

Povezanost dobi i koncentracije AMH

Brkić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:236946>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivona Brkić

Povezanost dobi i koncentracije AMH

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr.sc. Saše Kralik Oguić.

Zahvaljujem se, prije svega, svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dunji Rogić i suvoditeljici dr. sc. Saši Kralik Oguić na savjetima i pruženoj pomoći pri izradi ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na brizi, razumijevanju i potpori koju su mi pružili tijekom studiranja. Također se želim zahvaliti baki i djedu koji su olakšali moje obrazovanje te cijeloj svojoj obitelji. Velika zahvala ide mojem dečku Domagoju koji me hrabrio i tješio u najtežim trenucima i time mi olakšao cijelo studiranje, posebno u vrijeme ispitnih rokova.

Popis kratica:

AFC = *engl. antral follicle count*

AMH = *anti – Müllerov hormon*

ASK = *askorbinska kiselina*

ECLIA = *engl. electrochemiluminiscence immunoassay = imunokemijska metoda elektrokemiluminiscencije*

FSH = *folikularni stimulirajući hormon*

IVF = *in vitro fertilizacija*

p = *granica statističke značajnosti*

PCOS = *engl. polycystic ovary syndrome = sindrom policističnih jajnika*

r = *koeficijent korelacije*

Ru = *rutenij*

TPA = *tripropilamin*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 ANTI-MULLEROV HORMON (AMH)	1
1.1.1 ULOGA AMH U SPOLNOJ DIFERENCIJACIJI	2
1.1.2 ULOGA AMH U FIZIOLOGIJI JAJNIKA.....	3
1.1.3 AMH KAO BILJEG FUNKCIJE JAJNIKA	5
1.1.4 ULOGA ODREĐIVANJA AMH U POSTUPCIMA MEDICINSKI POTPOMOŽNUTE OPLODNJE ...	7
1.1.5 AMH KOD ŽENA SA PCOS (SINDROM POLICISTIČNIH JAJNIKA)	8
1.1.6 METODE ODREĐIVANJA AMH I REFERENTNE VRIJEDNOSTI	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1 MATERIJALI	10
3.1.1 UZORCI.....	11
3.1.2 MJERNI UREĐAJ	11
3.2 METODA	11
3.2.1 PRIMJENA METODE	13
3.2.2 PREDNOSTI METODE	14
3.2.3 INTERFERENCIJE.....	14
3.2.4 MJERNO PODRUČJE ZA AMH.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1 STATISTIKA.....	19
4.2 RASPRAVA.....	23
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA.....	26
7. SAŽETAK.....	28
8. SUMMARY	29

1. UVOD

1.1 ANTI-MÜLLEROV HORMON (AMH)

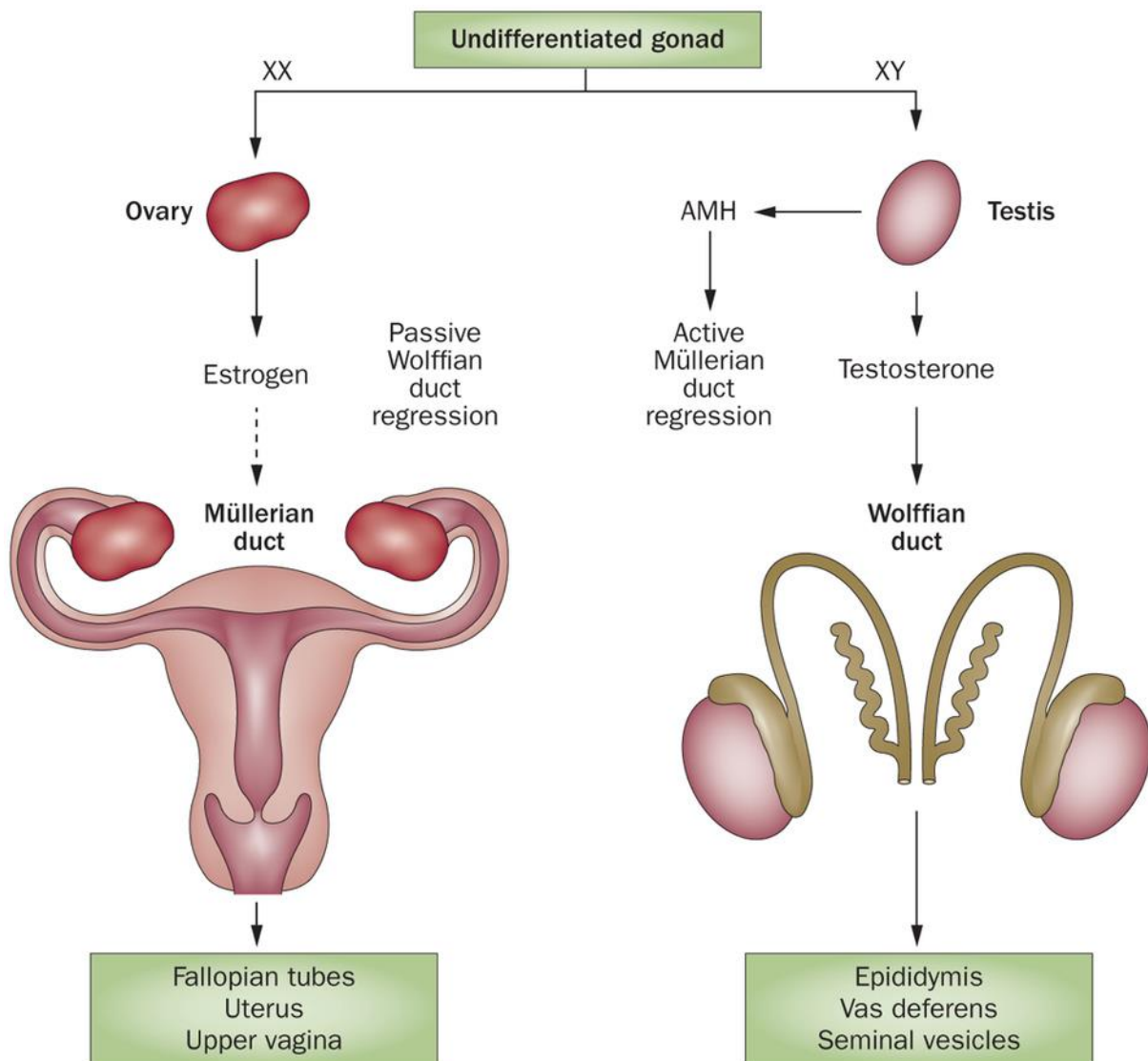
AMH se prvi put spominje 1947. godine kada je uočena prisutnost supstance koja se sintetizira u testisima i odgovorna je za regresiju Müllerovih kanala kod muškog fetusa. Nazvana je Müllerova inhibirajuća supstanca, a danas je poznata kao AMH. Četrdesetak godina kasnije izoliran je gen za AMH. (La Marca i Volpe, 2007)

AMH je homodimerni glikoprotein molekularne mase 140 kDa i član je superobitelji beta-transformirajućih faktora rasta β (TGF- β). Dvije identične podjedinice povezane su disulfidnom vezom. AMH je izrazito prisutan u Sertolijevim stanicama tijekom razvoja testisa od petog tjedna embrionalnog razvoja do puberteta te je prisutan u manjoj koncentraciji kroz cijeli život muškarca. Kod žena, granulozne stanice sintetiziraju AMH u manjim koncentracijama u odnosu na muškarce i to od 36. tjedna trudnoće do menopauze. Molekularni mehanizam uključuje djelovanje AMH preko vlastitog specifičnog receptora tipa 2, AMHR2. Vežanje na izvanstaničnu domenu transmembranskog AMHR2 uzrokuje fosforilaciju i aktivaciju AMH receptora tipa I (AMHR1) koji djeluje unutarstanično kao treonin kinaza te dalje dovodi do fosforilacije nizvodnih Smad proteina i konačnog biološkog odgovora. (La Marca i Volpe, 2007)

Gen koji kodira AMH nalazi se na kromosomu 19, a gen koji kodira njegov receptor tip II nalazi se na kromosomu 12. Njihove mutacije, kao što su one koje utječu na vežanje AMH, transdukciju signala i intracelularni transport, opisane su ubrzo nakon definiranja gena za AMH i AMHR2. (La Marca i Volpe, 2007)

1.1.1 ULOGA AMH U SPOLNOJ DIFERENCIJACIJI

AMH je pretežito bio poznat po svojoj ulozi u razvoju spolnih organa muškaraca. S vremenom je otkriveno da AMH ima vrlo važnu ulogu u spolnoj diferencijaciji. Kod muškaraca je prisutan od 5. tjedna embrionalnog razvoja gdje je odgovoran za regresiju Müllerovih kanala te se u njegovoj daljnjoj prisutnosti razvijaju muški spolni organi. Kod žena je, za razliku od muškaraca, prisutan tek od rođenja. Zbog njegove odsutnosti tijekom trudnoće razvijaju se ženski spolni organi (slika 1). (La Marca i sur., 2009)



Slika 1. Uloga AMH u spolnoj diferencijaciji (Slika preuzeta sa www.nature.com)

1.1.2 ULOGA AMH U FIZIOLOGIJI JAJNIKA

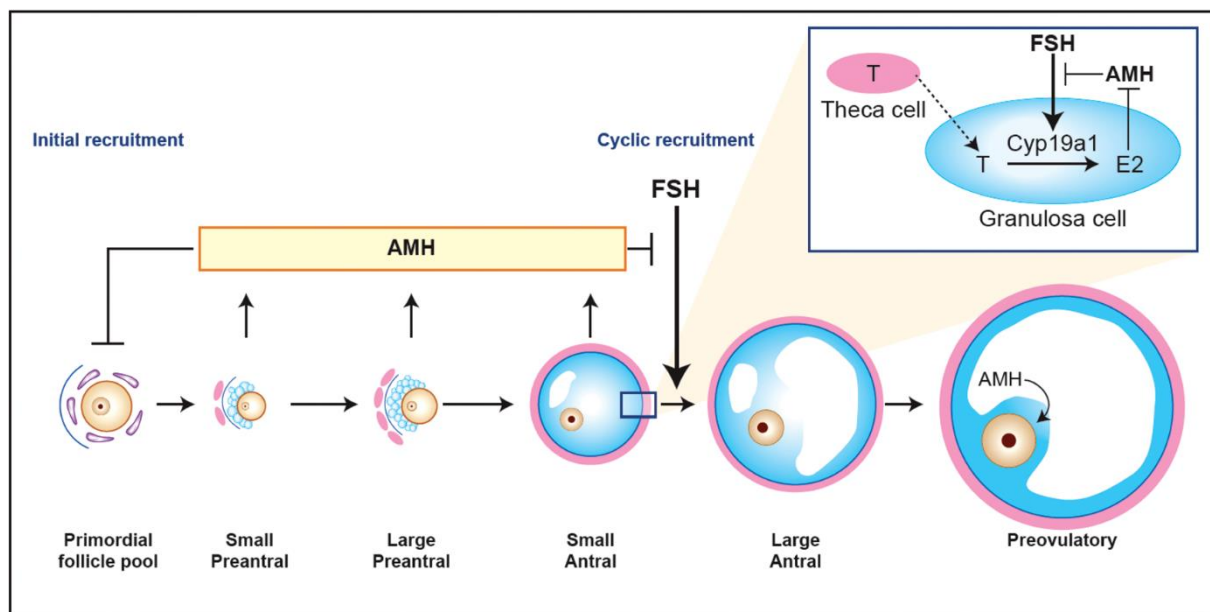
Tijekom fetalnog života, zametne stanice jajnika migriraju i proliferiraju te ulaze u prvu fazu mejoze pri čemu ne završavaju njen proces. Zametne stanice su obavijene somatskim stanicama tako formirajući primordijalne folikule tijekom 20. tjedna trudnoće dok zametne stanice koje se ne zatvaraju ulaze u proces apoptoze. Neki od nastalih primordijalnih folikula ulaze u folikularni bazen, povećavaju se te se sada nazivaju granulosa stanicama koje tijekom života žene proliferiraju dok se folikularni bazen ne iscrpi, što na kraju završava menopauzom. Rastuće folikule će biti izgubljene u procesu apoptoze ako ih ne spasi folikularni stimulirajući hormon (FSH). Ovaj proces spašavanja, nazvan selekcija, moguć je samo nakon puberteta kada je aktivirana hipofiza – gonadalna endokrina os. Folikule koje nastave rasti pod utjecajem FSH budu potaknute na oslobađanje svoje jajne stanice. Tijekom procesa ovulacije dovršene su odgođene faze mejoze. (Themmen, 2005)

Dvije su glavne odlučujuće točke koje određuju budućnost primordijalne folikule: regrutiranje i početak folikularnog rasta i selekcije te daljnja selekcija prema preovulatornoj stanici. (Themmen, 2005)

AMH ekspresija se prvo može primijetiti u granulosa stanicama primarnih folikula dok je ekspresija najjača u preantralnim i malim antralnim folikulama (<4 mm). Direktnim mjerenjima sinteze AMH u folikularnoj tekućini utvrđeno je da se koncentracije AMH u folikulama većim od 10 mm smanjuju do vrlo niskih ili gotovo nemjerljivih. To dokazuje da prestanak sinteze AMH u folikulu predstavlja neophodni zahtjev da bi moglo doći do selekcije dominantnog folikula, čiji daljnji rast i razvoj ovisi o stimulaciji sa FSH. (La Marca i Volpe, 2007)

AMH se smatra negativnim regulatorom ranih stadija folikularnog razvoja i inhibitorom FSH ovisne selekcije. U antralnim folikulama, sveukupna uloga AMH je da smanji osjetljivost folikula na FSH. Inhibitorni učinak AMH na ekspresiju aromataze i sintezu estradiola dokazan je u kulturama ljudskih granulosa luteinskih stanica. Pred ovulaciju, FSH postiže visoku koncentraciju dok se sinteza AMH smanjuje i tako nema zapreka u sintezi estradiola i rastu i razvoju odabranih folikula.

Do danas nije razjašnjeno koji čimbenik uzrokuje smanjenje sinteze AMH u odabranim folikulima, ali dokazano je da to nije FSH. Na slici 2, uz prikazano inhibitorno djelovanje AMH na početno folikularno regrutiranje i FSH-ovisni rast, pokazan je inhibicijski učinak AMH na ekspresiju aromataze induciranu od strane FSH čime se smanjuje koncentracija estradiola te inhibicijski učinak estradiola na ekspresiju AMH. (Dewailly i sur., 2014)



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja AMH u jajniku (Slika preuzeta iz Dewailly i sur., 2014)

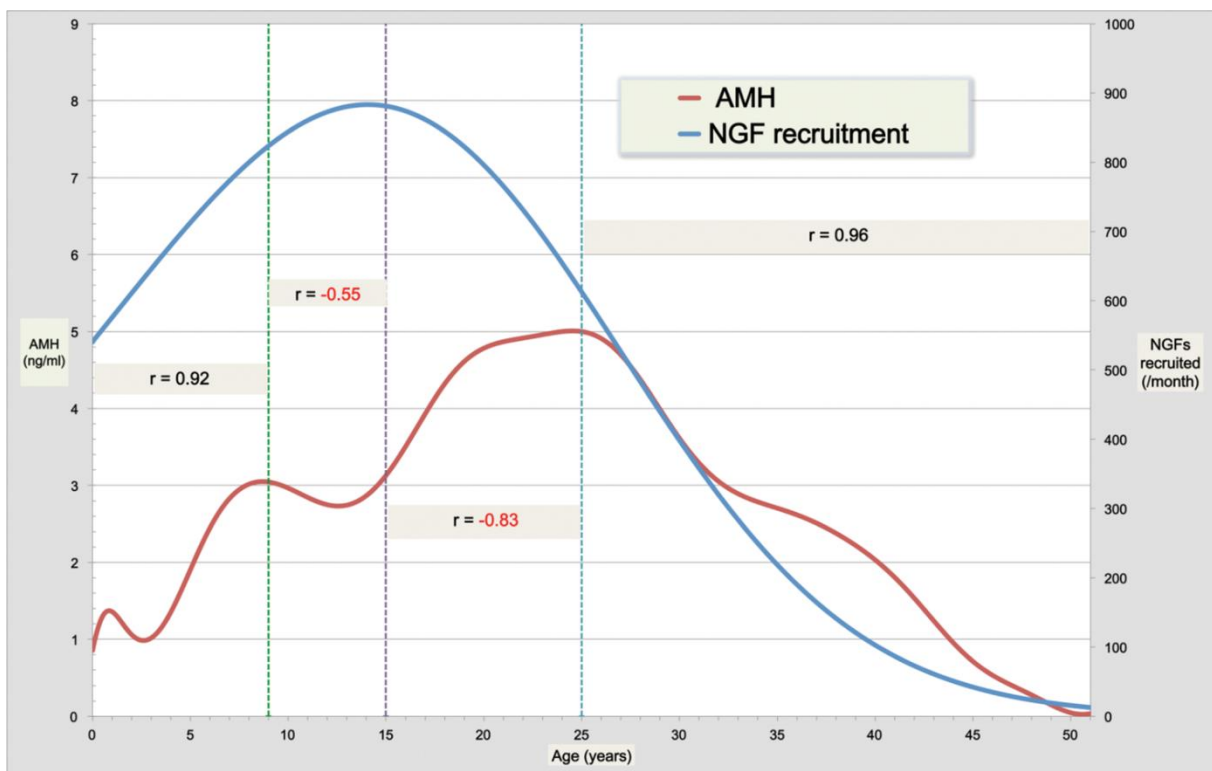
T=testosteron

E2=estradiol

CYP19A1=aromataza

Dinamika cirkulirajućeg AMH tijekom života može se podijeliti u nekoliko različitih faza (slika 3). Ubrzo nakon rođenja nastaje pik koji potvrđuje da se žensko novorođenče podvrgava „mini pubertetu“, nakon čega slijedi stalni porast koncentracije do 9. godine starosti. Tada dolazi do infleksije sa blagim padom koncentracije koja traje do 15. godine. Slijedi druga faza rasta do maksimalne koncentracije kada žena ima 25 godina. Nakon toga dolazi do neprekidnog

zmanjenja koncentracije pa sve do nemjerljivih vrijednosti kod dobi od 50-51 godine, što se očituje kao menopauza. Ovo pokazuje da se koncentracija AMH može koristiti kao indirektni biljeg rezerve jajnih stanica kod žena starijih od 25 godina. Prije te dobi, odnos između AMH i rezerve jajnih stanica složeniji je zbog čega je potreban oprez kod tumačenja rezultata kod djevojčica i mladih žena. (Dewailly i sur., 2014)



Slika 3. Prikaz dinamike koncentracije AMH tijekom života (Slika preuzeta iz Dewailly i sur., 2014)

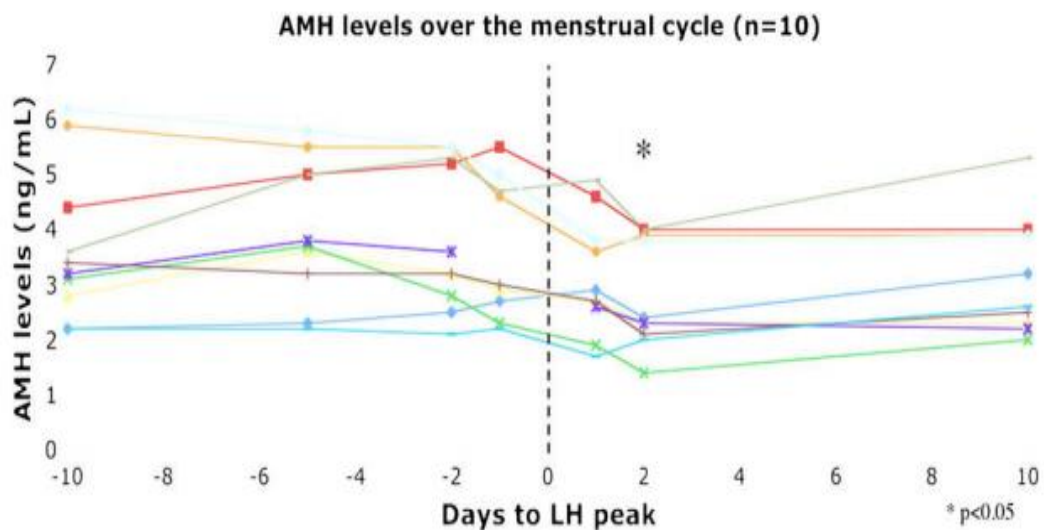
1.1.3 AMH KAO BILJEG FUNKCIJE JAJNIKA

AMH je prepoznat kao dobar pokazatelj starenja jajnika i rezerve jajnih stanica u žena. Kod miševa je dokazano da je sinteza AMH u malim antralnim folikulima odraz broja preostalih folikula u jajniku dok sinteza u pojedinom folikulu ostaje nepromijenjena (Kevenaar i sur., 2006). Koncentracija serumskog AMH smanjuje se tijekom vremena kod žena koje normalno ovuliraju. Žene mlađe od 25 godina

imaju daleko veće koncentracije AMH od žena starijih od 35 godina. Longitudinalnim praćenjem koncentracija AMH utvrđeno je da se AMH smanjuje i to sve do nemjerljivih vrijednosti kod žena u menopauzi. (Dewailly i sur., 2014)

U usporedbi sa drugim biljezima rezerve jajnih stanica, određivanje AMH pokazuje prednosti u tome što:

- najranije pokazuje smanjenje rezerve jajnih stanica,
- vrijednosti se najmanje mijenjaju od jednog do drugog menstruacijskog ciklusa,
- vrijednosti se najmanje mijenjaju unutar istog menstruacijskog ciklusa,
- vrijednosti se ne mijenjaju tijekom korištenja kontracepcijskih pilula i trudnoće,
- AMH ne ovisi o FSH (sve dok su vrijednosti FSH unutar kliničkih granica). Egzogeni FSH koji se daje ženama koje normalno ovuliraju ili imaju sindrom policističnih jajnika ne mijenja vrijednosti AMH u serumu. (Streuli i sur., 2009)



Slika 4. Prikaz fluktuacije AMH tijekom menstrualnog ciklusa kod 10 zdravih žena koje normalno ovuliraju. (Slika preuzeta sa www.fertstert.org)

Jedno od pitanja koje se postavlja je kako odrediti veličinu jajnika, što predstavlja i kvantitetu i kvalitetu ovarijskog folikularnog bazena. Broj primordijalnih folikula koji ostaju u jajniku je važan parametar kojeg je teško izravno izmjeriti. Različite tehnike su korištene kako bi se odredila rezerva jajnih stanica. (Themmen, 2005)

AFC (eng. antral follicle count), tj. broj antralnih folikula, određuje se vaginalnom ultrasonografijom i daje uvid u broj rastućih folikula u ovarijskom folikularnom bazenu. AFC se, uz AMH, smatra dobrim pokazateljem starenja jajnika. Upravo je koncentracija serumskog AMH u jakoj korelaciji sa brojem antralnih folikula (AFC). Njihova jaka korelacija posebno se primjenjuje kod in vitro fertilizacije (IVF). Zbog svoje visoke prediktivne vrijednosti mogu identificirati pacijentice sa najmanje 8 – 15 zrelih oocita. (Themmen, 2005)

1.1.4 ULOGA ODREĐIVANJA AMH U POSTUPCIMA MEDICINSKI POTPOMOGNUTE OPLODNJE

Postoje mišljenja da je AMH dobar u predviđanju uspjeha metoda potpomognute oplodnje i zrelosti jajnih stanica (Dewailly i sur., 2014), ali i da njegovo određivanje zajedno sa ostalim čimbenicima predviđanja uspješnosti ima slabi uspjeh. U žena u kojih je izmjerena manja koncentracija AMH prije ili u tijeku postupaka medicinske potpomognute oplodnje dobiven je manji broj jajnih stanica ili su bile slabije kvalitete. S druge strane, određivanje koncentracije AMH ne smatra se pogodnim da bi se na njemu bazirale kliničke odluke. Na kraju, izgleda da je određivanje vrijednosti AMH u folikulinskoj tekućini žena vrlo korisno u odabiru jajnih stanica i embrija. Broj trudnoća bio je značajno veći u onim slučajevima medicinski potpomognute oplodnje gdje su jajne stanice dobivene iz folikula koje su u svojoj folikulinskoj tekućini imali veće koncentracije AMH. (La Marca i sur., 2009)

1.1.5 AMH KOD ŽENA SA PCOS (SINDROM POLICISTIČNIH JAJNIKA)

Jedna od glavnih karakteristika PCOS je povećani broj folikula u jajniku. Zbog sposobnosti AMH da djeluje na rast folikula, pretpostavilo se da bi AMH mogao biti jedan od čimbenika uključenih u patofiziološki mehanizam nastanka PCOS. U serumu žena sa PCOS koncentracije AMH su povećane. Dokazano je da je sinteza AMH po stanici granulose anovulatornih PCOS 75 puta veća od sinteze u stanicama granulose normalnih jajnika. Također, pokazalo se da koncentracija AMH u serumu korelira sa jačinom simptoma u PCOS. Povećana sinteza AMH unutarne je svojstvo stanica granulose u PCOS da izlučuje povećane količine AMH, a ne samo posljedica povećanog broja folikula. Uzrok povećanoj sintezi AMH nije poznat. (Dewailly i sur., 2014)

1.1.6 METODE ODREĐIVANJA AMH I REFERENTNE VRIJEDNOSTI

Na početku razvoja imunoenzimskih testova za određivanje AMH, osjetljivost metoda bila je slaba (14 pmol/L). S vremenom se osjetljivost različitih proizvođača znatno povećala (0,18 pmol/L), ali nepostojanje univerzalnog standarda otežava usporedbe rezultata dobivene različitim metodama. Razlike u koncentracijama AMH dobivene različitim testovima bile su i do 400% (Dewailly i sur., 2014). Posljednjih par godina došlo je do usklađivanja rezultata (La Marca i sur., 2009). To je vjerojatno posljedica toga što danas oba testa koja su u uporabi, koriste ista protutijela. Danas su poznate granice referentnih intervala za AMH. Očekivane vrijednosti su podijeljene u nekoliko referentnih intervala s obzirom na dob žena, a verifikacija navedenog je predmet ovog diplomskog rada.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nepostojanje univerzalnog standarda za određivanje Anti-Müllerovog hormona (AMH) uvelike je otežavalo definiranje jedinstvenih referentnih intervala za AMH prema starosti. Dobivene vrijednosti AMH mogle su se uspoređivati jedino unutar istog istraživanja istom metodom određivanja, u istom laboratoriju. (Broer i sur., 2014)

Cilj ovog rada je verificirati povezanost između dobi i koncentracije AMH kod žena unutar naše populacije kako bi dokazali važnost njegovog određivanja kao pokazatelja plodnosti i biljega starenja jajnika. Verifikacija je provjera deklariranih referentnih intervala na manjem broju ispitanika. Cilj je provjeriti, tj. verificirati referentne intervale za AMH koje navodi proizvođač, na našoj populaciji ispitanica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

Reagens za određivanje AMH sastoji se od:

M = streptavidinom prekrivene mikročestice; 1 bočica, 6,5 mL

R1 = anti-AMH-At obilježeno biotinom (monoklonsko At iz miša) i fosfatni pufer pH=8,5; 1 bočica, 8 mL

R2 = anti-AMH-At obilježeno rutenij kompleksom (monoklonsko At iz miša) i fosfatni pufer pH=7,5; 1 bočica, 8 mL

Reagens se pohranjuje na 2-8°C i ne smrzava se.

Za unutarnju kontrolu kvalitete koriste se komercijalni kontrolni uzorci. Kontrola bi se trebala provoditi najmanje jednom u 24 sata dok se koristi test za određivanje AMH.

Kalibrator = AMH CalSet

Kontrolni uzorci = PreciControl AMH 1 i 2 - 2 bočice, u svakoj 2,0 mL kontrolnog seruma

(PreciControl = liofilizirani kontrolni serum baziran na ljudskom serumu)

Otopina za razrjeđivanje = Diluent Universal

Postupkom kalibracije umjeravaju se reagensi. Kalibracija se obavezno provodi kada se otvori novi reagens. Kalibracija se preporuča nakon 7 dana te nakon 1 mjeseca (28 dana) tijekom korištenja istog reagensa, odnosno svaki put kada unutarnja kontrola odstupa od predviđenog raspona.

3.1.1 UZORCI

Za analizu su korišteni uzorci seruma dobivenih od 64 ispitanice, u dobi od 20 – 50 godina. Serum je dobiven vađenjem krvi u standardne epruvete bez antikoagulansa ili epruvete koje sadrže gel separator (odvaja stanice od seruma, serum je gore, a stanice ispod gela). Primarni uzorci su se potom centrifugirali 30 min nakon uzimanja uzorka, 10 min na 3500 okr/min te se alikvotiralo 500 μ L u novu epruvetu.

AMH je stabilan u uzorku 3 dana na 20-25°C, 5 dana na 2-8°C te 6 mjeseci na -20°C (\pm 5°C). Jednom otopljen zamrznuti uzorak više nije moguće zamrzavati.

3.1.2 MJERNI UREĐAJ

Koncentracija AMH se određivala na imunokemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics, 2016).

3.2 METODA

Korištena metoda je ECLIA. Princip metode je sendvič imunokemijska metoda. Ukupno trajanje analize je 18 minuta. Metoda se sastoji od dvije inkubacije i detekcije signala.

Prva inkubacija: 50 μ L uzorka inkubira se sa biotinom obilježenim monoklinalnim At specifičnim za AMH i sa monoklinalnim AMH specifičnim At obilježenim rutenijevim kompleksom. Oni tvore sendvič At (obilježeno biotinom) – antigen (AMH) – At (obilježeno kompleksom rutenija).

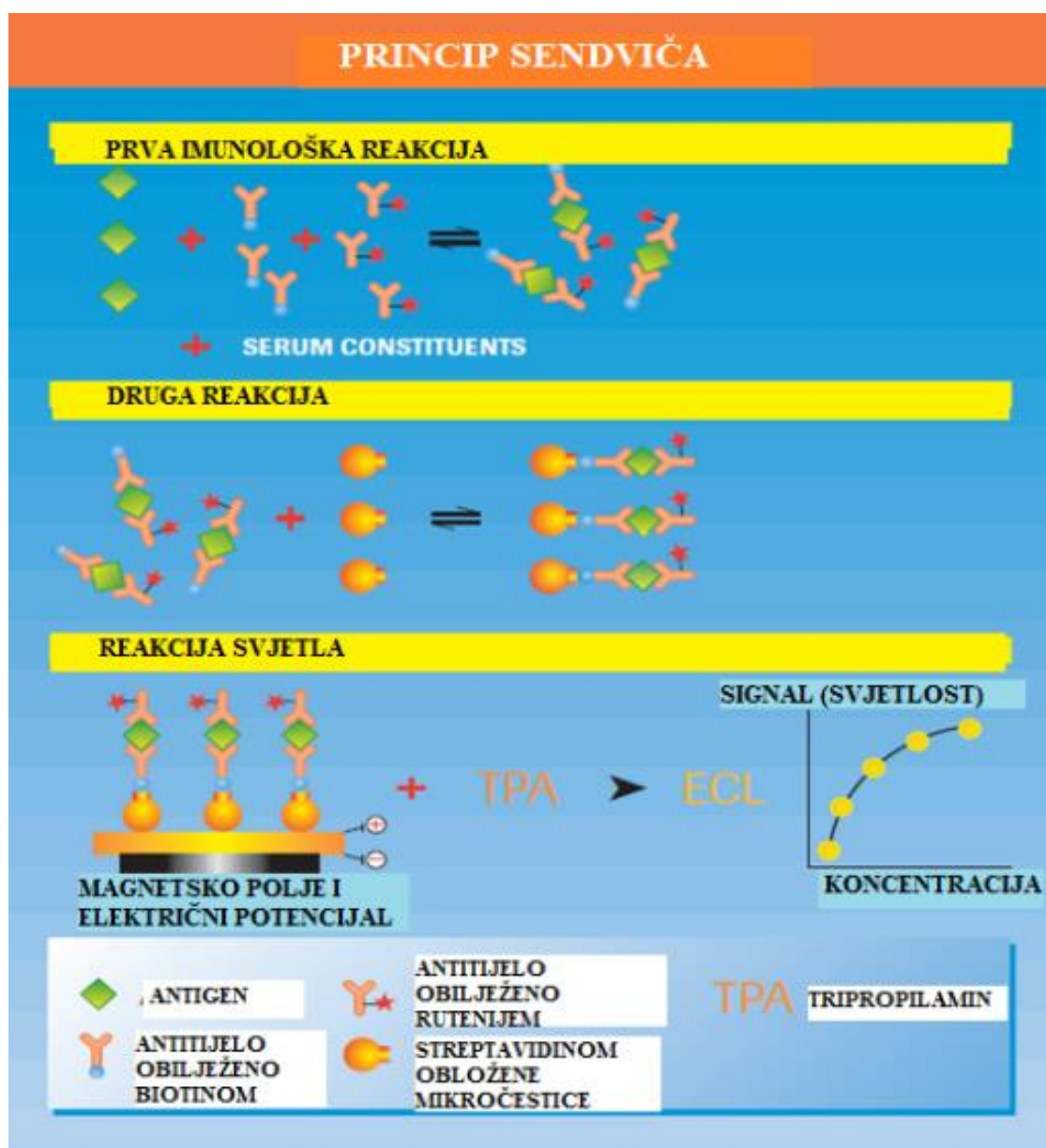
Druga inkubacija: Nakon dodatka mikročestica obilježenih streptavidinom, kompleks se veže za stacionarnu fazu zbog streptavidina koji se čvrsto veže za biotin kojim je obilježeno antitijelo.

Reakcijska smjesa se usiše u mjernu komoru (cijev za mjerenje), gdje se mikročestice vežu na magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane supstance se onda uklone pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadrži TPA. Nakon primjene

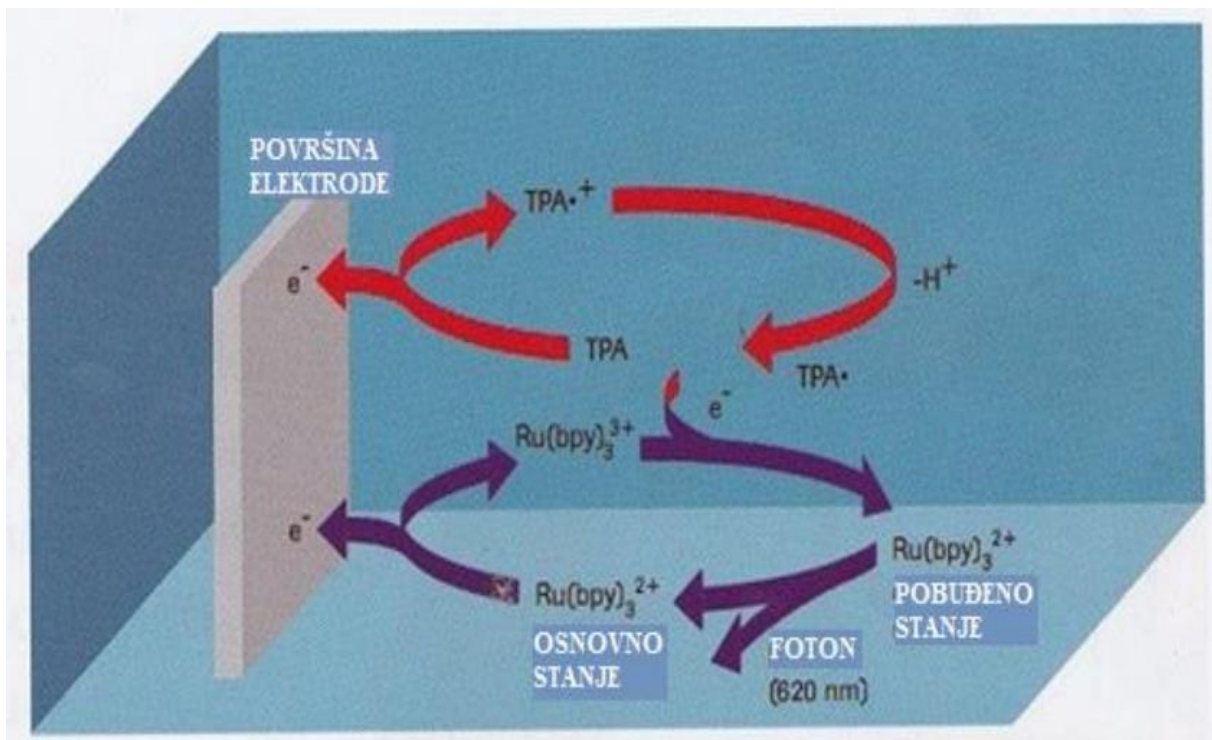
napona na elektrodi, nastaje kemiluminiscentna reakcija između TPA i Ru-kompleksa, koja dovodi do emisije svjetla, koju mjeri fotomultiplikator. Nastala količina svjetla proporcionalna je koncentraciji analita u uzorku.

Kompleks rutenija: $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}) = \text{Tris}(2,2'\text{bipiridil})\text{rutenij(II)kompleks}$

(Roche Diagnostics, 2016)



Slika 5. Princip metode (ECLIA) (Slika preuzeta s www.hnlab.ir)



Slika 6. Reakcija između TPA i Ru-kompleksa (Slika preuzeta s www.hnlab.ir)

TPA se na elektrodi oksidira (otpušta elektron) i stvara radikal $\text{TPA}\cdot^+$ dok se Ru-kompleks (u kojem je Ru u Ru^{2+} obliku) oksidira do kationa (Ru^{3+}). TPA radikal i Ru-kation reagiraju pri čemu se Ru-kompleks reducira i prelazi u pobuđeno stanje. Ono je nestabilno pa dolazi do emisije fotona na 620 nm i kompleks se vraća u osnovno stanje. Reakcijski ciklus se konstantno regenerira te može proći kroz niz ciklusa, u kojima se stvara svjetlosni signal.

3.2.1 PRIMJENA METODE

ECLIA se koristi na imunokemijskim analizatorima Elecsys i cobas e. To je imunokemijska metoda za in vitro određivanje AMH kao i drugih analita u humanom serumu i Li-heparin plazmi (Roche Diagnostics, 2016). Koristi se za procjenu rezerve jajnika, predviđanje odgovora na kontroliranu stimulaciju jajnika, u dijagnozi poremećaja razvoja spola te onkologiji (marker tumora granuloznih stanica) (www.infertilitylab.com).

3.2.2 PREDNOSTI METODE

U odnosu na ručne metode (ELISA), ECLIA ima nekoliko prednosti:

- Metoda je automatizirana;
- Vrijeme trajanja je samo 18 minuta;
- Povećana analitička osjetljivost ($0,01 \text{ ng/mL} = 0,071 \text{ pmol/L}$);
- Nepreciznost je manja od 5%;
- Ima široki raspon mjerenja: $0,01 - 23,0 \text{ ng/mL}$ ($0,071-164 \text{ pmol/L}$).

3.2.3 INTERFERENCIJE

Nema utjecaja ikterije do koncentracije bilirubina $<1130 \text{ } \mu\text{mol/L}$, hemolize ako je koncentracija hemoglobina $<0,621 \text{ mmol/L}$, lipemije ako je koncentracija lipida $<1000 \text{ mg/dL}$ te biotina ako je koncentracija manja od 143 nmol/L . Uzorci se ne bi smjeli uzimati kod pacijentica koje su na terapiji visokim dozama biotina ($>5 \text{ mg}$ dnevno) prije nego prođe najmanje 8 sati od uzimanja posljednje doze biotina.

U in vitro testovima sa 20 najčešće korištenih lijekova (ASK, askorbinska kiselina, heparin, ibuprofen, levodopa itd.) nisu ustanovljene interferencije.

3.2.4 MJERNO PODRUČJE ZA AMH

0,07 – 164 pmol/L

Vrijednosti ispod granice analitičke osjetljivosti izdaju se kao $< 0,07 \text{ pmol/L}$.

Vrijednosti iznad granice linearnosti metode izdaju se kao $> 164 \text{ pmol/L}$, ili $> 328 \text{ pmol/L}$ kod dvostruko razrijeđenog uzorka.

Funkcionalna osjetljivost: $0,21 \text{ pmol/L}$ (najniža koncentracija koja se može pouzdano izmjeriti sa $KV < 20\%$).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Skupinu ispitanika činile su 64 žene, starosti 20 – 50 godina. Određena im je koncentracija AMH u Odjelu za laboratorijsku endokrinologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Rezultati su prikazani u tablici 1 te su podijeljeni u 3 skupine ovisno o dobi ispitanica:

- od 20 do 29 godina,
- od 30 do 39 godina,
- od 40 do 50 godina.

Prvu skupinu činile su 23 žene, drugu skupinu 21 žena dok je treću skupinu činilo 20 žena.

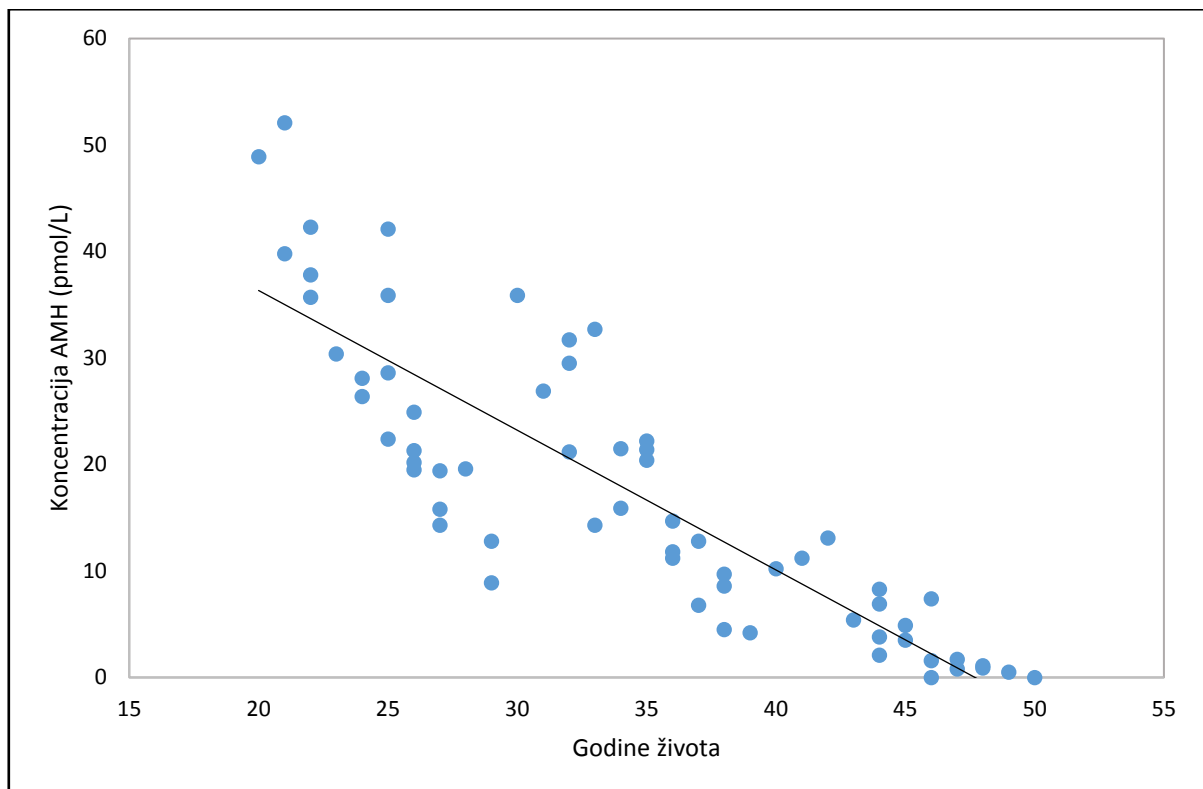
Tablica 1. Rezultati

Dob (g)	20 – 29 g	30 – 39 g	40 – 50 g
	AMH pmol/L		
24	26,4		
26	20,2		
27	15,8		
29	8,9		
22	42,3		
25	35,9		
25	28,6		
27	19,4		
29	12,8		
26	24,9		
28	19,6		
22	35,7		
25	42,1		
21	39,8		
26	21,3		
24	28,1		
26	19,5		
27	14,3		
25	22,4		
23	30,4		
20	48,9		
21	52,1		
22	37,8		
38		4,5	
32		21,2	
33		14,3	
34		15,9	
35		20,4	

37		6,8	
31		26,9	
39		4,2	
36		11,8	
32		29,5	
32		31,7	
34		21,5	
30		35,9	
36		14,7	
35		21,4	
37		12,8	
35		22,2	
38		9,7	
36		11,2	
38		8,6	
33		32,7	
46			1,6
47			0,8
45			3,5
44			6,9
46			7,4
41			11,2
48			1,1
44			2,1
42			13,1
43			5,4
44			3,8
45			4,9
40			10,2
50			<0,07
49			0,5
48			0,9
47			1,7

44			8,3
46			<0,07
41			6,3

Zbog značajne povezanosti, rezultati koncentracija AMH se procjenjuju prema dobi. Na slici 7. grafički su prikazane izmjerene koncentracije AMH u korelaciji sa dobi ispitanica. Vidljivo je da se vrijednosti AMH smanjuju sa starenjem.



Slika 7. Koncentracija AMH ovisno o dobi ispitanica.

4.1 STATISTIKA

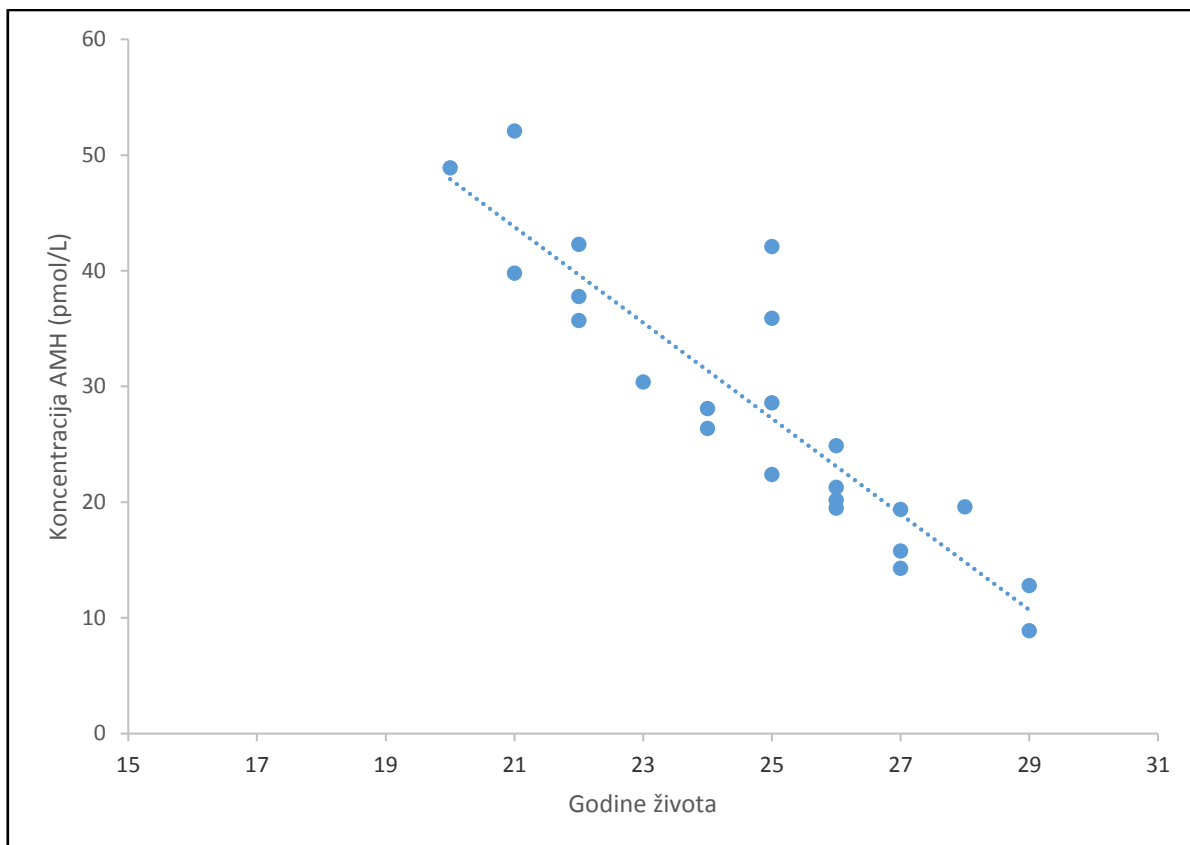
Rezultati su analizirani statističkim postupcima pomoću SSS (Social Science Statistics). Izračunate su korelacije unutar svake dobne skupine pojedinačno i korelacija između svih rezultata. Za utvrđivanje povezanosti između dobi ispitanica i koncentracije AMH u serumu upotrijebljen je Pearsonov koeficijent korelacije. Statistička značajnost je prihvaćena uz $p < 0,05$. Pearsonov koeficijent korelacije označava se sa malim slovom r ili r_p te može poprimiti vrijednost od -1 do $+1$. Vrijednost koeficijenta korelacije od 0 do 1 je pozitivna korelacija i označava sukladan rast vrijednosti obje skupine podataka. Vrijednost koeficijenta korelacije od 0 do -1 označava negativnu korelaciju, odnosno sukladan porast vrijednosti jedne varijable, a pad vrijednosti druge varijable. Potpune povezanosti, tj. vrijednosti koeficijenta korelacije $r = \pm 1$ nisu svojstvene biološkim sustavima i najčešće se odnose na teoretske modele. Kada koeficijent korelacije ima vrijednost 0 , tada on označava nepostojanje linearne povezanosti. (Udovičić i sur., 2007)

Koeficijent determinacije, r^2 , je mjera jačine povezanosti dvaju obilježja, u ovom slučaju, dobi i koncentracije AMH. Za njegovo izračunavanje potrebno je odrediti koeficijent korelacije. Koeficijent determinacije dobije se kvadriranjem vrijednosti koeficijenta korelacije. (Udovičić i sur., 2007)

U tablici 2. su prikazane aritmetičke sredine godina pojedinih dobnih skupina i medijan koncentracija AMH za svaku skupinu.

Tablica 2. Aritmetičke sredine godina ispitanica i koncentracija AMH u serumu pojedinih dobnih skupina.

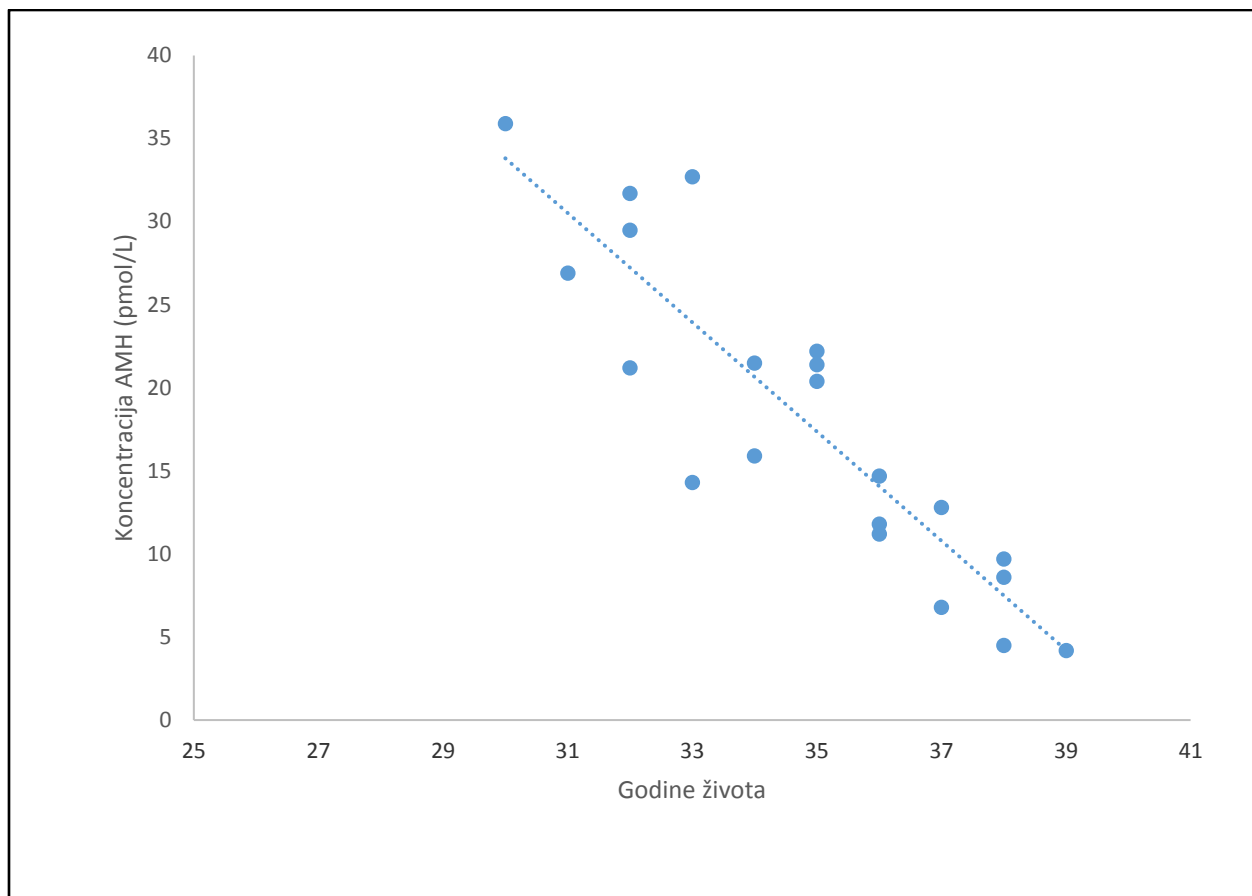
GODINE ŽIVOTA	N	GODINE ISPITANICA (g)	AMH (pmol/L)
		ARITM. SREDINA	MEDIJAN
20 – 29 god.	23	$24,78 \pm 5,15$	26,4
30 – 39 god.	21	$34,81 \pm 5,12$	15,9
40 – 50 god.	20	$45,21 \pm 5,32$	3,5



Slika 8. Odnos koncentracije AMH i godina života unutar prve dobne skupine (20 – 29 god)

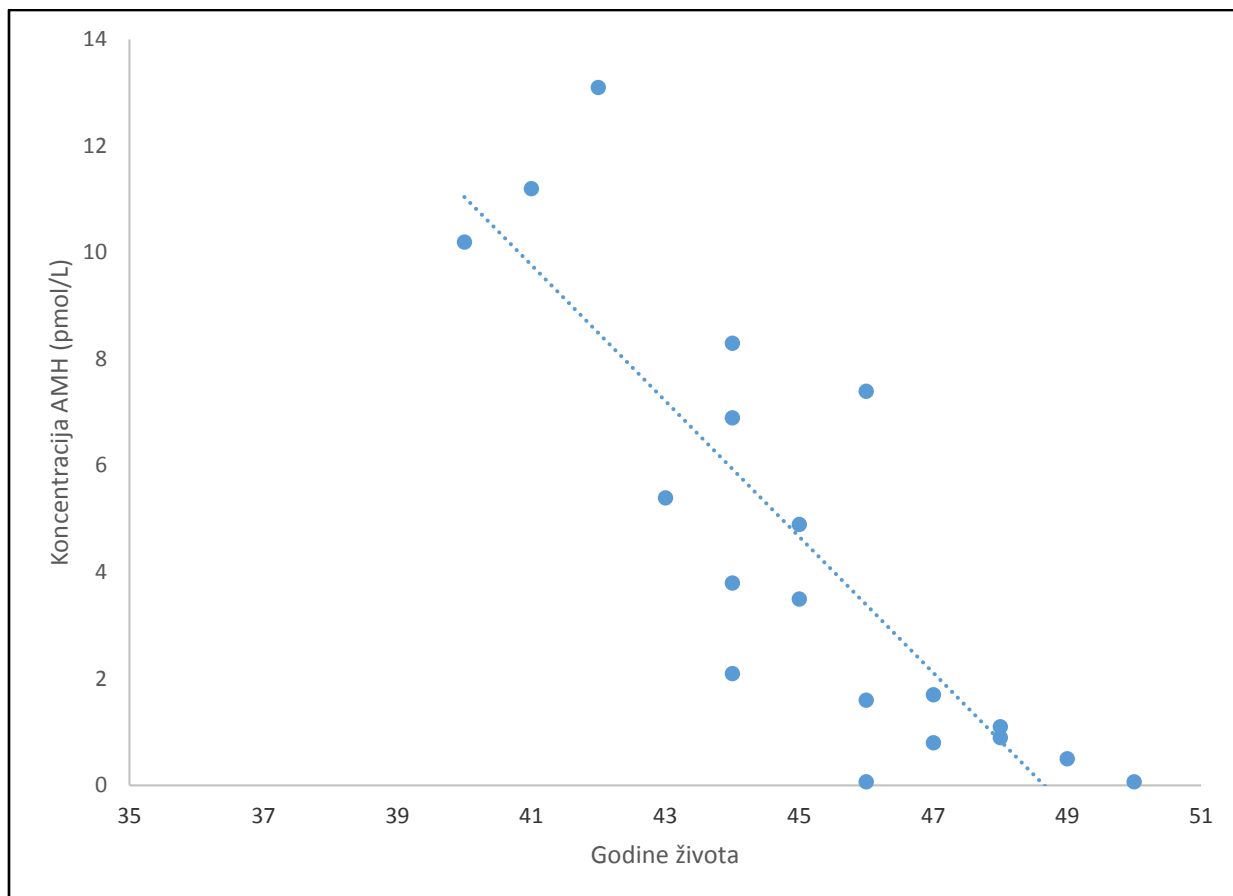
U prvoj skupini žena starosti između 20 i 29 godina utvrđena je značajna povezanost dobi i koncentracije AMH. Dobivena je jaka negativna povezanost sa koeficijentom korelacije $r=-0,9001$; $p<0,05$; $r^2=0,8102$

Koeficijent korelacije je negativan zbog obrnuto proporcionalnog odnosa između dobi i koncentracije AMH, odnosno porast dobi prati smanjenje koncentracije AMH.



Slika 9. Odnos koncentracije AMH i godina života unutar druge dobne skupine (30 – 39 god)

Jaka negativna povezanost značajna je i za drugu skupinu žena u dobi između 30 i 39 godina. Izračunati koeficijent korelacije iznosi $r=-0,8907$; $p<0,05$; $r^2=0,7933$



Slika 10. Odnos koncentracije AMH i godina života unutar treće dobne skupine (40 – 50 god)

U trećoj skupini žena u dobi između 40 i 50 godina dobivena je jaka negativna povezanost sa koeficijentom korelacije $r=-0,8335$; $p<0,05$; $r^2=0,6947$

Na sveukupnom uzorku žena također je dobivena jaka negativna povezanost sa koeficijentom korelacije $r=-0,8609$; $p<0,05$; $r^2=0,7411$

4.2 RASPRAVA

Cilj je bio pokazati povezanost dobi i koncentracije AMH zbog čega AMH može biti dobar pokazatelj smanjene ovarijske rezerve. Skupina od 64 ispitanica podijeljena je u tri podskupine s obzirom na dob. Razlog tome bio je ispitati da li je povezanost sa dobi različita u pojedinim dobnim skupinama. Prvu podskupinu činile su žene u dobi od 20 do 29 godina i bilo ih je 23, u drugoj podskupini bila je 21 žena u dobi od 30 do 39 godina te su treću podskupinu činile žene u dobi od 40 do 50 godina i bilo ih je 20. (Tablica 2.)

Određene su koncentracije AMH u serumu. (Tablica 1.). Rezultati su obrađeni u statističkom programu SSS (Social Science Statistics) i prikazani su raspršenim grafovima na kojima je povučena crta trenda. Svaka točka na grafu prikazuje jednu osobu. (Slika 6 - 9). Grafovi pokazuju padajući trend zbog obrnuto proporcionalnog odnosa gdje se povećanjem dobi smanjuje koncentracija AMH. Time je dokazana dinamika koncentracije AMH tijekom života žene gdje starenjem opadaju koncentracije AMH.

Izračunati su koeficijenti korelacije i determinacije kako bi se pokazala jačina povezanosti dobi i koncentracije AMH. Dobivene su negativne vrijednosti koeficijenta korelacije što ukazuje na negativnu korelaciju, odnosno padom vrijednosti dobi povećava se vrijednost koncentracije AMH i obrnuto. Koeficijenti determinacije su pozitivni zbog kvadriranja. Sve dobivene vrijednosti ukazuju na jake korelacije, odnosno jaku povezanost dobi i koncentracije AMH.

Usporedbom koeficijenta korelacije svake pojedine dobne skupine sa sveukupnim uzorkom uočena je bolja povezanost između dobi i koncentracije AMH u slučaju kada su rezultati grupirani u dobne skupine. Iznimka je treća dobna skupina u kojoj je korelacija nešto manja od ukupne korelacije.

Na temelju rezultata i dobivenih korelacija provjerili smo referentne intervale za AMH prema starosti koje daje proizvođač. U protokolu dobivenom uz mjerni uređaj, na kojem se određuje koncentracija AMH, definirani su referentni intervale. Intervali su podijeljeni prema starosti u 6 manjih intervala u rasponu dobi od 20 do 50 godina (Tablica 3). Usporedili smo referentne intervale i dobivene rezultate na temelju čega smo verificirali referentne intervale koje navodi proizvođač.

Tablica 3. Referentni intervali za AMH prema starosti

DOBNA SKUPINA (god)	MEDIJAN I REF. INTERVAL (pmol/L)
20 – 24	28,6 (25,7 – 31,7)
25 - 29	23,6 (21,4 – 27,8)
30 – 34	20,0 (16,8 – 24,8)
35 – 39	14,2 (12,4 – 16,9)
40 – 44	6,29 (5,18 – 8,07)
45 - 50	1,39 (1,03 – 1,92)

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu određene su koncentracije AMH u žena starosne dobi između 20 i 50 godina kako bi se verificirala povezanost dobi i koncentracije AMH. Na temelju dobivenih rezultata možemo potvrditi njihovu jaku povezanost. Osim ispitane povezanosti dobi i koncentracije AMH, usporedbom naših rezultata i vrijednosti dobivenih u protokolu, verificirali smo referentne intervale koje daje proizvođač. Time možemo zaključiti da je AMH, uz nabrojene prednosti, dobar indirektni pokazatelj starenja jajnika i rezerve jajnih stanica u žena. Zbog toga je njegovo određivanje prikladno uz testove plodnosti i kod postupaka medicinski potpomognute oplodnje. Također može dati prognostičke informacije u procesu savjetovanja i planiranja postupka umjetne oplodnje za parove kod kojih ne dolazi do spontanog začeća.

6. LITERATURA

Anti-Müllerian hormone, 2009, <https://infertilitylab.com>, pristupljeno 24.05.2017.

Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocrine Reviews*, 2009, 30, 465-493.

Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update*, 2014, 20, 688-701.

Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambal C, Mason H, Nelson SM, Visser JA, Wallace WH, Anderson RA. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update*, 2014, 20, 370-385.

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BMN, Groome NP, Themmen APN, Visser JA. Serum Anti-Müllerian Hormone Levels Reflect the size of the Primordial Follicle Pool in Mice. *Endocrinology*, 2006, 147, 3228-3234.

La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Human Reproduction*, 2007, 22, 766-771.

La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS. Anti-Müllerian Hormone (AMH): what do we still need to know? *Human Reproduction*, 2009, 24, 2264-2275.

La Marca A i Volpe A. The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod Update*, 2007, 13, 265-273.

La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle, *Hum Reprod*, 2006, 12, 3103-3107.

Roche Diagnostisc. AMH, Anti-Müllerian hormone. Mannheim, 2016. Roche Diagnostics. Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) for the in vitro quantitative determination of anti-Müllerian Hormone in human serum and plasma. Rotkreuz, 2014.

Roche Diagnostics. Fully automated Alcsys Anti-Müllerian Hormone (AMH) assay. Providing clinical confidence in reliable assessment of ovarian reserve. Rotkreuz, 2014.

Sonigo C, Simon C, Boubaya M, Benoit A, Sifer C, Sermondade N, Grynberg M. What threshold values of antral follicle count and serum AMH levels should be considered for oocyte cryopreservation after *in vitro* maturation? Human Reproduction, 2016, 31, 1493-1500.

Streuli I, Fraisse T, Chapron C, Bijaoui G, Bischof P, de Ziegler D. Clinical uses of anti-Müllerian hormone assays: pitfalls and promises. Fertil Steril, 2009, 1, 226-230.

Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian Inhibiting Substance: An instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. Endocrinol Reviews, 2001, 22, 657-674.

Themmen A. Anti-Müllerian Hormone: Its Role in Follicular Growth Initiation and Survival and as an Ovarian Reserve Marker. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005, 34, 18-21.

Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2005, 45, 20-24.

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Odabrane teme iz biostatistike: Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? Biochemia Medica, 2007, 17, 10-5.

7. SAŽETAK

Određivanje Anti – Müllerovog hormona (AMH) danas je od velike značajnosti tijekom ispitivanja plodnosti kod žena. AMH se smatra indirektnim pokazateljem rezerve jajnih stanica jer daje informaciju o broju preostalih jajnih stanica i starosti jajnika. Zbog prednosti kojih ima naspram ostalih biljega jajnika njegovo određivanje sve više ima važnu ulogu u procesu ispitivanja plodnosti.

Cilj ovog rada je ispitati povezanost između dobi žena i koncentracije AMH u serumu kako bi se mogli verificirati referentni intervali za AMH prema dobi ispitanica. To je od iznimne važnosti zbog činjenice da vrijednosti AMH opadaju starenjem.

Koncentracije AMH su određene kod 64 žene u dobi između 20 i 50 godina, elektrokemiluminiscentnom metodom (ECLIA) na analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics). Rezultati su obrađeni u statističkom programu SSS (Social Science Statistics). Ispitanice su podijeljene u tri podskupine prema dobi. Jednu podskupinu činile su žene u dobi od 20 do 29 godina, drugu podskupinu žene u dobi od 30 do 39 godina te treću podskupinu žene starosti između 40 i 50 godina. Izračunati su koeficijenti korelacije za svaku podskupinu i cijeli uzorak te su se međusobno usporedili.

Rezultati su pokazali jake negativne korelacije što ide u prilog obrnuto proporcionalnom odnosu dobi i koncentracije AMH. Također, korelacije pojedinih skupina pokazale su jaču povezanost u odnosu na sveukupni uzorak uz iznimku za treću dobnu skupinu. Našim rezultatima smo time potvrdili primjenjivost referentnih intervala proizvođača na našoj populaciji.

8. SUMMARY

Determination of Anti - Müller's hormone (AMH) today is of great significance during fertility testing in women. AMH is considered to be an indirect indicator of the ovarian reserve because it provides information on the number of ovarian cells remaining and the age of ovaries. Due to the advantages of having over other ovarian markers, its determination increasingly plays an important role in the process of fertility testing.

The aim of this study is to examine the correlation between the age of women and serum AMH concentration in order to verify the reference AMH intervals according to the age of the subjects. This is of utmost importance because the AMH values decrease with age.

AMH concentrations were determined in 64 women between the ages of 20 and 50 by electrochemiluminiscent method (ECLIA) on the Cobas e411 (Roche Diagnostics) analyzer. The results are processed in the SSS (Social Science Statistics) statistics program. The subjects are divided into three subgroups by age. One subgroup was composed of women aged 20 to 29, the second subgroup of women aged 30 to 39, and the third subgroup of women between the ages of 40 and 50. Correlation coefficients for each subgroup and whole sample were compared.

The results showed strong negative correlations, which goes in favor of reverse proportional according to age and AMH concentration. Also, correlations of individual groups showed a stronger association with the overall sample with the exception of the third age group. Our results thus confirmed the applicability of the reference intervals in our population.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Povezanost dobi i koncentracije AMH

Ivona Brkić

SAŽETAK

Određivanje Anti – Müllerovog hormona (AMH) danas je od velike značajnosti tijekom ispitivanja plodnosti kod žena. AMH se smatra indirektnim pokazateljem rezerve jajnih stanica jer daje informaciju o broju preostalih jajnih stanica i starosti jajnika. Zbog prednosti kojih ima naspram ostalih biljega jajnika njegovo određivanje sve više ima važnu ulogu u procesu ispitivanja plodnosti.

Cilj ovog rada je ispitati povezanost između dobi žena i koncentracije AMH u serumu kako bi se mogli verificirati referentni intervali za AMH prema dobi ispitanica. To je od iznimne važnosti zbog činjenice da vrijednosti AMH opadaju starenjem.

Koncentracije AMH su određene kod 64 žene u dobi između 20 i 50 godina, elektrokemiluminiscentnom metodom (ECLIA) na analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics). Rezultati su obrađeni u statističkom programu SSS (Social Science Statistics). Ispitanice su podijeljene u tri podskupine prema dobi. Jednu podskupinu činile su žene u dobi od 20 do 29 godina, drugu podskupinu žene u dobi od 30 do 39 godina te treću podskupinu žene starosti između 40 i 50 godina. Izračunati su koeficijenti korelacije za svaku podskupinu i cijeli uzorak te su se međusobno usporedili.

Rezultati su pokazali jake negativne korelacije što ide u prilog obrnuto proporcionalnom odnosu dobi i koncentracije AMH. Također, korelacije pojedinih skupina pokazale su jaču povezanost u odnosu na sveukupni uzorak uz iznimku za treću dobnu skupinu. Našim rezultatima smo time potvrdili primjenjivost referentnih intervala proizvođača na našoj populaciji.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 29 stranica, 10 grafičkih prikaza, 3 tablice i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Anti-Müllerov hormon, plodnost, biljeg jajnika

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Saša Kralik Oguić, *znanstvena suradnica, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Laboratory Medicine
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Correlation between age and concentration of AMH

Ivona Brkić

SUMMARY

Determination of Anti - Müller's hormone (AMH) today is of great significance during fertility testing in women. AMH is considered to be an indirect indicator of the ovarian reserve because it provides information on the number of ovarian cells remaining and the age of ovaries. Due to the advantages of having over other ovarian markers, its determination increasingly plays an important role in the process of fertility testing.

The aim of this study is to examine the correlation between the age of women and serum AMH concentration in order to verify the reference AMH intervals according to the age of the subjects. This is of utmost importance because the AMH values decrease with age.

AMH concentrations were determined in 64 women between the ages of 20 and 50 by electrochemiluminiscent method (ECLIA) on the Cobas e411 (Roche Diagnostics) analyzer. The results are processed in the SSS (Social Science Statistics) statistics program. The subjects are divided into three subgroups by age. One subgroup was composed of women aged 20 to 29, the second subgroup of women aged 30 to 39, and the third subgroup of women between the ages of 40 and 50. Correlation coefficients for each subgroup and whole sample were compared.

The results showed strong negative correlations, which goes in favor of reverse proportional according to age and AMH concentration. Also, correlations of individual groups showed a stronger association with the overall sample with the exception of the third age group. Our results thus confirmed the applicability of the reference intervals in our population.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 29 pages, 10 figures, 3 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Anti-Müller hormone, fertility, ovarian marker

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Nada Vrkić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Saša Kralik Oguić, Ph.D. *Assistant Research Scientist*, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb

The thesis was accepted: June 2017.