

# STUDIU DE PREEMȚIUNE ASUPRA DIMENSIONĂRII LOTURILOR STUDIATE PENTRU OBTINEREA UNOR REZULTATE SEMNIFICATIVE STATISTIC ÎN CAZUL URMĂRIII VARIĂȚIEI BILIRUBINEI ÎN TIMPUL STIMULĂRII OVARIENE PENTRU FECUNDAȚIA IN VITRO

V. Tica<sup>1</sup>, O. Teren<sup>2</sup>, A.A. Tica<sup>3</sup>, Irina Tica<sup>4</sup>, P. Mareș<sup>5</sup>,  
C. Gouzes<sup>6</sup>, P. Badea<sup>7</sup>, O. Unc<sup>8</sup>

## REZUMAT

Lucrarea prezentată urmărește determinarea numărului de măsurători necesare în vederea stabilirii unor rezultate semnificative statistic asupra existenței unor modificări ale bilirubinei totale și conjugate pe parcursul stimulării ovariene pentru Fertilizare In Vitro.

Pentru 23 cicluri de stimulare, realizate la paciente infertile între 25 - 47 ani, incluse într-un program de FIV care asociază agonisți de Gonadotropin Releasing Factor - hMG într-un protocol lung, în Clinica de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Universitar din Nîmes, Franța, au fost determinate bilirubina totală și bilirubina conjugată: în prima zi, în momentul începerii administrării hMG, în zilele 22, 24, în ziua premergătoare declanșării, în ziua prelevării ovocitare, la 15 zile după transfer și în luna următoare stimulării. Studiul statistic a fost realizat în Departamentele de Informatică Medicală din Constanța, Craiova și Montpellier, Franța (Digital Vax Computer, soft BMDP, SAS 6.0 și Student).

Valorile obținute calculează numărul de determinări din fiecare moment pentru evidențierea unei posibile diferențe semnificative la 37 - 51 pentru bilirubina totală (38 pentru o diferență de 5%) și 29 - 37 pentru bilirubina conjugată (25 pentru o diferență de 5%).

Supozițiile considerate în lucrare realizează o estimare corectă pentru dimensionarea unui eșantion ce va fi analizat la un moment ulterior.

**Cuvinte cheie:** fecundația in vitro, stimulare ovariană, efecte secundare, metabolism hepatic, bilirubina totală, bilirubina conjugată.

## Introducere

Unul dintre domeniile în care evoluția medicinei a fost spectaculoasă în ultimii ani este abordarea infertilității. "Revoluția" din această arie a fost posibilă datorită unor importante achiziții tehnice, precum și evoluției cunoștințelor despre mecanismele fundamentale ale reproducerii (10). Cele două componente au evoluat în paralel și au fost influențate

## ABSTRACT

### A preemption study on trial groups dimensions to obtain significant results in studying bilirubin variation during ovarian stimulation for "in vitro" fertilization

This work aims to determine the necessary number of determinations for obtaining significant statistical results concerning total and conjugated bilirubin variation during ovarian stimulation for in vitro fertilization.

For 23 stimulation cycles, in 25 - 47 years old infertile patients, included in a IVF program - GnRH agonists/hMG/hCG, long protocol - in OB/GYN Department, University Hospital, Nîmes, France, we determined total and conjugated bilirubin before beginning the protocol, the day of beginning of hMG, the days 22, 24, the day before triggering ovulation, the day of oocyte retrieval, 15 days after the embryo transfer and the next month. Statistics were performed in Medical Computing Departments in Constanța, Craiova and Montpellier, France (Digital Vax Computer, soft BMDP and SAS 6.0).

The values that we obtained calculate the number of necessary determinations for asserting a significant difference at 37 - 51 for total bilirubin (38 for a 5% difference) and 29 - 37 for conjugated bilirubin (25 for a 5% difference).

The suppositions considered in our study offer a correct estimation of the magnitude of the following research group.

**Key words:** in vitro fertilization, ovarian stimulation, side effects, hepatic metabolism, total bilirubin, conjugated bilirubin.

încă de la început de implicațiile sociale, etice, religioase. Fecundația in vitro (FIV), deși nu singura achiziție, a reprezentat și reprezintă în continuare una din cele mai importante dezvoltări în acest sens, atât din punct de vedere conceptual, cât și din acela al rezultatelor (4).

Ne aflăm astăzi în faza în care, trecută de euforia începutului, opinia publică și cea a corpului medical se îndreaptă către evaluarea rezultatelor, stabilirea efectelor

1 V. Tica - Medic Primar, Șef Lucrări Obstetrică-Ginecologie, Șef de Secție Facultatea de Medicină Constanța

2 O. Teren - Șef Lucrări Facultatea de Medicină Constanța, Disciplina Informatică Medicală

3 A.A. Tica - Șef Lucrări UMF Craiova, Disciplina Farmacologie, Medic Primar Obstetrică-Ginecologie

4 Irina Tica - Facultatea de Medicină Constanța

5 P. Mareș - Profesor, Șef Clinică Obstetrică-Ginecologie, Facultatea de Medicină Montpellier-Nîmes, Franța

6 C. Gouzes - Facultatea de Medicină Montpellier-Nîmes, Departamentul de Informatică Medicală, Franța

7 P. Badea - Șef Lucrări UMF Craiova, Disciplina de Informatică Medicală

8 O. Unc - Medic Primar Chirurg, Șef Lucrări Facultatea de Medicină Constanța

secundare, în vederea clarificării indicațiilor, a competențelor și a protocoalelor terapeutice (6).

Deși există premise teoretice ale interacțiunilor dintre steroizii sexuali feminini și funcția hepatică (1, 2, 3), nu există date clare în literatură în privința posibilei influențe a stimulării ovariene asupra activității acestui organ. Interogația are conotații pur științifice, de posibilitate de "demascare" a unor eventuale fenomene, relevate de exagerarea condițiilor de lucru - dar și un interes clinic, de investigație a unor posibile efecte secundare ale procedurii.

Este evident că asemenea aserțiuni trebuie să aibă suport statistic de validare (7).

Lucrarea urmărește determinarea numărului de măsurători necesare în vederea stabilirii unor rezultate semnificative statistic asupra existenței sau nu a unor modificări ale bilirubinei (totale și conjugate) între momentul inițial și diferite momente studiate, pe parcursul stimulării ovariene pentru FIV.

## Pacienți, material și metodă

Studiul se referă la 23 cicluri de stimulare realizate la paciente incluse într-un program de FIV în Clinica de Obstetrică și Ginecologie a Spitalului Universitar din Nîmes, Facultatea de Medicină Montpellier - Nîmes, Franța.

Pacientele erau în vârstă de 25 - 47 ani. Cauzele de hipofertilitate la aceste cupluri au fost: mecanice (14 cicluri), hipofertilitate masculină (6 cicluri) și cauze ovulatorii (3 cicluri). Pacientele nu au avut un regim alimentar particular, nu și l-au modificat pe cel preexistent în timpul stimulării și nu au consumat droguri și nici alcool.

Pacientele au fost incluse într-un program FIV care asociază agoniști de Gonadotropin Releasing Factor (a - GnRH) - hMG într-un protocol lung. S-a administrat începând cu prima zi (Z0) Busereline pentru blocarea ovulației. Din ziua a paisprezecea (Z14) s-a început administrarea hMG - pentru stimularea ovariană. Declanșarea a fost realizată cu hCG. Dacă titrul estrogenilor a păstrat o evoluție satisfăcătoare, pacientele au beneficiat după 36 ore de puncție foliculară transvaginală, sub control ecografic - pentru prelevare ovocitară. În toate cazurile, FIV a fost realizată în laboratorul FIV al Spitalului Universitar din Nîmes. La 48 h, embrionii rezultați au fost transferați în cavitatea uterină.

Prelevările sanguine au fost efectuate dimineața, pe nemâncate în Z0, Z14, Z22, Z24, în ziua premergătoare declanșării (ZD-1), în ziua prelevării ovocitare (ZP), la 15 zile după transfer (ZT+15) și în luna următoare stimulării (L2). Prelevările la L2 au fost realizate numai la paciente la care nu a fost obținută sarcina. Recoltarea probelor de sânge a fost făcută de aceeași persoană, pe tot parcursul studiului.

Investigațiile au cuprins bilirubina totală (BT) și bilirubina conjugată (BC). Toate probele au fost trimise și interpretate în laboratoarele de chimie ale Centrului Medico - Universitar din Nîmes.

Studiul statistic a fost realizat în Departamentele de Informatică Medicală din Constanța, Craiova și Montpellier (Digital Vax Computer, soft BMDP și SAS 6.0). Preluarea - introducerea datelor a fost realizată în EpiInfo versiunea 5.

Pentru prelucrarea și analiza datelor, numărul cazurilor a determinat folosirea în analiza datelor a unei distribuții "t" (Student).

Datele obținute în determinările pentru momentele Z0, Z14, Z19, Z24, ZD-1, ZP, ZT+15 și L2 au fost analizate în modul

următor:

- a. s-au calculat mediile aritmetice pentru fiecare set de valori:

$$x_{\text{mediu}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i ;$$

unde n = numărul de determinări, xi = valorile obținute;

- b. s-a calculat deviația standard (SD) și varianța (V) pentru fiecare set de date:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n (x_{\text{mediu}} - x_i)^2 \right)} ;$$

$$V = \frac{1}{n-1} (x_{\text{mediu}} - x_i)^2 ;$$

- c. au fost evaluate valorile parametrilor de distribuție: "t", P(t);

- d. datele au fost comparate cu datele tabelate.

Comparația s-a efectuat între mediile obținute pe loturile de valori determinate în fiecare moment în parte. Loturile au fost realizate din pacientele la care au fost efectuate determinări în momentul respectiv al perioadei de studiu.

Ca valoare martor am considerat valoarea medie din momentul Z0, pentru fiecare lot în parte și nu individual.

Pentru observarea unor diferențe între valoarea considerată martor și valorile obținute în diferite momente, am realizat un test "t" (Student), calculând parametrul "t":

$$t = \frac{x_{\text{mediu martor}} - x_{\text{mediu moment}}}{\sqrt{\left( \frac{S.D. \cdot \text{martor}}{n_{\text{martor}}} \right)^2 - \left( \frac{S.D. \cdot \text{moment}}{n_{\text{moment}}} \right)^2}}$$

Ipoteza nulă formulată (H0) este: nu există diferențe semnificative între loturile astfel constituite. Ipoteza alternativă (H1) este: datele nu sunt suficiente pentru a afirma că diferența nu este semnificativă.

Gradul de confidență a testului a fost stabilit la  $\alpha = 0,05$ .

Valoarea parametrului "t" a determinat probabilitatea P(t, n) ce a fost comparată cu valoarea distribuției de probabilitate tabelată a acestuia pentru un sistem având  $n_{\text{martor}} + n_{\text{moment}}$  grade de libertate pentru un grad de confidență de  $\alpha = 0,05$  (P(t < T) (13).

În partea a doua a lucrării am analizat situații în care, luând aceleași valori ale mediei și deviației standard, să găsim numărul de cazuri ce sunt necesare pentru obținerea unei diferențe semnificative (rejecția ipotezei nule H0). În acest scop am presupus:

1. numărul de indivizi din lotul martor este identic cu cel din lotul din momentul ulterior, dar indivizii pot să nu fie aceiași;
2. în primul caz, am considerat aceleași valori ale mediei și deviației standard ca și cele obținute pe cale experimentală;
3. în cazul secund, am considerat o diferență de 5% față de valoarea mediei din martor și aceeași deviație standard ca și a martorului;
4. coeficientul de confidență a fost de  $\alpha = 0,05$ .

În acest scop, am calculat valorile parametrilor "t" și P(t < T) pentru fiecare caz în parte, menținând  $n_{\text{martor}}$  constant.

**Rezultate**

Între  $Z_0$  și  $Z_p$ , la un număr suficient de mare de paciente (între 17 și 22) s-au putut realiza prelevările sanguine, pentru ambele fracțiuni cercetate. Lipsa datelor este explicată în unele cazuri de oprirea stimulării ovariene.

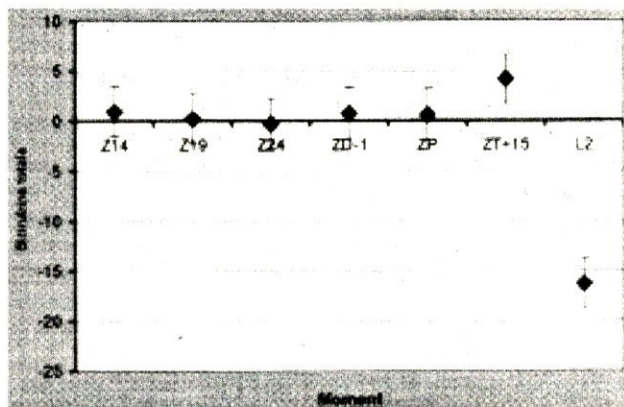
În ansamblu, după 20 prelevări ovocitare, 19 paciente au beneficiat de transfer embrionar (într-un caz nu s-au obținut embrioni). Cele cinci sarcini monofetale rezultate au avut o evoluție bună până la termen și s-au terminat cu nașterea a 5 copii sănătoși.

Evoluția diferențelor bilirubinemiei totale și conjugate față de momentul inițial este prezentată în figurile 1 și 2.

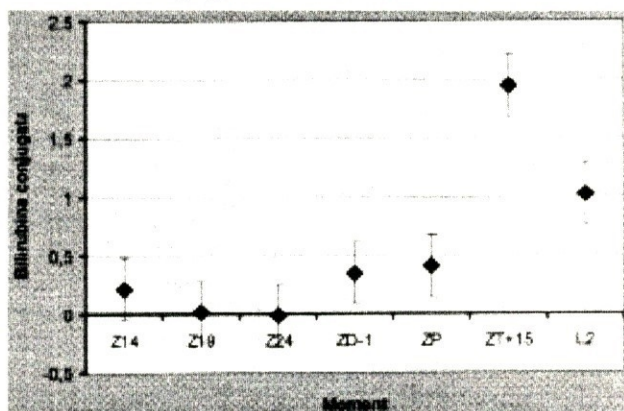
Scăderea valorilor bilirubinei, exprimată printr-o diferență predominant pozitivă, este de ordin mic; cifrele oscilează între Z14 și ZP în jurul liniei nule. O creștere mai importantă se observă la 15 zile după transfer, iar evoluția continuă să arate un paralelism între bilirubina totală și bilirubina conjugată. În acest moment se obțin și maximurile diferenței.

Evoluția la L2 este contradictorie: bilirubina totală a crescut (diferența negativă este considerabilă), iar bilirubina conjugată a avut o diferență în scădere, dar pozitivă.

Nu am putut respinge ipoteza nulă ( $H_0$ ). Valorile prevăzute pentru o aceeași diferență - semnificativă - sau pentru o diferență semnificativă de 5% din valoarea inițială sunt summarize în tabelul 1.



**Fig. 1 - Diferențele bilirubinei totale în dinamică față de martor ( $Z_0-Z_n$ ) pentru lotul și protocolul studiate**



**Fig. 2 - Diferențele bilirubinei conjugate în dinamică față de martor ( $Z_0-Z_n$ ) pentru lotul și protocolul studiate**

**Tabelul 1**

**Valorile diferențelor - actuale ( $Z_0 - Z_n$ ) și absolute (%), precum și nr. calculat de cicluri pt. obținerea unor diferențe semnificative (actuală și de 5%) pentru lotul și protocolul studiate.**

	<b>Moment</b>	<b>Z0</b>	<b>Z14</b>	<b>Z19</b>	<b>Z24</b>	<b>ZD-1</b>	<b>ZP</b>	<b>ZT+15</b>	<b>L2</b>
<b>Bili rub ina totală</b>	Nr. cazuri	20	22	21	19	17	18	6	3
	Medie	11	10,04	10,76	11,31	10,23	10,33	6,83	27,33
	SD	7,73	6,5	5,86	5,42	5,54	6,37	3,19	37,82
	Diferență		0,96	0,24	-0,31	0,77	0,67	4,17	-16,33
	Diferență absolută (%)		109,56	102,23	97,26	107,53	106,49	161,05	40,25
	Nr. cazuri pt. diferența actuală		46	40	37	41	48	49	51
	Nr. cazuri pt. diferența de 5%		38						
<b>Bili rub ina con jug ată</b>	Nr. cazuri	20	22	21	19	17	18	6	3
	Medie	5,35	5,04	5,33	5,36	5	4,94	3,5	4,33
	SD	3,66	2,68	2,56	2,09	2,52	2,8	1,38	2,31
	Diferență		0,21	0,02	-0,01	0,35	0,41	1,95	1,02
	Diferență absolută (%)		106,15	100,38	99,81	107	108,3	152,86	123,56
	Nr. cazuri pt. diferența actuală		29	30	31	33	34	28	37
	Nr. cazuri pt. diferența de 5%		25						

## Discuții

Caracteristicile lotului studiat, precum și ale protocolului de stimulare și FIV corespund, în mare, altor studii existente în literatură (4, 8) și pacienților infertile cărora li se propune o asemenea procedură (5).

Am selecționat momentele prelevărilor în funcție de modificările factorului presupus cauzator - estradiolul plasmatic - corespunzătoare dinamicii cantitative sau calitative a factorilor terapeutici (8). Momentul Z0 a fost ales ca valoare de referință. Înregistrarea din Z0 reprezintă valoarea de bază în condițiile protocolului, dar înaintea efectului substanțelor administrate. Z14 a fost aleasă pentru determinarea efectelor administrării agoniștilor GnRH singuri. Z19, Z24 și ZD-1 reprezintă momentele în care efectul terapeutic este, în special, reflexia adiției hMG. ZP investighează efectul declanșării ovulației cu hCG. ZT+15 și L2 urmăresc revenirea parametrilor investigați către valorile martor, la o distanță variabilă de întrerupere a tratamentului.

S-a urmărit omogenitatea și corectitudinea rezultatelor prin realizarea prelevărilor de către aceeași persoană, analiza biochimică în același laborator și utilizarea aceluiași tip de stimulare, cu aceleași proceduri. La corectitudinea rezultatelor a contribuit, credem noi, și faptul că pacientele au fost neselectate. Obținerea unui procent ridicat de investigații conform protocolului oferă o pertinentă relativ crescută studiilor statistice.

Este de remarcat, de asemenea, că valorile martor au fost în limitele fiziologice.

Pe de altă parte, în studiul statistic global, o atenție deosebită a fost acordată luării în considerație a tuturor informațiilor. Motivația acestei opțiuni a fost aceea de a nu influența, prin asocieri sau subgrupări, validitatea calculelor.

Faptul că pacientele nu au consumat droguri și nici alcool elimină una din variabilele posibile în acest studiu, cunoscute fiind efectele pe care aceste substanțe le pot avea asupra metabolismului hepatic (12).

Datorită unei evoluții mai evidente a fracțiunii conjugate decât a bilirubinei totale, necesarul de cicluri pentru obiectivarea unor diferențe semnificative este mai mică în primul caz.

Numărul necesar de cicluri pentru aprecierea unei diferențe semnificative de 5% pare a fi apropiat de cel luat în considerație în protocolul descris.

Considerând ipotezele simplificatoare enunțate anterior, utilizarea testului "t" (Student) pentru datele obținute în experimentul nostru este cel mai în măsură de a fi folosit și această aserțiune este conform datelor din literatură (9).

În analiza lotului studiat, varianța este mare față de valorile medii. Ca și în cazul studiului analizat, deoarece varianța (ca și deviația standard) nu scade liniar cu numărul de determinări, lucrările existente în analiza statistică a datelor experimentale medicale (9, 11) arată că este necesar un număr mai mare de determinări pentru a presupune o diferență semnificativă între valori medii.

## Concluzii

În general, valorile obținute relevă o variabilitate individuală considerabilă și calculează numărul de determinări din fiecare moment pentru evidențierea unei posibile diferențe semnificative la 37 - 51 pentru bilirubina totală (38 pentru o diferență de 5%) și 29 - 37 pentru bilirubina conjugată (15 pentru o diferență de 5%).

Supozițiile considerate în lucrare realizează o estimare corectă pentru dimensionarea unui eșantion ce va fi analizat la un moment ulterior.

## BIBLIOGRAFIE

1. Andersen C.Y., Westergaard L.G., Teisner B., Byskov A.G., Ziebe S., Helledie L., Petersen K., Westergaard J.G.: "Changes induced in serum protein profiles by ovarian stimulation during in vitro fertilization-embryo transfer treatment: a comparison between conception and nonconception cycles", Hum. Reprod. 1992; 7/5: 585-91
2. Balnave D., Farrell D.J., Wolfenden J.B., Cumming R.B.: "The effect of ovariectomy on liver metabolism and maintenance energy requirement of hens", Br. Poult. Sci. 1978 Sep; 19(5): 583-90
3. Basdevant A., Lignieres B., Simon P., Blanche E., Ponsin G., Guy-Grand B.: "Hepatic lipase activity during oral and parenteral 17-beta estradiol replacement therapy: high-density lipoprotein increase may not be anti-atherogenic", Fertility Sterility 1991; 55: 1112-7
4. Belaisch-Allart J., Dubuisson J.B., Papiernik E.: "Sterilités féminines - principales causes et leurs traitements", in Papiernik E., Rozembaum H., Belaisch-Allart J. Gynecologie. Medecine-Sciences Flammarion, Paris 1991; 355-61
5. Blanc B., Boubli L.: "Gynecologie", Edition Pradel, Paris, Edisem, Quebec 1989
6. Davis O.K.D., Rosenwaks: "Current status of in vitro fertilization and the new reproductive technologies", Current Opinion in Obstetrics and Gynecology 1992; 4(3): 354-8
7. Ducot B., Spira A.: "Notions pratiques d'épidémiologie, applications à la gynécologie", in Papiernik E., Rozembaum H., Belaisch-Allart J. Gynecologie, Medecine-Sciences Flammarion, Paris 1991; 223-237
8. Frydman R.: "Stimulation de l'ovulation en vue de fécondation in vitro", in Buvat J., Bringer J. Induction et stimulation de l'ovulation, Doin, Paris 1986; 233-243
9. Gaito J.: "Unequal intervals and unequal n in trend analyses", Psy. Bul. 1979; 72: 482-491
10. Hammond C.B.: "Reproductive endocrinology: editorial overview", Current Opinion in Obstetrics and Gynecology 1992; 4(3): 343-345
11. Loftus G.F., Loftus Elizabeth F.: "Essence of Statistics", Alfred A. Knopf Press, New York 1987
12. Zamfirescu-Gheorghiu M.: "Biochimia țesutului hepatic", în Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M., Editura Medicală, București 1980; 556-587
13. \*\*\*: "Geigy scientific tables", Ciba-Geigy Press 1995