

# Antygen specyficzny dla prostaty - PSA a obraz błony śluzowej macicy u kobiet ze zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych

Prostate specific antigen - PSA and histopathological findings of endometrium in women with fibrocystic breast disease

Radowski Stanisław, Kunicki Michał

Klinika Endokrynologii Ginekologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

## Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy była ocena związku pomiędzy stężeniem wolnego i całkowitego PSA a obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy u kobiet w wieku reprodukcyjnym ze zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych.

**Materiał i metody:** Do badania zakwalifikowano 176 kobiet ze zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych, w wieku od 18 do 45 lat. Wyróżniono 2 grupy:

- grupa I: - 114 kobiet z obecnością torbieli w gruczołach sutkowych <10mm,
- grupa II: - 62 z torbielami >10mm.

Grupę kontrolną stanowiło 46 kobiet w wieku od 18 do 45 lat, które regularnie miesiączkowały oraz nie miały patologii gruczołu sutkowego.

Oceny stężeń wolnego PSA (PSA-F) i całkowitego PSA (PSA-T) dokonano przy użyciu metody fluoroimmunometrycznej DELFIA (Prostatus PSA Free/Total Wallac, Turku, Finland). Poziom czułości metody wynosił 0,01ng/ml. Biopsję rysową wykonywano sondą Pipelle pomiędzy 22 a 24 dniem cyklu miesiączkowego.

**Wyniki:** W grupie kontrolnej znamienne częściej stwierdza się obraz histopatologiczny endometrium secretans, w porównaniu do grupy wszystkich kobiet ze zmianami mastopatycznymi ( $\chi^2=11,15$ ;  $p=0,01$ ). Natomiast w grupie wszystkich kobiet z mastopatią częściej stwierdza się obraz endometrium proliferationis ( $\chi^2=8,27$ ;  $p=0,004$ ) oraz praesecretionis ( $\chi^2=4,61$ ;  $p=0,03$ ), w stosunku do grupy kontrolnej.

Nie wykazano znamienych statystycznie różnic w średnich stężeniach obu frakcji PSA pomiędzy badanymi grupami, w zależności od stwierdzonego obrazu histopatologicznego błony śluzowej macicy ( $p>0,05$ ).

**Wnioski:** Nie stwierdzono zależności pomiędzy obrazami histopatologicznymi endometrium a stężeniem wolnej frakcji i całkowitym PSA oznaczanymi w fazie folikularnej cyklu miesiączkowego.

Określenie zależności pomiędzy stężeniem PSA a obrazem histopatologicznym endometrium wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: antygen specyficzny dla prostaty / *endometrium* / mastopatia /

## Adres do korespondencji:

Michał Kunicki  
Klinika Endokrynologii Ginekologicznej w Warszawie  
00-315 Warszawa, ul. Karowa 2,  
tel. (48) 22 5955452; e-mail: mkunicki@op.pl

Otrzymano: 05.06.2009  
Zaakceptowano do druku: 20.01.2010

## Abstract

**Objective:** The aim of the study was to evaluate the relationship between serum free and total PSA and histopathological findings in women with fibrocystic mastopathy.

**Material and methods:** 176 women with fibrocystic breast disease, aged 18 to 45 years.

- group I: comprised 114 patients with cysts <10mm in diameter

- group II: comprised 62 women with cysts >10mm in diameter

The control group consisted of 46 healthy women aged 18 - 45 years who had no breast pathology.

Total PSA (PSA-T) and free PSA (PSA-Free) were measured by an ultra-sensitive fluoroimmunoassay DELFIA assay (Prostatus PSA Free/Total Wallac, Turku, Finland). The detection limit for PSA was 0.01 ng/ml. Endometrial samples have been obtained with Pipelle probe between 22 and 24 days of the menstrual cycle.

**Results:** In the control group secretory endometrium was more frequently detected than in the mastopathy group ( $\chi^2=11,15, p=0.01$ ). Proliferatory ( $\chi^2=8.27, p=0.004$ ) and presecretory endometrium ( $\chi^2=4.61, p=0.03$ ) were more frequently detected in the mastopathy group than in controls.

We did not find statistically significant relationship between the mean PSA concentrations between the groups in relation to histopathological findings.

**Conclusions:** No relationships between free and total PSA measured in the follicular phase of the menstrual cycle and endometrial findings were detected in our study. Further research is required to evaluate the relationship between PSA and endometrial findings.

Key words: **prostate specific antigen / endometrium / mastopathy /**

## Wstęp

W latach dwudziestych XX wieku stwierdzono obecność (PSA) w tkankach i płynach ustrojowych innych niż prostata [1-9]. Wyniki nielicznych prac wykazały istnienie PSA w strukturach układu rozrodczego kobiety. Jego obecność została stwierdzona zarówno w ekstraktach uzyskanych ze złośliwych guzów nabłonkowych jajnika, jak i w cytozolu uzyskanym ze złośliwych guzów sutka [5, 10]. PSA wykryto także w bioptatach uzyskanych ze zdrowej tkanki gruczołu sutkowego jak i zmian mastopatycznych [10, 11].

Pojedyncze doniesienia wskazywały na obecność antygeny w błonie śluzowej macicy [12, 13]. Udowodniono, że obecność zmian mastopatycznych gruczołów sutkowych wpływa na obrazy histopatologiczne błony śluzowej macicy [14, 15].

Biorąc pod uwagę występowanie powyższego związku podjęto próbę oceny zależności, pomiędzy zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych, obrazami histopatologicznymi *endometrium* a antygenem specyficznym dla prostaty – PSA. Jak dotąd brak jest danych omawiających istnienie zależności pomiędzy obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy u kobiet ze zmianami mastopatycznymi a stężeniami PSA.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena związku pomiędzy stężeniem wolnego i całkowitego PSA a obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy u kobiet w wieku reprodukcyjnym, ze zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych.

## Materiał i metodyka

Do badania zakwalifikowano 176 kobiet ze zmianami mastopatycznymi gruczołów sutkowych, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii Ginekologicznej w Warszawie. Badanie zostało zaakceptowane przez Komisję Etyczną Akademii Medycznej w Warszawie. Pacjentki podpisały świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu i wykonanie biopsji rysowej *endometrium*.

## Kryteria włączenia obejmowały:

1. Wiek między 18 a 45 rokiem życia.
2. Obecność zmian mastopatycznych w gruczołach sutkowych stwierdzonych na podstawie badania klinicznego i ultrasonograficznego. W wybranych przypadkach wykonywano badanie mammograficzne.

## Kryteria wyłączenia obejmowały:

1. Podejrzanie w badaniu klinicznym i w badaniu mammograficznym raka gruczołu sutkowego.
2. Kliniczne i biochemiczne cechy hiperandrogenizmu [16]. Oceny klinicznej hirsutyizmu dokonano stosując skalę Ferrimana-Gallwaya. Wartość >7 punktów oznaczała kliniczny hirsutyizm. Stężenia całkowitego testosteronu powyżej >0,9ng/ml i androstendionu >2,5ng/ml przyjęto jako wykluczniki biochemicznego hiperandrogenizmu.
3. Obecność innych endokrynopatii (nadczynności i niedoczynności tarczycy, wrodzonego przerostu nadnerczy i zespołu Cushinga). W ocenie funkcji tarczycy stosowano normę laboratoryjną wynoszącą dla TSH (0,5-4,0 IU/L). W celu wykluczenia hiperkortyzolemii stosowano test z 1mg dexametazonu, przyjmując jako wartość graniczną 1,8ug/l. Celem wykluczenia wrodzonego przerostu nadnerczy stosowano oznaczenie 17-OH-P w fazie folikularnej cyklu (<3ng/ml).
4. Obecność w badaniu klinicznym i/lub obrazie ultrasonograficznym torbieli jajników, mięśniaków macicy oraz wkładki wewnątrzmacicznej.
5. Przyjmowanie preparatów hormonalnych 6 miesięcy przed włączeniem do badania.
6. Przebyte operacje na gruczole sutkowym.

Zgodnie z wynikami badań ultrasonograficznych, wykonanych aparatem Acuson (Aspen), sondą 7,5Mhz (jeden ultrasonografista MK), kobiety z rozpoznanymi zmianami mastopatycznymi podzielono na 2 podgrupy:

Antygen specyficzny dla prostaty - PSA a obraz błony śluzowej macicy ...

- grupa I – 114 kobiet z obecnością torbieli w gruczołach sutkowych <10mm,
- grupa II – 62 z torbielami >10mm.

Grupę kontrolną stanowiło 46 kobiet w wieku od 18 do 45 lat, które regularnie miesiączkowały oraz nie miały patologii gruczołu sutkowego.

Analizowano wiek badanych, wiek *menarche* oraz wskaźnik masy ciała (BMI). BMI wyliczono stosując wzór: masa ciała/(wzrost)<sup>2</sup>.

Krew do badania była pobierana pomiędzy 6 a 7 dniem cyklu miesiączkowego i godziną 7.00 a 8.00. Każdy pomiar dokonywany był 2-krotnie. Pobrane próbki przechowywane były w temperaturze (-20°C) do czasu, rozpoczęcia oznaczeń markera. Oceny stężeń PSA dokonano w surowicy krwi przy użyciu metody fluoroimmunometrycznej DELFIA (Prostatus PSA Free/Total Wallac, Turku, Finland). Poziom czułości metody wynosił 0,01ng/ml.

Biopsję rysową wykonywano sondą Pipelle pomiędzy 22 a 24 dniem cyklu miesiączkowego. Pobrane próbki były analizowane przez dwóch histopatologów. Ocena histopatologiczna była dokonana na podstawie klasyfikacji WHO.

W celu określenia zależności pomiędzy stężeniami całkowitego PSA-T i wolnej frakcji antygeny PSA-F, a obrazami histopatologicznymi *endometrium* zastosowano test chi<sup>2</sup>. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu pakietu statystycznego SPSS 7.0. Poziom istotności wynosił p<0,05.

## Wyniki

Biopsję rysową *endometrium* wykonano u 160 kobiet ze zmianami mastopatycznymi oraz u 37 kobiet z grupy kontrolnej. W pozostałych 25 przypadkach biopsji nie wykonano ze względu na brak zgody pacjentek.

Na podstawie analizy statystycznej wykazano, że w grupie kontrolnej znamienne częściej stwierdza się obraz histopatologiczny *endometrium secretans*, w odniesieniu do grupy wszystkich kobiet ze zmianami mastopatycznymi (chi<sup>2</sup>=11,15; p=0,01). Natomiast w grupie wszystkich kobiet z mastopatią częściej stwierdza się obraz *endometrium proliferacionis* (chi<sup>2</sup>=8,27; p=0,004) oraz *praesecretionis* (chi<sup>2</sup>=4,61; p=0,03) w stosunku do grupy kontrolnej.

Porównując grupę chorych ze zmianami rozlanymi z grupą kontrolną stwierdzono, że rozpoznanie *endometrium secretans*, częściej występuje w grupie kontrolnej a *endometrium proliferacionis* w grupie ze zmianami rozlanymi (chi<sup>2</sup>=4,32;

p=0,05). Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości obrazów *endometrium praesecretionis* pomiędzy tymi grupami (chi<sup>2</sup>=4,11; p=0,07).

Porównując grupę kontrolną z grupą ze zmianami ograniczonymi, nie stwierdzono znamienych różnic w częstości występowania poszczególnych obrazów histopatologicznych błony śluzowej macicy w obu tych grupach (chi<sup>2</sup>=4,57; p=0,10).

W tabeli I przedstawiono średnie stężenia wolnej frakcji antygeny PSA-F i całkowitego PSA-T w grupach kobiet ze zmianami mastopatycznymi w zależności od stwierdzonego obrazu histopatologicznego *endometrium*. Nie wykazano znamienych różnic w średnich stężeniach obu frakcji PSA między badanymi grupami (p>0,05). Przerost prosty *endometrium* stwierdzono u 4 kobiet ze zmianami rozlanymi (grupa I). Stężenia obu frakcji PSA dla tego obrazu histopatologicznego znajdowały się poniżej progu czułości metody.

## Dyskusja

PSA jest serynową proteazą o masie cząsteczkowej około 30kD mającą aktywność enzymatyczną podobną do chymotrypsyny [17-19]. Gen kodujący antygen należy do rodziny ludzkich genów kalikreiny, które oprócz genu kodującego PSA zawierają jeszcze 2 geny: trzustkowo/nerkowy kalikreiny (h KLK1) oraz gruczołowy kalikreiny (HKLK2). Gen kodujący PSA nazywany jest również ludzką kalikreina 3 (HKLK3) [20]. Główną rolą PSA, który występuje w dużych ilościach w płynie nasiennym (1-2g/l) jest dokonywanie proteolitycznego rozszczepiania inhibitora ruchliwości nasienia – semenogelinu I i II. W rezultacie antygen powoduje upłynnienie nasienia po ejakulacji [21].

PSA pobudza syntezę szeregu czynników wzrostu, między innymi insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 IGF-1. Proces ten ma duże znaczenie u osób z wysokim ryzykiem rozwoju raka prostaty i sutka, ponieważ IGF-1 jest silnym czynnikiem powodującym promocję rozwoju tych nowotworów [22].

Przeprowadzone dotychczas badania pozwoliły na określenie roli jaką może pełnić gen KLK1 w *endometrium*. Wykazano, że produkt genu – kalikreina wraz z bradykininą stanowią układ, który nasila syntezę inozytolu i syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego-DNA w błonie śluzowej macicy. Ponadto udowodniono, że związki te mogą nasilać syntezę prostaglandyn w kosmówce, w owodni oraz regulować transport jonów poprzez błonę komórkową komórek *endometrium* [23-26].

Postuluje się, że układ kalikreina/bradykinina może wpływać na proliferację błony śluzowej podczas cyklu miesiączkowego,

**Tabela I.** Stężenia wolnej frakcji PSA-F i całkowitego PSA-T u kobiet w zależności od obrazu histopatologicznego błony śluzowej macicy.

	Stężenie PSA-T (ng/ml) x ± SD			Stężenie PSA-F (ng/ml) x ± SD		
	<i>Endometrium secretionis</i>	<i>Endometrium praesecretionis</i>	<i>Endometrium proliferacionis</i>	<i>Endometrium secretionis</i>	<i>Endometrium praesecretionis</i>	<i>Endometrium proliferacionis</i>
Grupa I	0,47 ± 1,81	0,62 ± 1,30	0,70 ± 1,89	0,13 ± 0,51	0,19 ± 0,44	0,23 ± 0,57
Grupa II	0,73 ± 1,83	0,34 ± 1,12	1,03 ± 3,64	0,22 ± 0,66	0,11 ± 0,03	0,28 ± 1,05
Grupa kontrolna	0,04 ± 0,08*	0,10 ± 0,14*	0,69 ± 1,61*	0,01 ± 0,49*	0,02 ± 0,07*	0,25 ± 0,60*

x ±SD - średnia i odchylenie standardowe

\* - różnica nieznamienista statystycznie (GRK vs GRI vs GRII)

odgrywać rolę w implantacji zarodka oraz regulować przepływ krwi w *endometrium* [23-26]. Jak dotąd nie jest znana rola jaką może pełnić PSA - produkt genu kalikreiny 3.

Przeprowadzona w naszym materiale analiza wykazała, że w grupie kontrolnej nie istnieje statystycznie znamienne zależności pomiędzy stężeniem całkowitego PSA-T i jego wolnej frakcji PSA-F a poszczególnymi obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy. Nie wykazano istnienia powyższej zależności również w odniesieniu do kobiet ze zmianami mastopatycznymi i to w stosunku do całej grupy badanej jak też w stosunku do ocenianych podgrup. Uzyskane wyniki nie mogą być akceptowane w całości, bowiem w naszym badaniu oznaczaliśmy stężenie obu frakcji PSA jedynie w fazie folikularnej cyklu miesiączkowego. Ocena stężeń w tej fazie cyklu miesiączkowego podyktowana była tym, że stężenia PSA osiągają najwyższe wartości w fazie folikularnej a najniższe w lutealnej, co biorąc pod uwagę ekstremalnie niskie stężenia antygeny przy zastosowaniu tej metody pomiaru pozwalało na uzyskanie mierzalnych stężeń antygeny [27].

Zmiany stężeń hormonów w fazie folikularnej cyklu, determinują obrazy histopatologiczne występujące w fazie lutealnej cyklu. Biopsja rysowa *endometrium* była wykonywana w fazie lutealnej. Powyższe czynniki zadecydowały o oznaczeniu obu frakcji antygenów w fazie folikularnej. Wydaje się, że do całościowego określenia zależności konieczne jest oznaczanie antygeny również w fazie lutealnej cyklu miesiączkowego, kiedy białko to osiąga inne stężenia niż w fazie folikularnej cyklu. Biorąc pod uwagę fakt, że powyższa analiza jest pierwszą w dostępnej literaturze fachowej, możemy stwierdzić, że podczas oznaczania antygeny w fazie folikularnej cyklu miesiączkowego nie istnieją zależności pomiędzy stężeniem całkowitego PSA-T i jego wolną frakcją PSA-F oznaczanymi w fazie folikularnej cyklu miesiączkowego a obrazem histopatologicznym błony śluzowej macicy. Jednakże brak badań odnoszących się do tego zagadnienia nie pozwala w sposób jednoznaczny wykazać wyraźnych zależności pomiędzy obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy a nasileniem syntezy obu frakcji PSA u kobiet ze zmianami mastopatycznymi.

Nieliczne prace wykazały, że u kobiet z mastopatią częściej występują w błonie śluzowej macicy obrazy histopatologiczne odpowiadające fazie proliferacji i hiperplazji [14, 15].

Wyniki naszej pracy wskazują, że w całej grupie kobiet ze zmianami mastopatycznymi częściej występują obrazy histopatologiczne określane jako *endometrium proliferacionis* i *prasecretionis* w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w odniesieniu do poszczególnych rodzajów zmian mastopatycznych wykazaliśmy, że zmiany o typie *endometrium proliferacionis* częściej występują w grupie kobiet ze zmianami rozlanymi gruczołów sutkowych, niż w grupie kobiet ze zmianami ograniczonymi. Powyższe dane są zgodne z wynikami innych autorów [14, 15]. Wyjaśnienie roli jaką odgrywa PSA w błonie śluzowej macicy wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

## Wnioski

1. Nie stwierdzono zależności pomiędzy obrazami histopatologicznymi *endometrium* w fazie lutealnej cyklu a stężeniem wolnej frakcji (PSA-F) i całkowitym PSA (PSA-T) oznaczanym w fazie folikularnej cyklu miesiączkowego.

2. Określenie związków pomiędzy PSA a obrazami histopatologicznymi błony śluzowej macicy wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

## Piśmiennictwo

1. Mannello F, Miragoli G, Bianchi G, [et.al.]. Immunoreactive prostate - specific antigen in pleural effusions. *Clin Chem*. 1997, 43, 847-848.
2. Mannello F, Miragoli G, Bianchi G, [et.al.]. Prostate - specific antigen in ascitic fluid. *Clin Chem*. 1997, 43, 1461-1462.
3. Melegos D, Freedman M, Diamandis E. Prostate specific antigen in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*. 1997, 43, 855.
4. Melegos D, Yu H, Allen L, [et.al.]. Prostate - specific antigen in amniotic fluid of normal and abnormal pregnancies. *Clin Biochem*. 1996, 29, 555-562.
5. Tremblay R, Deperthes D, Mailloux J, [et.al.]. Kallikreins expression in a mature cystic ovarian teratoma. *J Clin Lab Anal*. 1996, 10, 229-231.
6. Bodey B, Bodey B Jr, Kaiser H. Immunocytochemical detection of prostate specific antigen expression in human primary and metastatic melanomas. *Anticancer Res*. 1997, 17, 2343-2346.
7. Zarghami N, Levesque M, D'Costa M, [et.al.]. Frequency of expression of prostate - specific antigen mRNA in lung tumors. *Am J Clin Pathol*. 1997, 108, 184-190.
8. van Krieken J. Prostate marker immunoreactivity in salivary gland neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 1993, 17, 410-414.
9. Yamamoto M, Hibi H, Miyake H. Raised prostate - specific antigen in adenocarcinoma of the colon. *Int Urol Nephrol*. 1997, 29, 221-225.
10. Yu H, Diamandis E, Levesque M, [et.al.]. Prostate specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 1996, 40, 171-178.
11. Diamandis E, Yu H, Sutherland D. Detection of prostate specific antigen immunoreactivity in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1994, 32, 301-330.
12. Clements J, Mukhtar A. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994, 78, 1536-1539.
13. Seliger E, Kaltwasser P, Ropke F. Determination of prostate-specific antigen (PSA) in cytosol of breast tumors and human endometrium - new diagnostic approaches. *Zentralbl Gynecol*. 1998, 120, 172-175.
14. Fiorica J. Fibrocystic changes. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1994, 21, 445-452.
15. Bradley A, Sharp K. Breast disease. *Med Clin North Am*. 1995, 79, 1443-1455.
16. Ferriman D, Gallwey J. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961, 21, 1440-1447.
17. Duffy M. PSA as a marker for prostatic cancer: a critical review. *Ann Clin Biochem*. 1996, 33, 511-519.
18. Lijja H. Prostate specific antigen: molecular forms and the human kallikrein gene family. *Br J Urol*. 1997, 79, Suppl 1, 44-48.
19. McCormack R, Rittenhouse H, Finlay J, [et.al.]. Molecular forms of prostate - specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology*. 1995, 45, 729-744.
20. Kumar A, Goel A, Hill T, [et.al.]. Expression of human glandular kallikrein, hK2, in mammalian cells. *Cancer Res*. 1996, 56, 5397-5402.
21. Cohen P, Graves H, Peehl D, [et.al.]. Prostate specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992, 75, 1046-1053.
22. Stenman U, Leinonen J, Alfthan H, [et.al.]. A complex between prostate - specific antigen and alpha 1 - antychymotrypsin is the major form of prostate - specific antigen in serum of patients with prostate cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res*. 1991, 51, 222-226.
23. Endo T, Fukue H, Kanaya M, [et.al.]. Bombesin and bradykinin increase inositol phosphates and cytosolic free Ca<sup>2+</sup>, and stimulate DNA synthesis in human endometrial stromal cells. *J Endocrinol*. 1991, 131, 313-318.
24. Schrey M, Monaghan H, Holt J. Interaction of paracrine factors during labour: interleukin-1beta causes amplification of decidua cell prostaglandin F<sub>2</sub> alpha production in response to bradykinin and epidermal growth factor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992, 45, 137-142.
25. Schrey M, Holt J, Cornford P, [et.al.]. Human decidua is a target tissue bradykinin and kallikrein: Phosphoinositide hydrolysis accompanies arachidonic acid release in uterine decidua cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992, 74, 426-435.
26. Matthews C, McEwan G, Redfern C, [et.al.]. Bradykinin stimulation of electrogenic ion transport in epithelial layers of cultured human endometrium. *Pluggers Arch*. 1993, 422, 401-403.
27. Zarghami N, Grass L, Sauter E, [et.al.]. Prostate specific antigen levels during menstrual cycle. *Clin Chem*. 1997, 43, 1862-1867.