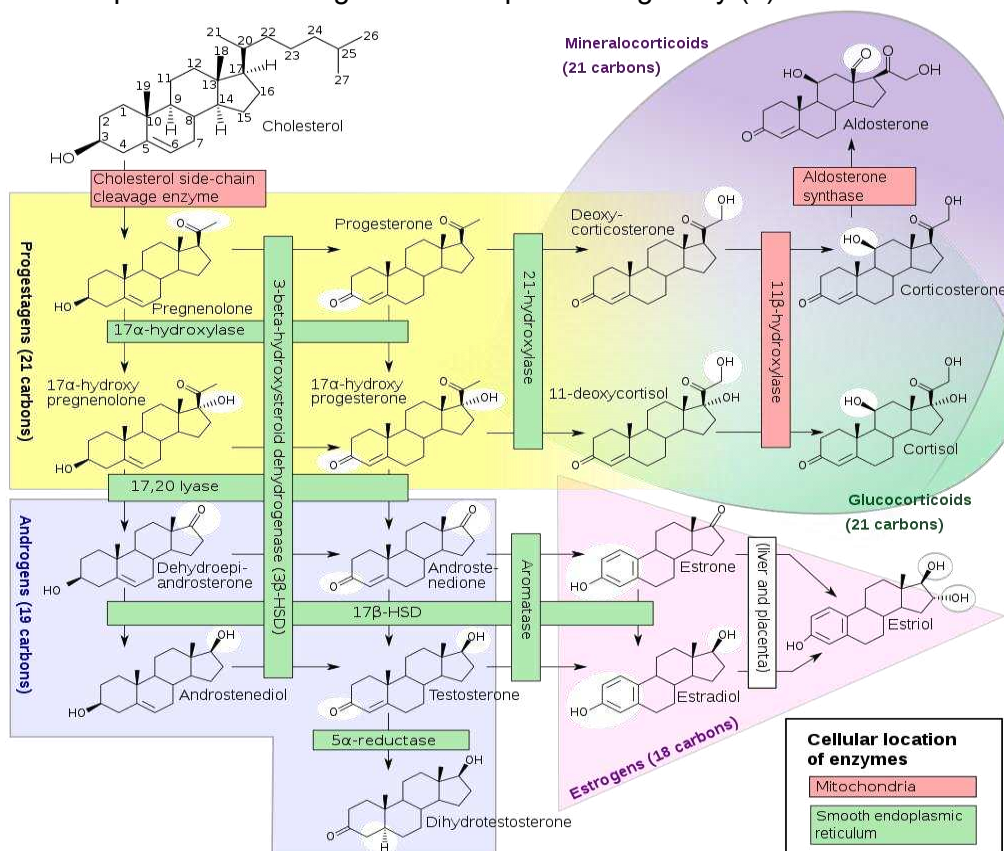
Je označení procesů vedoucí ke vzniku steroidních hormonů z cholesterolu. Tato syntéza probíhá v endokrinních buňkách kůry nadledvin, varlat, ve folikulárních buňkách *ovarií* a v *corpus luteum*. Kůra nadledvin dokáže syntetizovat v určitém množství většinu steroidních hormonů. Androgeny jsou syntetizovány zejména Leydigovými buňkami *testes* a estrogeny folikulárními buňkami *ovarií* (7).

Steroidogeneze je zahájena zkrácením bočního řetězce cholesterolu zhruba o šest uhlíků, tuto reakci katalyzuje cytochrom-P-450- řetězec odštěpující enzym, též nazýván desmoláza. Proteinkinázy a cAMP zvyšují katalytickou aktivitu desmolázy. Zvyšuje se fosforylace cholesterolu a jeho zvýšené množství v buňce. Na molekulární úrovni je desmoláza ovlivňována expresí genu s cAMP regulujícím elementem (CRE), který zvyšuje transkripci RNA a tvorbu desmolázy. Negativní zpětnou vazbu zajišťuje

HMG-CoA reduktáza. Za katalýzy desmolázy vzniká z cholesterolu pregnenolon, základní prekurzor steroidních hormonů. Následující reakce pro jednotlivé skupiny steroidních hormonů probíhají v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Reakce katalyzují hydroxylázy za přítomnosti O_2 a $NADPH+H^+$. Nadále se reakce účastní dehydrogenázy, isomerázy a lyázy (7).

Přeměnu cholesterolu na pregnenolon v gonádách podporuje LH. LH se váže na specifický receptor endokrinních buněk gonád a aktivuje adenylátcyklázu, která zvyšuje množství cAMP i desmolázy v buňce. Estrogenem tvořeným *ovariemi* je 17- β -estradiol, v jiných tkáních je tvořen estron a během těhotenství se vylučuje estriol. Prekurzory vzniku estrogenů jsou androstendion a testosteron. Reakce katalyzovaná aromatázou dává vznik aromatického jádra v kruhu A testosteronu, vzniká estradiol. Při účinku aromatázy na androstendion vzniká estron. Estrogeny jsou v krvi navázány na specifický transportní globulin (GBG). Progesteron má jednodušší cestu syntézy. Vzniká z pregnenolonu za katalýzy isomerázy (7).

Rychlost syntézy estrogenů je regulována v průběhu menstruace. Mezi mechanismy regulace se řadí snížení tvorby aromatázy, inhibice vzniklé aromatázy nebo i blokace specifického estrogenního receptoru antagonisty (7).



Obrázek 1 Schéma steroidogeneze.

Steroidogeneze. In Wikiskripta [online].

1.2.5 Eliminace steroidních hormonů

Steroidní hormony jsou eliminovány v játrech. Za působení enzymů dochází k hydroxylaci, oxidaci OH skupin a redukci ketoskupin. Před finálním vyloučením jsou steroidní hormony konjugovány s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem. Vzniklé metabolity jsou lipofilní a vážou se na transportní proteiny a jsou vyloučeny ledvinami nebo i žlučí. Metabolity v moči se vyšetřují pro získání informací o hormonálním metabolizmu. Sekrece estrogenů závisí na menstruačním cyklu, a je přímo úměrná syntéze. Progesteron je vyloučen močí v podobě pregnandiolu (3; 4; 7).

1.2.6 Androstendion

Androstendion je významný jako prekurzor pro syntézu steroidních hormonů. Jeho základní chemickou strukturou je cholesterolové jádro o 19 uhlících s dvojnou vazbou na 4 uhlíku a dvěma ketoskupinami na 3 a 17 uhlíku (3; 8; 9).

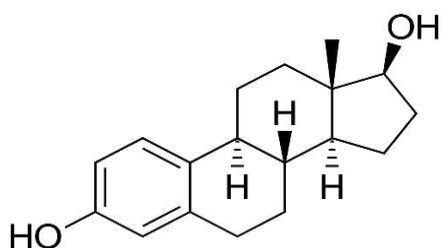
1.2.7 Estradiol

Estradiol je ženský pohlavní hormon. Společně s estronem a estriolem je zahrnován do skupiny estrogenů. Z chemického hlediska se jedná o derivát estranu, osmnácti uhlíkatý steroidní hormon s aromatickými jádrem a dvěma hydroxylovými skupinami umístěnými na C3 a C17, toto uspořádání zajišťuje estrogení účinek. Je tvořen v tekálních a granulózniích buňkách ovariálního folikulu ve vaječnicích, v Leydigových buňkách varlat, v placentě a malé množství je tvořeno v kůře nadledvin. Vztah mezi estrogeny lze vyjádřit jako poměr estradiol:estron:estriol číselně 1:0,5:0,1 (7; 8).

Estrogeny působí proteoanabolickým účinkem, podílejí se zejména na tvorbě pohlavních ženských znaků, vývoji reprodukčních orgánů, proliferaci endometria dělohy, regulaci produkce hlenu ve vagíně, zvyšují ochranu před vaginální infekcí. Dále se podílí na regulaci menstruačního cyklu, tvorbě tuků, funkci mléčné žlázy, ukládání vápníku v kostech, zadržování vody v těle, také zvyšují průtok krve vaječníky, ovlivňují zrání folikulu i vajíčka a mohou mít tlumící vliv na emoční depresi (8; 10; 11).

Tvorba estrogenů je řízena glandotropními hormony, mezi které řadíme LH a FSH. Glandotropní hormony se váží na thekální buňky pomocí receptorů vázajících se na G-protein (GPCR) a dochází k aktivaci adenylátcyklázy s následnou aktivací cAMP a proteinkinázy A (PK-A). PK-A spolu s cholesterolsterhydrolázou a steroidogenním akutním regulačním proteinem (StAR) zprostředkuje přenos cholesterolu do mitochondrií, kde proběhnou další metabolické pochody vedoucí k tvorbě steroidních hormonů (3; 11).

Syntéza estradiolu začíná tvorbou cholesterolu, který je metabolizován na pregnenolon, prekursor steroidních hormonů. Hydroxylací pregnenolonu vzniká 21 uhlíkatý progesteron, poté dochází k hydroxylaci na 17 uhlíku a vzniká 17-OH-progesteron, prekursor androstendionu. Z androstendionu vzniká estron, kdy dochází k aromatizaci jádra, který katalyzuje enzym aromatáza. Estradiol vzniká hydroxylací estronu, nebo též aromatizací jádra. Aromatáza obsahuje komplex enzymů, z nichž nejdůležitější je P450-oxidáza zajišťující dehydrogenaci a hydroxylaci. Aromatáza je přítomná v endoplazmatickém retikulu vaječníků, v hepatocytech a v adipocytech, její aktivitu podporuje FSH (3; 7; 8).



Obrázek 2 Strukturální vzorec estradiolu.

Estradiol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online].

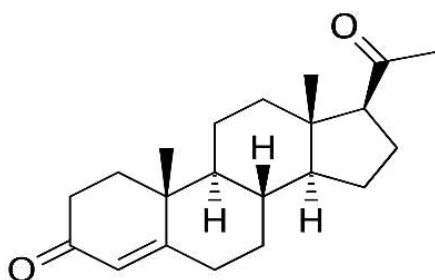
1.2.8 Progesteron

Progesteron je produkován folikulem, žlutým tělískem, placentou, kůrou nadledvin a je zároveň prekurzorem k syntéze steroidních hormonů kůry nadledvin, mužských i ženských pohlavních hormonů. Jedná se o 21 uhlíkatý steroidní hormon se dvěma ketonovými skupinami na třetím a dvacátém uhlíku. Progesteron má antiestrogenní a antigonadotropní účinek, proto se používá i jako antikoncepce. Sekrece progesteronu je ovlivňována negativní zpětnou vazbou, snižuje hladinu LH a FSH, dochází k přerušení ovulace a ke zvýšené pravděpodobnosti oplození vajíčka spermií. Produkce adrenokortikotropního hormonu (ACTH), růstového hormonu (GH) i aldosteronu je potlačena. Vysoké dávky progesteronu působí anesteticky, zejména vlivem vznikajícího metabolitu pregnenolonu. Ten snižuje frekvenci epileptických záchvatů, též ovlivňuje deprese objevující se před menstruací a v posledním trimestru těhotenství. Také zvyšuje tělesnou teplotu v rámci cyklu, proteosyntézu, proteolýzu i vylučování sodných iontů. Syntéza je ovlivňována i hladinou estrogenů. A s tím souvisí závislost menstruačního cyklu na progesteronu, zejména v druhé polovině cyklu (3; 8; 12).

Obsazením receptorů pro estrogeny zamezuje progesteron sekreci ostatních gonadotropinů. Při oplození nezaniká corpus luteum a hladina progesteronu neklesá, ale podporuje růst *myometria* dělohy pro uhnízdění oplozeného vajíčka. Fáze proliferační

přejde do fáze sekreční. V druhé třetině těhotenství se produkuje progesteron i placentou. Podporuje laktaci, vývoj lobuloalveolárního systému prs. Při neoplození se zpětnovazebně vyvazuje a dojde k zániku corpus luteum, k útlumu účinku progesteronu (2; 3; 13).

Aktivaci syntézy progesteronu regulují glandotropiny, zajišťující přenos cholesterolu do mitochondrií. Syntéza progesteronu vychází z pregnenolonu, kdy dochází k dehydrataci hydroxylové skupiny na C-3 a přemístěním dvojně vazby na pozici C-4. Důležitým metabolitem progesteronu, vylučovaných močí, je pragnandiol, ukazatel funkce žlutého tělíska. Hydroxylací 17 uhlíku progesteronu vzniká prekurzor pro další steroidní hormony (3; 7; 8).



Obrázek 3 Strukturální vzorec progesteronu.

Progesteron. In: *Wikipédia: the free encyclopedia* [online].

1.3 Peptidové hormony

Mezi další významné ukazatele ovariální funkce patří peptidové hormony zahrnující hCG, inhibin A, AMH a hypotalamo-hypofyzární hormon. Vznikají translační úpravou prohormonů v endoplazmatickém retikulu. Obsahují sekvence aminokyselin, které jsou specifické pro dané buňky. Tyto buňky začnou produkovat hormony, jenž ovlivňují endokrinní žlázy (3; 7).

1.3.1 Receptory peptidových hormonů a hypotalamo-hypofyzárních hormonů

Hormony hypotalamo-hypofyzárního systému a hormony s účinkem na ovariální funkci jsou peptidové povahy. Receptory tvoří soustavu integrálních transmembránových proteinů a jsou složeny ze tří domén. Extracelulární doména navazuje hormon z extracelulárního prostředí, krve. Specifita receptoru je velmi vysoká. Transmembránová doména zajišťuje přesun hormonu do nitra buňky. Tato doména se skládá ze sedmi α helixů. Uvnitř buňky je intracytoplasmatická doména, která zprostředkovává signalizační kaskádu pomocí G-proteinů. Tyto G-proteiny fosforylací umožní vznik ATP z ADP. Dojde k syntéze takzvaných druhých posílů a k jejich aktivaci. Stejně tak můžou G-proteiny hydrolyzovat ATP za vzniku ADP a inaktivovat G-protein.

Mezi molekuly druhých poslů řadíme cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), diacylglycerol (DAG), a inositol-1,4,5-trifosfát (IP3). Úlohu druhých poslů je aktivace PK-A s následným zahájením procesu činnosti transkripčního faktoru CRE. CRE reguluje genovou expresi a buněčnou odpověď (3; 4; 7).

1.3.2 Inhibin A

Inhibin A je řazen do skupiny glykoproteinů transformující růstový faktor beta. Produkují ho folikuly, corpus luteum u žen a Sertoliho buňky u mužů. U těhotných žen je produkován i placentou. Podílí se na zpětnovazebné regulaci FSH a LH. Je součástí prenatalního testování, tzv.: triple testu, kde se za pomoci inhibinu A stanoví volný estriol, beta hCG a alfa-fetoprotein (6; 8).

1.3.3 Choriový gonadotropin

HCG je glykoproteinový hormon. HCG je produkován placentárním syncytiotrofoblastem. Vytváří se v prvním trimestru těhotenství, kdy se dostává do organismu plodu i matky. Podporuje syntézu dehydroepiandrosteronu i dehydroepiandrosteronsulfátu v kůře nadledvin plodu. U matky tlumí tvorbu folikulů a udržuje syntézu estradiolu a progesteronu ve žlutém tělísku do 6.týdne těhotenství, posléze je placenta v tvorbě estradiolu a progesteronu soběstačná. K potvrzení těhotenství se většinou stanovuje v moči 6.-8. den po oplození spolu se zvýšenou koncentrací estriolu a pregnandiolu v moči, estradiolu a progesteronu v séru (3; 6).

1.3.4 Antimüllerianský hormon

AMH (Antimüllerianský hormon) je glykoprotein, který se podílí na diferenciaci a regulaci růstu tkání. Vzniká glykosylací. Obsahuje bioaktivní N-konec a koncové C-domény. U mužů se tvoří v Sertoliho buňkách varlat a podporuje zrání Müllerových vývodů. AMH u žen je tvořen granulomatózními buňkami primárním folikulu. Při zahájení tvorby FSH klesá produkce AMH a dochází k regulaci počtu folikulů na dvou úrovních. Tou první je inhibice zrání folikulů a tou druhou je inhibice na FSH závislého cyklického výběru dominantního folikulu. Nejvyšší množství AMH je detekovatelné u pubertálních dětí. Nedetekujeme ho u žen při porodu a při menopauze. Hladina AMH klesá při užívání hormonální antikoncepce. AMH stanovujeme zejména při zjištění ovariální rezervy, poruchách pohlavního vývoje u dětí i k monitorování nádorů granulomatózních buněk. AMH je dále možné použít pro vyšetření syndromu polycystických ovaríí a k predikci času do menopauzy (14).

1.3.5 Hormony hypofýzy

LH a FSH jsou proteinové hormony adenohipofýzy, další významné ukazatele ovariální funkce. Jedná se o glandotropní hormony adenohipofýzy. Stimulátory vyvolávající syntézu adenohipofyzárních hormonů jsou gonadoliberiny (GnRH). GnRH a inhibitory hormonů ovlivňují koncentraci hormonů negativní zpětnou vazbou (5).

1.3.6 Regulace a hypotalamo-hipofyzární systém

Humorální signály z periferie jsou převáděny na nervové impulsy, které působí na hypotalamus. Z hypotalamu jsou produkovány GnRH do krve. Krví se dostanou do adenohipofýzy a ovlivňují sekreci adenohipofyzárních hormonů, LH a FSH do cirkulace krve. Adenohipofyzární hormony ovlivňují periferní tkáň a její produkci tkáňových hormonů. Regulace sekrece hormonů je negativní zpětnovazebnou cestou. Při nízkých koncentracích tkáňových hormonů v krvi se na podkladě senzorů spustí tvorba GnRH v hypotalamu. V případě zvýšených koncentrací v periferní krvi se v hypotalamu syntetizuje hormon s inhibičním účinkem (3; 4; 5).

1.3.7 Gonadoliberin

GnRH (Gonadoliberin) je dekaeptidový hormon, jenž je produkován pulzní sekrecí, na počátku puberty v intervalu každých 60-90 minut hypotalamem, a je závislý na menstruačním cyklu. Jeho produkce je řízena glutamátem, noradrenalinem a neuropeptidem z buněk CNS a je zahájena vazbou kisspeptinu na jeho receptor Kiss1R. Útlum GnRH je zprostředkováván přes gamaaminomáselnou kyselinu (GABA) a opioidy. Při jeho nedostatečné sekreci neproběhne ovulace. Reguluje pulzní vyplavování FSH i LH z adenohipofýzy (6; 8).

1.3.8 Luteinizační hormon

LH je glykoproteinový hormon adenohipofýzy, který patří mezi gonadotropiny spolu s FSH a prolaktinem, tvoří ho fukosa, galaktosa, manosa, glukosamin a galaktosamin. Jeho aktivita je nejvíce zjevná ve 14.-28. dnu menstruace, luteální/sekreční fáze. Podílí se na vývoji corpus luteum a endometria/dělohy, udržuje činnost žlutého tělíska, stimuluje syntézu estradiolu aktivací enzymů 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenázy, C17-C20-lyázy, reguluje syntézu progesteronu i menstruační cyklus (3; 4).

LH u mužů stimuluje syntézu testosteronu a vývoj Leydigových buněk varlat. Útlum syntézy LH reguluje testosteron a estradiol negativní zpětnou vazbou (6; 8).

1.3.9 Folikulostimulační hormon

Též jako LH se jedná o glykoproteinový hormon adenohipofýzy, který patří mezi gonadotropiny. Je tvořený galaktózou, manózou, fukózou, 2acetamido-2-deoxypyranózou a N-acetylneuraminovou kyselinou. Podporuje vývoj folikulu až do stádia zralosti. Působí v synergismu s LH na sekreci estrogenů, podporuje tvorbu aromatického kruhu. Nejvyšší produkce FSH je mezi 1.-14. dnem menstruačního cyklu, proliferační/folikulární fáze (3; 4).

U mužů ovlivňuje růst varlat a vývoj spermatogeneze působením na vznik proteinu vázajícího androgeny (ABP) v Sertoliho buňkách. Tlumení sekrece probíhá zpětnovazebně na základě koncentrace testosteronu, dihydrotestosteronu, inhibinu a naopak stimulaci podporuje aktivin. FSH též reguluje expresi receptorů pro LH na Leydigových buňkách (8).

1.4 Metody stanovení parametrů ovariálních funkcí

Parametry ovariální funkce, které stanovujeme laboratorními metodami v běžné praxi jsou androstendion, estradiol, progesteron, inhibin A, hCG, AMH, GnRH, LH, FSH, SHBG (15).

Parametry ovariálních funkcí je možné stanovit imunochemickými nebo separačními metodami. K rutinní analýze vzorků využíváme metody imunochemické, zejména radiometrické a enzymimunochemické. Separační metody se používají zejména při detekci složitějších analytů nebo jako referenční metoda mnoha analýz. Slouží k separaci analytů s následnou detekcí, nejčastěji hmotnostní spektrometrií (16).

1.4.1 Separační metody

Mezi nejčastěji používané separační metody patří metody chromatografické. Chromatografií se stanovují nejčastěji metabolity estradiolu, pregnanolon, hydroxyprogesteron a další. Principem separačních metod je vzájemné působení látek směsi se dvěma nemísitelnými fázemi, fáze mobilní a stacionární. Vzorek se pohybuje současně s mobilní fází. Jednotlivé látky interagují s fázemi odlišně. Čím více jsou látky přitahovány ke stacionární fázi, tím více jsou zadržovány v koloně a následně setrvávají v koloně déle než látky s nižší vazbou ke stacionární fázi. Retenční čas je pojem, který definuje délku času zadržování látky v koloně. Výsledkem chromatografických metod je chromatogram, graf závislosti odezvy detektoru a retenčního času. Koncentraci odvozujeme od plochy pod vytvořeným píkem v chromatogramu. Při analýze záleží na podmínkách, které byly při měření stanoveny. Chromatografie se dělí na základě mobilní fáze na plynovou a kapalinovou (15; 16).

Povaha stanovovaných látek určuje uspořádání chromatografie: reverzní, nebo normální. Při normálním uspořádání má stacionární fáze polární charakter a mobilní fáze nepolární charakter, stanovují se polárnější látky. V reverzním uspořádání má stacionární fáze nepolární charakter a mobilní fáze polární charakter, stanovují se látky málo polární a nepolární. V séru většinou analyzujeme látky méně polárního a nepolárního charakteru, nejvyužívanější separační metodou v praxi je chromatografie s reverzním uspořádáním (16).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je typ chromatografie s izokratickou a gradientovou elucí za vysokého tlaku, kdy dochází ke zvýšení eluční síly a zkvalitnění separace a detekce. Při izokratické eluci nedochází ke změně složení mobilní fáze, a naopak při gradientové k ní dochází. Gradientová eluce vede ještě k vyšší citlivosti metody. Zvýšení průtoku působí na zrychlení analýzy, ale zároveň i k jejímu zkvalitnění za použití náplně kolony s jemnějšími a stejnoměrnými částicemi. Detektory mohou být spektrofotometrické, fotodiodové, hmotnostní spektrometr, fluorimetrické i elektrochemické (16).

Plynová chromatografie (GC) využívá jako mobilní fázi inertní plyn, dusík, vodík nebo helium. Používá se ke stanovení plynných nebo těkavých látek. U GC je detektor hmotnostní spektrometr, teplotně vodivostní, plamenoionizační i elektronového záchytu (16).

Detektor s vysokou specifitou je hmotnostní spektrometr. Detekce iontů na základě jejich hmotnosti, náboje a intenzity výskytu daných iontů. Před detekcí se musí molekuly látky převést na ionty pomocí ionizačních technik, mezi které řadíme například samotné vakuum, elektrospreje i atmosférickou atomovou ionizaci (16).

Před měřením se provádí extrakce a derivatizace. Extrakcí izolujeme daný analyt v roztoku umožňující chromatografickou analýzu. Typy extrakce využívané v praxi jsou kapalina-kapalina extrakce, extrakce na pevnou fázi i precipitace proteinů (16).

Před samotným měřením musíme sérum derivatizovat, nahradit stávající funkční skupiny. Derivatizace vede ke zlepšení citlivosti, rozlišení metody a omezení vlivu interferujících látek. Může být předkolonová, na koloně a postkolonová. Mezi derivatizační činidla patří například sulfonylchloridy, 1,2-difenylethylendiamin či bromacetylpyren (16).

1.4.2 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založené na specifické reakci antigen (například: hormon, receptor) s protilátkou. Vzniklý značený komplex antigen–protilátka poskytuje měřitelný signál. Lze stanovit jak protilátku, tak i antigen, důležité je vytvoření imunokomplexu. Detekuje se zejména emise fotonů, pomocí které se určuje koncentrace antigenu v závislosti na změřené koncentraci kalibrátoru a jeho odezvy. Imunochemické metody mají vysokou citlivost, která souvisí s přirozenou reaktivitou protilátek a s jejich vlastnostmi vázat specificky antigen. Vznikne kovalentní silná vazba, takže komplex protilátky-antigen zůstane stabilní i během separačních procesů. Detekční limity dosahují hodnot 10^{-25} až 10^{-20} mol/l (16).

V imunochemické analýze jsou používány polyklonální a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou připraveny cílenou imunizací zvířat. Vzniknou protilátky namířené proti více typům antigenů s následnou tvorbou monospecifických a polyspecifických protilátek. Nejčastěji jsou používány monoklonální protilátky, které jsou specifičtější než polyklonální, jsou vyráběny z jednoho klonu plazmatických buněk z buněčných kultur a namířené přímo proti jednomu epitopu na antigenu (16).

1.4.3 Dělení imunochemických metod

1) dle přidání konjugátu na metody přímé a nepřímé. U přímé metody se konjugát váže na antigen ihned, je přítomen již navázaný na pevnou částici. U nepřímé metody se konjugát přidává až po vytvoření imunokomplexu.

2) dle počtu účastníků se antigenů na metody kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní metody využívají dva antigeny, které soutěží o vazebné místo na protilátce, jeden antigen je s neznámým množstvím stanovené látky ve vzorku, druhý antigen v nadbytku je značený (konjugát). Množství značeného komplexu je nepřímo úměrné množství stanoveného antigenu. Nekompetitivní metody pracují s jedním antigenem v neznámém množství stanovené látky ve vzorku, který se naváže na protilátku v nadbytku. Množství značeného komplexu je přímo úměrné množství stanoveného antigenu (16).

3) dle separace během analýzy se metody dělí na heterogenní a homogenní. Heterogenní analýza vyžaduje separaci volných a vázaných antigenů značených indikátory. Homogenní analýza nevyžaduje separaci značených volných a vázaných antigenů (16).

4) dle druhu značeného indikátoru: metody enzymové, kde je indikátorem například křenuvá peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Vzniká produkt enzymové reakce a jeho detekce. Metody radionuklidové, kde je indikátorem radionuklid například

^{125}I nebo ^{14}C . Detekuje se vzniklá radioaktivita. Metody chemiluminiscenční, kde indikátorem jsou chemické látky vyvolávající emisi fotonů, jako například luminol nebo akridinium ester. Metody volných radikálů, kde indikátorem jsou fluorofory například euripium kryptát. Detekuje se časově zesílená emise kryptátu (16).

Detekce může být: kolorimetrická, fluorometrická, luminometrická, nefelometrická a turbidimetrická (16).

1.4.4 Vliv věku na hormony ovariálních funkcí

K řádovým změnám hormonů ovariálních funkcí dochází během těhotenství v různých fázích trimestru a také ve stáří s nástupem menopauzy a během ovulačního cyklu. Výsledky také ovlivňuje životní styl, používání návykových látek, genetické predispozice, fyzická zátěž a tělesná aktivita. Patologické změny se odčítají z referenčních hodnot a celkové anamnézy pacienta. Podle způsobu, jakým se výsledek porovnává s rozmezím normálních hodnot určujeme referenční hodnoty, nebo rozhodovací hladinu („cut off level“). Rozhodovací hladina se používá při hodnocení hladin sérových koncentrací nádorových markerů. Referenční hodnoty pro hormony ovariálních funkcí jsou shrnuty v tabulce 1 (15).

Tabulka 1 Referenční rozmezí hodnot hormonů ovariálních funkcí.

Estradiol	věk	Ženy (mmol/l)
	<3. dnů	0,044-0,242
	31. dnů-10 let-	0,022-0,099
	ženy: folikulární fáze	0,0454-0,854
	ženy: ovulační fáze	0,151-1,461
	ženy: luteální fáze	0,0819-1,251
	ženy: po menopauze	0,0184-0,505
	ženy: 1. trimestr	0,563-11,902
	ženy: 2. trimestr	5,729-78,098
	ženy: 3. trimestr	31,287-110,100
Progesteron		
	0-10 let	0,0-1,59
	žny: folikulární fáze	0,181-2,840
	ženy: ovulační fáze	0,385-38,1
	ženy: luteální fáze	5,82-75,9
	ženy: po menopauze	0,3-2,5

LH		
	0-12 let	0,2-6,0
	ženy: folikulární fáze	2,4-12,6
	ženy: ovulační fáze	14,0-95,6
	ženy: luteální fáze	1,0-11,4
	ženy: po menopauze	7,7-58,5
FSH		
	0-12 let	1,2-7,8
	ženy: folikulární fáze	3,5-12,5
	ženy: ovulační fáze	4,7-21,5
	ženy: luteální fáze	1,7-7,7
	ženy: po meno pauze	25,8-134,8
AMH		
	ženy: 20-24	1,22-11,7
	ženy: 25-29	0,890-9,85
	ženy: 30-34	0,576-8,13
	ženy: 35-39	0,147-7,49
	ženy: 40-44	0,027-5,47
	ženy: 45-50	0,010-2,71
	ženy s PCOS	1,86-18,9
SHBG		
	Do 12 měsíců	44,1-149,3
	1 rok-13 let	45,5-130,8
	>14 let	43,0-95,0
Testosteron		
	dívky: do 9 let	0,01-0,60
	dívky: 9-10 let	0,30-1,30
	dívky: 10-14 let	0,50-1,90
	ženy: >16 let	0,60-2,70
Androstendion		
	<9 let	0,70-5,80
	9-15 let	0,10-9,10
	15-20 let	1,60-7,70
	>20 let	2,47-9,4
	ženy: po menopauze	0,77-7,82

2. Experimentální část

Pro porovnání imunochemických metod (ECLIA, CMIA, RIA, IRMA) pro stanovení vybraných hormonů bylo změřeno 5 patientských sér v dubletu dvakrát za den po dobu 21 dní. Séra pocházela od zdravých pacientek ve věkovém rozmezí 20 až 60 let. Odběr plné krve byl prováděn do zkumavek se separačním gelem v odběrovém boxu zdravotními sestrami. Po 15 minutách od odběru, byla plná krev stočena v centrifuze Allegra při 3500 otáčkách za minutu, po dobu 8 minut. Po separaci byla séra rozpipetována, vždy do dvou mikrozkušavek po 1000 μ l. Sérum bylo využito pro stanovení vybraných hormonů na přístrojích Cobas, Architect, Access 2. Doba stanovení u metody ECLIA a CMIA byla 20-30 minut, u metody RIA kolem 3 hodin, u metody IRMA kolem 90 minut. Výsledky byly vyhodnoceny v počítači analyzátoru.

2.1 Metody

2.1.1 Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA)

ECLIA je heterogenní imunochemická analýza, která může být kompetitivní i nekompetitivní. Při kompetitivní analýze vzniká imunokomplex biotinylované protilátky s neznačeným antigenem, nebo s antigenem značeným rutheniovým komplexem. Při nekompetitivní analýze je k imunokomplexu biotinylované protilátky a antigenu přidána protilátka proti tomu antigenu značená rutheniovým komplexem. Takto vytvořený imunokomplex se navázal na streptavidin na mikročásticích. Mikročástice byly magneticky přitahovány k elektrodě. Vlivem elektrického a magnetického pole došlo k emisi fotonů, které vyvolaly emisní záření. Záření bylo detekováno fotonásobičem a výsledek byl zanesen do počítače. Vyšetřovaný hormon a značený derivát hormonu mezi sebou soutěžily o místo na protilátce. Koncentrace vyšetřovaného hormonu byla nepřímo úměrná ke koncentraci značeného derivátu hormonu. Koncentraci analytu vyjadřovala závislost naměřené absorbance emitovaného záření na koncentraci hledaného analytu (17; 18; 19; 20).

Reakční schéma kompetitivní ECLIA ($\text{Ag} + \text{Ab} + \text{Ag}^{\text{Ru}} \rightarrow \text{Ag} - \text{Ab} + \text{Ag}^{\text{Ru}} - \text{Ab}$)

a/ vzorek 15 μ l + specifické biotinylované protilátky

b/ byl přidán značený derivát rutheniovým komplexem + mikročástice potažené streptavidinem, vznikly značené a neznačené komplexy spojené s mikročásticemi

c/ následovalo nasátí do měřící cely, mikročástice byly ukotveny pomocí magnetů na povrchu elektrody, nezreagované složky se odmyly

d/ na elektrodu bylo přidáno napětí a změřen signál, z kalibrační závislosti byly vypočítány koncentrace neznámých vzorků

e/ výsledky byly vyhodnoceny z kalibrační křivky, vytvořené z dvoubodové kalibrace za pomoci speciálního počítačového programu.

2.1.2 Chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza (CMIA)

Hormony byly rovněž stanoveny pomocí CMIA. Monoklonální protilátka byla na paramagnetických mikročasticích a antigen byl navázán na tuto protilátku společně s konjugátem, značený akridinem, vznikl komplex, ke kterému se přidal spouštěcí roztok (hydroxid sodný). Nastala emise fotonů, které byly detekovány luminometricky. Výsledná koncentrace analytu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky ze závislosti absorbance na koncentraci v počítačovém programu automaticky a byla přímo úměrná koncentraci značeného imunokomplexu (22; 23; 24; 25).

Reakční schéma CMIA ($Ag+Ab \rightarrow Ag-AB+Ab^{AKR} \rightarrow Ag-AB-Ab^{AKR}$)

a/ 200 μ l vzorku + monoklonální protilátka proti fluoresceinu na paramagnetických mikročasticích

b/ inkubace + promývání s přidáním konjugátu značeného akridinem

c/ spouštěcí roztok NaOH 0,35 M, měření

d/ výpočet koncentrace vzorků z kalibrační závislosti

2.1.3 Radioimunoanalýza (RIA)

Pro heterogenní kompetitivní RIA se využívají radionuklidy ^{125}I , ^{14}C , ^{57}Co a další. Radioaktivní reakcí vzniká gama záření využívané v rutinní laboratorní praxi. Výhodou gama záření je pronikavost, takže vzorek nevyžadoval zvláštní úpravu. Metoda je založena na principu vazby antigen–protilátka, kde o vazbu na protilátce soutěžil antigen značený radionuklidem s antigenem ze vzorku. Radioaktivita byla detekována pomocí scintilačního krystalu a převáděna na emisi fotonů, jenž byla detekována fotonásobičem. Značený antigen ^{125}I byl uchován v pufru s proteiny, azidem sodným a barvivem. Koncentrace antigenu ze vzorku byla nepřímě úměrná značenému antigenu. Výsledná koncentrace antigenu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky ze závislosti absorbance na koncentraci v počítačovém programu (16).

Reakční schéma ($Ag + Ab + Ag^{125}I \rightarrow Ag-Ab + Ag-Ag^{125}I$)

a/ zkumavky potažené specifickou protilátkou + 100 μ l vzorek + 500 μ l radioindikátoru

b/ inkubace 3 h při 18 až 25 °C za stálého třepání

c/ opatrné odsátí obsahu každé zkumavky a měření

2.1.4 Imunoradiometrická analýza (IRMA)

IRMA je nekompetitivní heterogenní sendvičová metoda. Principem byla sendvičová metoda. Monoklonální protilátka (myší) a monoklonální protilátka značená izotopem ^{125}I byly navázány na vyšetřovaný antigen, byly inkubovány 90 minut a promyty promývacím roztokem, aby byla odstraněna nadbytečná nenavázaná značená protilátka. Značená protilátka byla uchována v roztoku proteinu, azidu sodného a barviva. Radioaktivita byla pomocí scintilačních krystalů převedena na emisi fotonů, které byly detekovány fotonásobičem. Koncentrace antigenu byla přímo úměrná radioaktivitě a byla interpretována z kalibrační křivky kalibrátorů pomocí počítače (16).

Reakční schéma ($\text{Ag} + \text{Ab} + \text{Ag}^{125}\text{I} \rightarrow \text{Ag-Ab-Ag}^{125}\text{I}$)

a/ zkumavky potažené specifickou protilátkou + 100 μl vzorek + 50 μl radioindikátoru

b/ inkubace 90 min. při 18 až 25 °C za stálého třepání

c/ opatrné odsátí obsahu každé zkumavky a dvakrát promytí ve 2 ml promývacího roztoku

d/ po odsátí měření

2.2 Výsledky

V rámci bakalářské práce byla porovnávána přesnost a správnosti imunochemických metod při stanovení estrodiolu, progesteronu, LH a FSH v séru mezi analyzátory firem: Cobas (Roche diagnostics), Architect (Abbott laboratories) a Access 2 (Beckman Coulter). Opakovatelnost je opakované měření za stejného postupu, stejné obsluhy analyzátoru, stejných pracovních podmínek, na stejných analyzátoch a v krátkém časovém intervalu. Mezilehlá preciznost je opakování měření při zachování stejného postupu na stejném nebo podobném analyzátoru v delším časovém intervalu za odlišných podmínek (15).

Funkční parametry ECLIA estradiol

Měřicí rozsah analyzátorů definovaný mezemi detekce byl 18,4–11010 pmol/l. Mez stanovitelnosti byla 91,8 pmol/l. Opakovatelnost pro nízké hladiny estrodiolu byla 6,7 % při vyšších koncentracích 1,9 %, Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace byla 10,6 % a pro vyšší 3,0 %. Korelační koeficient při porovnání GC/MS byl 0,999. Některé interferenty, které způsobovaly křížovou reakci a mohly ovlivnit výsledek testu 6- α -hydroxy-estradiol, 4-hydroxy-estradiol, aj. vyvazovaly vazebná místa na protilátce a tím bránily navázání sledovaného analytu. Vliv interferentů se mohl projevit v preanalytické nebo v průběhu analytické fáze. Výrobci diagnostických přístrojů a reagensů byl udáván v příručkách zkříženou reakci v procentech a koncentracích. Výsledky stanovení hodnot (interferenci) mohly ovlivnit léky steroidní povahy. Výsledky nejsou ovlivněny hemolýzou, lipémií a ikterem (17; 18; 19; 20).

Funkční parametry ECLIA progesteron

Měřicí rozsah analyzátoru definovaný mezemi detekce byl 0,159–1,91 nmol/l. Mez stanovitelnosti byla 0,636 nmol/l. Opakovatelnost pro nízké hladiny progesteronu byla 20,7 % a pro vyšší hladiny 1,1 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 43,9 % a pro vyšší koncentrace 1,7 %. Korelační koeficient při srovnání s dostupným analytickým kitem byl 0,999. Interferenční látky byly kortikosteron, androstendion, alopregnanolon aj (17).

Funkční parametry ECLIA LH

Měřicí rozsah analyzátoru definovaný mezemi detekce byl 0,100–200 mIU/ml. Mez stanovitelnosti byla 0,636 nmol/l. Opakovatelnost pro nízké hladiny LH byla 1,2 % a pro vyšší hladiny 0,9 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 2,0 % a pro vyšší koncentrace 2,2 %. Korelační koeficient při srovnání s dostupným analytickým kitem byl 0,993. Interferenční látky byly FSH, TSH, hCG, aj. (19).

Funkční parametry ECLIA FSH

Měřicí rozsah analyzátoru byl definován mezemi detekce byl 0,100–200 mIU/ml. Mez stanovitelnosti byl 0,636 nmol/l. Opakovatelnost pro nízké hladiny FSH byla 2,6 % a pro vyšší hladiny 2 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 3,6 % a pro vyšší koncentrace 4,5 %. Korelační koeficient při srovnání s dostupným analytickým kytlem byl 0,998. Interferenční látky byly LH, TSH, hCG, aj. (21).

CMIA (Abbott) pro funkční parametry estradiolu

Opakovatelnost pro nízké hladiny estradiolu byla 6,2 % při vyšších koncentracích je 1,8 % Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace byla 7 % a pro vyšší 2,4 %. Korelační koeficient při porovnání GC/MS byl 0,99. Interferenty, které způsobily křížovou reakci a mohly ovlivnit výsledek testu estron, 17- β -estradiol-3-sulfát, 16- α -hydroxyestron, a další (22).

Metodika CMIA (Abbott) pro funkční parametry progesteronu

Opakovatelnost pro nízké hladiny progesteronu byla 4,8 % při vyšších koncentracích byla 1,9 %, Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace byla 4,7 % a pro vyšší 3,9 %. Korelační koeficient při porovnání s komerčně dostupným analytickým kytlem byl 0,99. Interferenty, které mohly způsobit křížovou reakci a mohly ovlivnit výsledek testu byly kortikosteron, 5-pregnan-3-ol-20-on, 17-hydroxyprogesteron, aj (23).

Metodika CMIA (Abbott) pro funkční parametry LH

Opakovatelnost pro nízké hladiny LH byla 2,1 % a pro vyšší hladiny 2,5 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 3,3 % a pro vyšší koncentrace 3,4 %. Křížové látky byly zanedbatelné (24).

Metodika CMIA (Abbott) pro funkční parametry FSH

Opakovatelnost pro nízké hladiny FSH byla 2,8 % a pro vyšší hladiny 3,3 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 3,6 % a pro vyšší koncentrace 4,1 %. Korelační koeficient při srovnání s dostupným analytickým kytlem byl 0,99. křížové reakce byly zanedbatelné (25).

Funkční parametry RIA (Beckman) estradiol

Měřicí rozsah analyzátoru definovaný mezemi detekce byl 38,22–15859 pmol/l. Variační koeficient opakovatelnosti byl menší nebo roven 10 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 15,72 %, vyšší koncentrace 10,66 % Křížová reakce byla

zanedbatelná. Opakovatelnost pro nízké hladiny estradiolu byla 9,11 %, pro vyšší hladiny 8,25 % (26).

Funkční parametry RIA (Beckman) progesteron

Měřicí rozsah analyzátoru definovaný mezemi detekce byl 0,0126–15,7 nmol/l. Variační koeficient opakovatelnosti byl menší nebo roven 9,48 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 16,85 %, vyšší koncentrace 13,70 % Křížová reakce byla zanedbatelná. Opakovatelnost pro nízké hladiny progesteronu byla 9,48 %, pro vyšší hladiny 8,12 % (27).

Funkční parametry IRMA (Beckman) LH

Měřicí rozsah analyzátoru byl definován mezemi detekce 0,16 IU/l–180 IU/l. Variační koeficient opakovatelnosti byl menší nebo roven 7,33 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 7,11 %, vyšší koncentrace 8,42 % Křížová reakce byla zanedbatelná. Opakovatelnost pro nízké hladiny LH byla 7,33 %, pro vyšší hladiny 2,58 % (28).

Funkční parametry IRMA (Beckman) FSH

Měřicí rozsah analyzátoru byl definován mezemi detekce 0,17 IU/l–180 IU/l. Variační koeficient opakovatelnosti byl menší nebo roven 4,05 %. Mezilehlá preciznost pro nízké koncentrace 8,20 %, vyšší koncentrace 2,06 % Křížová reakce byla zanedbatelná. Opakovatelnost pro nízké hladiny FSH byla 4,05 %, pro vyšší hladiny 1,12 % (21).

Dosažené výsledky stanovení vybraných hormonů pomocí různých metod jsou shrnuty v tabulkách 2-5.

Tabulka 2 Srovnání laboratorních metod pro stanovení estradiolu pro koncentraci 47 pg/ml.

Estradiol	Opakovatelnost (%)	Mezilehlá preciznost (%)	GC/MS, korelace*
ECLIA (ROCHE)	3,7	5,7	0,990
CMIA (Abbott)	5,4	6,6	0,990
RIA (Beckman)	9	15	0,990

Tabulka 3 Srovnání laboratorních metod pro stanovení progesteronu pro koncentraci 20 ng/ml.

Progesteron	Opakovatelnost (%)	Mezilehlá preciznost (%)	Komerčně dostupný analytický kit, korelace*
ECLIA (ROCHE)	1,1	1,7	0,999
CMIA (Abbott)	1,9	2,8	0,990
RIA (Beckman)	8	13	0,978

Tabulka 4 Srovnání laboratorních metod pro stanovení LH pro koncentraci 5mIU/ml.

LH	Opakovatelnost (%)	Mezilehlá preciznost (%)	Komerčně dostupný analytický kit, korelace*
ECLIA (ROCHE)	1,2	2,0	0,993
CMIA (Abbott)	2,6	3,6	neuveďeno
IRMA (Beckman)	4	6	0,970

Tabulka 5 Srovnání laboratorních metod pro stanovení FSH pro koncentraci 5 mIU/ml.

FSH	Opakovatelnost (%)	Mezilehlá preciznost (%)	Komerčně dostupný analytický kit, korelace*
ECLIA (ROCHE)	2,6	3,6	0,998
CMIA (Abbott)	3,3	4,0	0,990
IRMA (Beckman)	3	5	0,980

*Porovnání imunochemických metod s metodami separačními při stanovení estradiolu na základě korelačního koeficientu, který udává procentuální shodnost výsledku. Korelační koeficient ke sledovaným metodám se pohybuje v rozmezí od 0,95 až 1,05, přičemž koeficient 1 udává 100 % shodu.

3. Diskuse

V posledních letech enormně stoupá počet žen s ovariálními dysfunkcemi, jejichž příčina může být endokrinologická, imunologická nebo genetická porucha a také přibývá žen, které mají problémy s graviditou. Nejčastěji bývají stanoveny hladiny estradiolu, progesteronu, HL, FSH. Estradiol se stanovuje spolu s FSH a LH jako ukazatel zpětnovazebné reakce na koncentrace FSH.

Ovlivňujícími faktory stanovení koncentrací hormonů ovariálních funkcí u imunochemických metod jsou interferenční látky většinou steroidní povahy, problém může nastat také nevhodným výběrem kytů. Mezi další proměnné patří věk a pohlaví pacientů a zdravý životní styl. Nespornou výhodou imunochemických stanovení je jejich rychlost, minimální spotřeba biologického materiálu a množství stanovovaných vzorků.

Naproti tomu separační metody jsou náročnější na přípravu vzorku, jsou dražší a složitější na odečet výsledků. Jejich čas zpracování je delší, proto se používají především ve výzkumných projektech a jako referenční metody. Jsou také senzitivnější a preciznější v určování výsledku.

V experimentální části byla porovnávána opakovatelnost a mezilehlá preciznost imunochemických metod prováděná na analyzátoch od 3 různých výrobců. Parametry vzorků a kontrol se stanovují podle protokolu (EP5 – A2) CLSI.

Metody ECLIA a CMIA pracují na principu chemiluminiscence. ECLIA (Elektrochemiluminiscence immunoassai) využívá elektrického impulsu k chemiluminiscenční reakci za pomoci magnetických kuliček. CMIA (Chemiluminiscence microparticle immunoassai) vytváří imunokomplex na paramagnetických mikročásticích. RIA (Radioimunoanalýza) a IRMA (imunoradiometrická analýza) jsou analýzy, které jsou založené na principu radioaktivního záření, jenž se přeměňuje na detekovatelné fotony. Uvedené metody se řadí mezi heterogenní imunochemické metody, které splňují požadavek na nízký limit detekce, proto jsou vhodné pro stanovení malých koncentrací. Metoda RIA se jeví jako nejcitlivější ke stanovení hormonů. Z důvodů specifických interakcí, zde nejsou interference, které by ovlivňovaly výsledek. Mezilehlá preciznost je u radioimunoanalytických metod horší než u metod chemiluminiscenčních. Estradiol má široký měřicí rozsah ve srovnání s progesteronem, FSH a LH. Opakovatelnost u ECLII ve stanovení FSH a LH je kolem 2 %, což v porovnání s ostatními metodikami je nejlepší výsledek. Nejhorší výsledek u funkčního parametru opakovatelnosti, kolem 8 %, dosahuje metodika RIA při stanovení progesteronu a estradiolu. Výhodnost chemiluminiscenčních metod je v celkové době analýzy, která trvá kolem 30 min, nevýhodou jsou křížové reakce. Radioimunoanalytické metody vyžadují delší inkubační

dobu, proto analýza trvá déle, ovlivňují negativně životní prostředí a vyžadují speciální zacházení v laboratoři, také mají krátkou životnost kytu.

Analyzátoři dnešní doby jsou senzitivní, automatické, specifické, jenž zvládnou analyzovat několik set až tisíců vzorků denně. Hodnoty ovlivněné indiferenty jsou označovány jako falešně nízké nebo vysoké. Může nastat situace, kdy vysoká koncentrace stanovovaného antigenu zablokuje vazby na protilátky, a to se jeví jako negativní výsledek-Hookův efekt. Mezi indiferenty můžeme zařadit také autoprottilátky nebo heterofylní protilátky. Příkladem může být, Hama, heterofylní protilátka proti myším antigenům, její vliv se ruší přidáváním anti-heterofylních protilátek do analytu.

Jednotlivé imunochemické metody nelze jednoznačně porovnat, jelikož každá používá jiné složení reagentů. Vyhodnocení výsledků probíhá za kontroly lidského faktoru podle referenčních tabulek. Přesto jsou v praxi imunochemické metody oblíbené pro svoji jednoduchost a nenáročnost a jako široce dostupný způsob stanovení všech běžných parametrů v biochemické laboratoři.

4. Závěr

Bakalářská práce se zabývala hormony, které jsou markery funkce ovarií, a jejich stanovením v klinicko-biochemické laboratoři.

V teoretické části práce byly popsány jednotlivé hormony řídící funkci a představeny současné analytické možnosti vyšetřování jednotlivých hormonů.

V experimentální části byla porovnána přesnost a správnost imunochemických metod (ECLIA, CMIA, RIA, IRMA) při stanovení vybraných hormonů v séru pacientek.

Seznam použitých zkratk

LH	luteinizační hormon
FSH	folikulostimulační hormon
hCG	lidský choriogonadotropin
SHBG	globulin vázající sexuální hormony
GnRH	gonadoliberin
HSP	protein teplotního šoku
HRE	hormon responzivní element
CRE	cyklický adenosinfosfát regulující elementem
GBG	globulin vázající steroidní hormony
GPCR	receptor sprážený s G proteiny
PK-A	proteinkinasa A
StAR	steroidogenní akutní regulační protein
ACTH	adenokortikotropní hormon
GH	růstový hormon
ABP	protein vázající androgeny v Sertoliho buňkách
GABA	gamaaminomáselná kyselina
AMH	Antimülleriánský hormon
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DAG	diacylglycerol
IP3	inositol 1,4,5-trifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
ECLIA	elektrochemiluminiscenční metoda
CMIA	chemiluminiscenční mikročásticovou imunoanalýza
RIA	radioimunoanalýza
IRMA	imunoradiometrická analýza

Použitá literatura

1. M. Souček, a kol. Vnitřní lékařství. Praha : Grada Publishing, 2011. stránky 951–961. ISBN 978-80-247-7558-6.
2. J. Balko, Z. Tonar, I. Varga. Memorix histology. Praha : TRITON, 2018. stránky 384–400. ISBN 978-80-7553-577-1.
3. J. Koolman, R. Klaus-Heinrich. Barevný atlas biochemie. Praha : Grada Publishing, 2012. stránky 397–419, 422–425. ISBN 978-80-247-2977-0.
4. J. Hořejší, a spol. Základy klinické biochemie ve vnitřním lékařství. Praha : Avicenum, 1989. ISBN 08-049-89.
5. R. Rokyta, a kol. Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. Praha : Grada, 2015. stránky 333–384. ISBN 978-80-247-4867-2.
6. S. Silbernagl, A. Despopoulos. Atlas fyziologie člověka. [překl.] a kol. K. Jandová. Praha : Grada Publishing, 2018. stránky 280–326. ISBN 978-80-247-4271-7.
7. B. Matouš, a kol. Základy lékařské chemie a biochemie. Praha : Galén, 2010. stránky 181, 183–186. ISBN 978-80-7262-702-8.
8. S. Silbernagl, A. Despopoulos. Atlas fyziologie člověka. [překl.] E. Trávníčková. Praha : Avicenum, 1984. stránky 242–250. ISBN 08-026-84.
9. Badawy, M.T., a další. Androstenedione (a Natural Steroid and a Drug Supplement): A Comprehensive Review of Its Consumption, Metabolism, Health Effects, and Toxicity with Sex Differences. *Molecules*. 2021, 26.
10. Curtis, K. S. Estradiol and osmolality: behavioral responses and central pathways. *Physiol Behav*. 2015, 152(0).
11. Alemany, M. Estrogens and the regulation of glucose metabolism. *World Journal of W J D Diabetes*. 2021, 12(10).
12. Mani S, Oyola MG. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol* 2012 a 3:1–8.
13. S. Shiono, J. Williamson, J. Kapur, S. Joshi. Progesterone receptor activation regulates seizure susceptibility. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2019, 6(7).
14. Elycsys AMH pro COBAS. Mannheim : Roche Diagnostics, 2022. Metodický list.

15. A. Jabor, J. Franecková, Z. Kubíček, a kol. Principy interpretace laboratorních testů. Praha : Grada Publishing, 2020. stránky 121–146. ISBN 978-80-271-1272-2.
16. N.Cibiček. J.Vacek, a kol. Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. Olomouc : Univerzita palackého, 2014. stránky 52–71, 122–130. ISBN 978-80-244-3951-8.
17. Elecsys Estradiol III pro Cobas. Mannheim : Roche Diagnostics, 2022. Metodický list.
18. Elecsys Progesterone III pro Cobas. Mannheim : Roche Diagnostics, 2022. Metodický list.
19. Elecsys LH pro Cobas. Mannheim : Roche Diagnostics, 2022. Metodický list.
20. Elecsys FSH pro Cobas. Mannheim : Roche Diagnostics, 2022. Metodický list.
21. FSH pro Access. Nyon : Beckman Coulter, 2020. Metodický list.
22. Estradiol pro Architect system. Longford : Abbott, 2009. Metodický list.
23. Progesterone pro Architect system. Longford : Abbott, 2010. Metodický list.
24. LH pro Architect system. Longford : Abbott, 2007. Metodický list.
25. FSH pro Architect system. Longford : Abbott, 2009. Metodický list.
26. Estradiol pro Access. Nyon : Beckman Coulter, 2020. Metodický list.
27. Progesteron pro Access. Nyon : Beckman Coulter, 2020. Metodický list.
28. LH pro Access. Nyon : Beckman Coulter, 2020. Metodický list.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma steroidogeneze.	13
Obrázek 2 Strukturní vzorec estradiolu.....	15
Obrázek 3 Strukturní vzorec progesteronu.	16

Zdroje obrázků

Obrázek 1: Steroidogeneze. *Wikiskripta* [online]. Praha, 2010 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Synt%C3%A9za_steroidn%C3%BDch_horm%C3%B3nov#/media/Soubor:Steroidogenesis.svg

Obrázek 2: Estradiol. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022 - 05 - 05]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Estradiol#/media/Soubor:Estradiol.svg>

Obrázek 3: Progesteron. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022 – 05 - 05]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Progesteron#/media/Soubor:Progesteron.svg>

Seznam tabulek

Tabulka 1 Referenční rozmezí hodnot hormonů ovariálních funkcí	22
Tabulka 2 Srovnání laboratorních metod pro stanovení estradiolu pro koncentraci 47 pg/ml	29
Tabulka 3 Srovnání laboratorních metod pro stanovení progesteronu pro koncentraci 20 ng/ml	30
Tabulka 4 Srovnání laboratorních metod pro stanovení LH pro koncentraci 5mIU/ml ..	30
Tabulka 5 Srovnání laboratorních metod pro stanovení FSH pro koncentraci 5 mUI/ml	30