

# Anti-Müllerov hormon i broj antralnih folikula kao biljezi ovarijske rezerve i uspješnosti metoda pomognute oplodnje

---

Valinčić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:825769>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-02**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Barbara Valinčić**

**ANTI-MÜLLEROV HORMON I BROJ  
ANTRALNIH FOLIKULA KAO BILJEZI  
OVARIJSKE REZERVE I USPJEŠNOSTI  
METODA POMOGNUTE OPLODNJE**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2022./2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za humanu reprodukciju i endokrinologiju Klinike za ginekologiju i porodništvo u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ pod vodstvom doc. dr. sc. Tatjane Pavelić Turudić , prim. dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## **POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA**

**AFC** – broj antralnih folikula (eng. antral follicle count)

**AHM** – Antimüllerov hormon

**CCCT** – klomifen-citrat dinamički test (eng. clomiphene-citrate challenge test)

**DOR** – snižena ovarijska rezerva (eng. diminished/decreased ovarian reserve)

**E2** – estradiol

**FOR** – funkcionalna ovarijska rezerva

**FSH** – folikulostimulirajući hormon

**GIFT** – transfer gameta u jajovode (eng. gamete intrafallopian transfer)

**GnRH** – gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. gonadotropin-releasing hormone)

**ICSI** – intracitoplazmatska injekcija spermija (eng. intracytoplasmic sperm injection)

**ITI** – intratubarna inseminacija (eng. intratubal insemination)

**IUI** – intrauterina inseminacija (eng. intrauterine insemination)

**IVF** – in vitro fertilizacija (izvantjelesna oplodnja)

**MPO** – medicinski pomognuta oplodnja

**OHSS** – sindrom hiperstimulacije jajnika (eng. ovarian hyperstimulation syndrome)

**OR** – ovarijska rezerva

**PCOS** – sindrom policističnih jajnika

**POI** – primarna ovarijska insuficijencija

**POR** – slab odgovor na stimulaciju (eng. poor ovarian responder)

**TGF- $\beta$**  – transformirajući faktor rasta  $\beta$

**UZV** – ultrazvuk

**ZIFT** – transfer zigote u jajovod (eng. zygote intrafallopian transfer)

**WHO** – Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)

## **SADRŽAJ**

### **SAŽETAK**

### **SUMMARY**

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REPRODUKCIJSKO STARENJE JAJNIKA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. OVARIJSKA REZERVA (OR) .....</b>	<b>6</b>
3.1 OVARIJSKO STARENJE U ŽENA.....	6
3.2 NORMALNA OVARIJSKA REZERVA.....	8
3.3 SMANJENA OVARIJSKA REZREVA.....	8
<b>4. BILJEZI OVARIJSKE REZERVE.....</b>	<b>10</b>
4.1 HORMONSKI BILJEZI .....	10
4.1.1. ANTI-MÜLLEROV HORMON (AMH).....	11
4.1.2. INHIBIN B.....	16
4.1.3. FOLIKULOSTIMULIRAJUĆI HORMON (FSH).....	17
4.1.4. ESTRADIOL (E2).....	18
4.2. ULTRAZVUČNI BILJEZI.....	20
4.2.1. BROJ ANTRALNIH FOLIKULA (AFC).....	20
4.2.2. VOLUMEN JAJNIKA.....	22
4.3. KLOMIFEN-CITRAT DINAMIČKI TEST (CCCT).....	22
<b>5. USPOREDBA AMH I AFC.....</b>	<b>24</b>
<b>6. METODE POMOĞNUTE OPLODNJE (MPO).....</b>	<b>28</b>
6.1. BILJEZI OVARIJSKE REZERVE I ISHOD IVF-A.....	29

<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>32</b>
<b>8. ZAHVALE.....</b>	<b>34</b>
<b>9. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>35</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>41</b>

## SAŽETAK

### **Anti-Müllerov hormon i broj antralnih folikula kao biljezi ovarijske rezerve i uspješnosti metoda pomognute oplodnje**

Barbara Valinčić

Sve češći uzrok neplodnosti žena u današnjem modernom svijetu čine promjena stila života i odgoda rađanja. Žene se rađaju s konačnim brojem primordijalnih folikula dostupnih za folikulogenezu te se oni smanjuju sa životnom dobi, a tako se smanjuje i ženin reproduktivni potencijal. Taj broj konačnih folikula predstavlja ženinu ovarijsku rezervu. Smanjenje ovarijske rezerve klinički se ne očituje simptomima te se nažalost uočava prekasno, stoga je određivanje ovarijske rezerve dio rutinske pretrage u žena kod obrade neplodnosti. Značajan rizik smanjenja ovarijske rezerve imaju žene starije od 35 godina, žene koje su primale kemoterapiju i/ili radioterapiju te one žene koje su imale ginekološke operacije.

Izravan način mjerenja ovarijske rezerve još uvijek ne postoji pa se zbog toga koristimo biljezima ovarijske rezerve za neizravnu procjenu. U biljege ovarijske rezerve ubrajamo hormonske markere, ultrazvučne markere i dinamičke testove koji nam daju uvid u ženino stanje. Hormonski biljezi podrazumijevaju anti-Müllerov hormon (AMH), folikulostimulirajući hormon (FSH), estradiol ( $E_2$ ) i inhibin B. Ultrazvučni markeri uključuju mjerenje broja antralnih folikula (AFC) te mjerenje volumena jajnika. Najčešće upotrebljavan dinamički test je klomifen-citrat dinamički test (CCCT).

AMH i AFC danas se smatraju najboljim biljezima ovarijske rezerve, a njihovim mjerenjem dobivamo najbolji uvid u stvarno stanje preostalih folikula. Ove testove je lako provesti, štoviše, AMH i AFC proporcionalno se smanjuju s godinama, a njihova mala varijabilnost unutar ciklusa čini ih boljim od drugih markera.

Unatoč tome što su trenutno najbolji markeri ovarijske rezerve, AMH i AFC još uvijek ne mogu predvidjeti ishode IVF-a, kao ni trudnoću.

**KLJUČNE RIJEČI: ovarijska rezerva, biljezi, AMH, AFC, ishodi MPO**



## **SUMMARY**

### **Anti-Müllerian hormone and antral follicle count as markers of ovarian reserve and the success of assisted reproduction methods**

Barbara Valinčić

Modern world lifestyle changes and delaying childbirth are an increasing cause of infertility among women. Women are born with a finite number of primordial follicles available for folliculogenesis and they are decreasing with age, and thus reducing a woman's reproductive potential. This number of finite follicles represents woman's ovarian reserve. Decreased ovarian reserve is not clinically manifested by symptoms and is unfortunately noticed too late. Because of that, testing a woman's ovarian reserve is a routine examination in women during infertility treatment. Women over the age of 35, women who have received chemotherapy and/or radiotherapy and women who had gynecological surgeries have a significant risk of diminished ovarian reserve. A direct method of determining ovarian reserve still does not exist so we use ovarian reserve markers for indirect assessment. Ovarian reserve markers include hormonal markers, ultrasound markers and dynamic tests that gives us insight in woman's condition. Hormonal markers are anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E<sub>2</sub>) and inhibin B. The antral follicle count (AFC) and measurement of ovarian volume are considered to be ultrasound markers. The most commonly used dynamic test is the clomiphene-citrate dynamic test (CCCT).

Today, AMH and AFC are considered the best ovarian reserve markers and by measuring them we acquire the best insight of remaining follicles. These test are easy to perform as AMH and AFC decrease proportionally with age and their small intracycle variability makes them better than other markers.

Despite currently being the best ovarian reserve markers, AMH and AFC still cannot predict IVF outcomes nor pregnancy.

**KEY WORDS: ovarian reserve, marker, AMH, AFC, IVF outcome**

## 1. UVOD

Neploidnost je jedan od rastućih problema u svijetu pa tako i u Hrvatskoj. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira pojam neploidnosti kao bolest ženskog ili muškog reproduktivnog sustava koju karakterizira nemogućnost začeća nakon najmanje 12 mjeseci redovitih, nezaštićenih spolnih odnosa. (1)

O učestalosti neploidnosti govori činjenica da u svijetu 10-15% parova nailazi na probleme neploidnosti. U Hrvatskoj je oko 80.000 neploidnih parova ili onih smanjene plodnosti. (2)

Neploidnost možemo podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna neploidnost je ona u kojoj kod para nije zabilježena prethodna trudnoća, dok je sekundarna neploidnost ona do koje dolazi nakon barem jedne prethodne trudnoće. (3) Većinu neploidnih parova točnije je smatrati subfertilnim jer će do začeća doći, no za to će biti potrebno duže vrijeme. (4)

Fekundabilnost je pojam kojim opisujemo vjerojatnost začeća tijekom jednog menstrualnog ciklusa žene. U mladih zdravih parova ona iznosi 20-25%. Pojam fekunditet označava sposobnost rađanja živog novorođenčeta u jednom menstrualnom ciklusu. Fekunditet ovisi o dobi žene, ali i muškarca. Najviši je u dobi između 20. i 30. godine života u slučaju žena, a u muškaraca i do 40. godine života. I fekundabilnost i fekunditet smanjuju se starenjem. (5)

Čovjekova plodnost u blagom je, ali trajnom padu. Razlozi tome mogu biti medicinske te nemedicinske etiologije. Medicinski uzroci neploidnosti mogu biti posljedica patologije u žena (50%), muškaraca (40%), zajedničke patologije (10%) te nepoznate etiologije u 10% slučajeva. Nemedicinski čimbenici u današnjem svijetu dolaze do sve

većeg i većeg izražaja, a u njih ubrajamo socijalne i ekonomske čimbenike te različite svjetonazore. Sve više do izražaja dolazi odgoda rađanja zbog promjene stila života i zaposlenja žena. Te promjene stajališta doveli su nas do demografske tranzicije koja je posljedica niske fertilitnosti. (2,3)

Prosječna dob žena Europske unije tijekom rađanja prvog djeteta u blagom je porastu. 2013. godine prosječna dob majki za vrijeme prvog poroda iznosila je 28,8 godina, dok je prosječna dob majki 2021. godine iznosila 29,7 godina. U Hrvatskoj je prosječna dob majke prilikom prvog poroda iznosila 29,3 godine u 2021. godini. (6)

Povezanost dobi žene i neplodnosti dobro je poznata. O tome govore podaci da je u mlađih žena od 25 godina učestalost neplodnosti 8%. Starenjem taj postotak raste pa je u žena u dobi od 35 do 39 godina učestalost neplodnosti 21,9%. U žena starijih od 40 godina života taj postotak iznosi čak 28,7%, a češći su i spontani pobačaj te su spolne stanice žena lošije kvalitete od onih u mlađih žena. (4)

Starenjem žene smanjuje se i njena ovarijska rezerva. Ovarijska rezerva predstavlja konačan broj oocita dostupnih za folikulogenezu. Procjena ovarijske rezerve bitan je pokazatelj za procjenu i liječenje neplodnosti, posebno u starijih žena. (7)

Ovaj rad opisat će i predstaviti biljege ovarijske rezerve, a poseban osvrt bit će na anti-Müllerovom hormonu (AMH) te broju antralnih folikula (AFC) kao najpouzdanijim biljezima ovarijske rezerve. Također će biti prikazana povezanost između određivanja biljega ovarijske rezerve i njihove uspješnosti u metodama medicinski pomognute oplodnje (MPO).

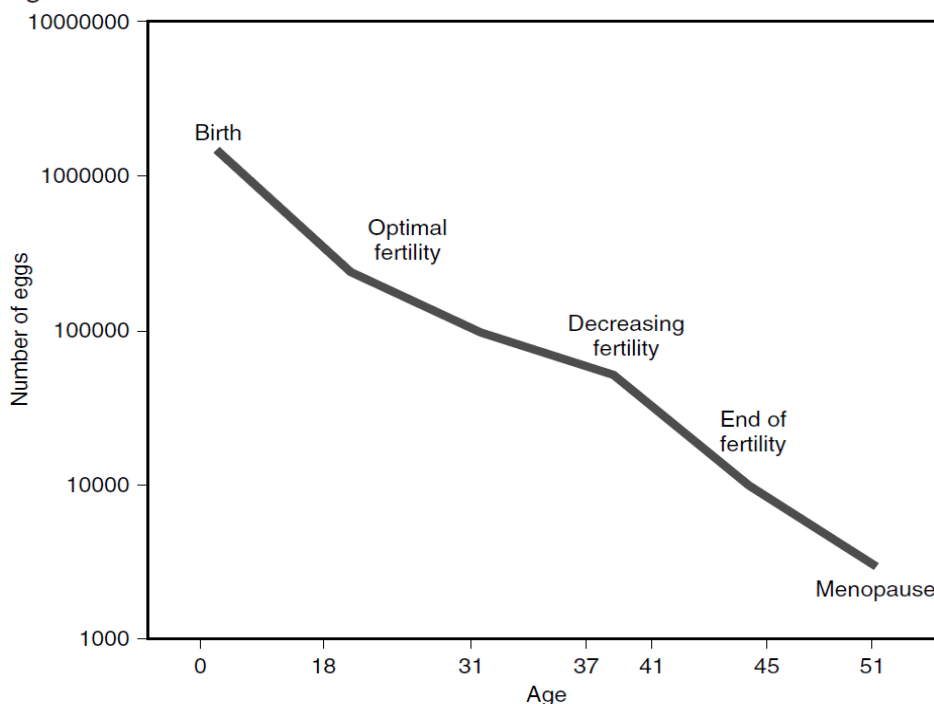
## 2. REPRODUKCIJSKO STARENJE JAJNIKA

Osnovna zadaća jajnika proizvodnja je zdrave oocite, zrele ženske spolne stanice spremne za oplodnju koja će omogućiti razvoj embrija te implantaciju u endometrij uterusa tj. maternice. Za razliku od zdravih muškaraca čije se spole stanice (spermiji) ciklički proizvode do u duboku starost, žene se rađaju s konačnim brojem oocita koje mogu ući u folikulogenezu i dovesti do razvoja zrele spolne stanice. Od tog trenutka pa nadalje folikuli se samo troše i ne mogu se više obnavljati i stvarati. Taj konačan broj dostupnih oocita predstavlja ovarijsku rezervu žene. (7)

Oocite nastaju iz spolnih prastanica (primordijalnih spolnih stanica) još u ranom embrionalnom razdoblju (3. tjedan trudnoće). Nastaju u dorzalnog endodermu žumanjčane vreće te tijekom embrionalnog razvoja migriraju do kore jajnika ameboidnim kretanjem. Tijekom te migracije, one se neprestano mitotički dijele i pretvaraju se u oogonije ili primordijalne jajne stanice. Svaku oogoniju okružuje sloj epiteloidnih granuloza stanica. Jajnu stanicu okruženu s jednim slojem granuloza stanica nazivamo primordijalni folikul. (8) Primordijalni folikuli množe se i razvijaju od 16. do 24. tjedna intrauterinog života. U tom periodu najveći je broj primordijalnih folikula, a on u oba jajnika iznosi od 6 do 7 milijuna ovisno od žene do žene. Od sredine intrauterinog života pa sve do menopauze dolazi do trajnog smanjenja i degeneracije folikula što nazivamo atrezija folikula. Do najveće atrezije tj. gubitka folikula dolazi pred sam porođaj. Jajnik novorođene djevojčice sadrži 1 do 2 milijuna folikula. Atrezija se nastavlja dalje pa tako djevojka pred pubertet ima oko 300.000 folikula. (3) Za vrijeme čitavog reproduktivnog života žene, koji traje od 13. do 46. godine života (ovaj period varira od žene do žene) samo 400 do 500 primordijalnih folikula sazrije do zrelog

folikula koji izbacuje svoje jajašce (ovulira) dok stotine tisuća jajašaca postaje atretno i propada. Na kraju reproduktivnog razdoblja žene, kada nastupi menopauza, u jajnicima ostaje tek nekoliko primordijalnih folikula koji nemaju sposobnost ovuliranja, no i oni s vremenom degeneriraju. Menopauzu uzrokuje iscrpljenje jajnika. (8)

Figure 15-2



**Na slici 1.** možemo vidjeti kako plodnost žena opada sa starenjem te kako se u jajnicima smanjuje broj folikula koji mogu ovulirati. (9)

Svi ovi navedeni prirodni procesi dovode do smanjenja ovarijske rezerve u žena zbog gubitka nedominantnih primordijalnih folikula apoptozom, u manjem postotku zbog ovulacije (do kraja ženinog reproduktivnog života oko 99,9% folikula prelazi u atreziju, a samo 400-500 folikula ovulira). (3) Unutar populacije nailazimo na različite stope

apoptotičkog gubitka oocita. Gubitak oocita nije konzistentan i razlikuje se od žene do žene. Danas se vjeruje da je ženino reprodukcijsko i dobno starenje genetički predodređeno rođenjem. (4) Upravo ta činjenica ukazuje na to da biološka starost jajnika žene ne mora pratiti njenu kronološku starost. Snižena ovarijska rezerva (DOR) jedan je od poznatih rastućih uzroka neplodnosti, posebno u žena starije životne dobi.

Određivanjem biljega ovarijske rezerve možemo predvidjeti stadije reproduktivnog starenja žene uključujući i tranziciju u menopauzu, a time i prijelaz iz plodnosti u subfertilitet i konačno u neplodnost. Određivanje biljega ovarijske rezerve postalo je standard u obradi neplodnog para i procjeni uspješnosti MPO. Brojne studije su pokazale da određivanjem ovarijske rezerve u žena smanjujemo troškove liječenja neplodnih žena te nam pomažu u odabiru najbolje metode MPO-a. (10)

### **3. OVARIJSKA REZERVA (OR)**

Za definiranje kvalitete i kvantitete primordijalnih folikula jajnika žene u bilo kojoj kronološkoj dobi koristimo termin ovarijska rezerva. Ovarijska rezerva neizravna je mjera ženine reproduktivne dobi. (11) Ženin reproduktivni potencijal predviđa se procjenom kvalitete i broja preostalih oocita u jajniku te je u svrhu toga uveden pojam ovarijska rezerva, a dobro su poznati i biljezi kojima se ona određuje. (12)

Ovarijsku rezervu definiramo kao broj i kvalitetu oocita koje su u bilo kojem trenutku u mogućnosti proizvesti dominantan folikul u kasnoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa u bilo kojoj životnoj dobi žene. (7) Idealan test za određivanje ovarijske rezerve trebao bi biti lak za izvođenje, lako ponovljiv, a rezultati testa lako bi trebali razlučiti koja žena ima normalnu, a koja smanjenu ovarijsku rezervu. (13) Budući da ne postoji serumski marker kojim bismo direktno izmjerili broj primordijalnih folikula, za indirektnu procjenu ovarijske rezerve koristimo različite hormonske i ultrazvučne markere te dinamičke testove. (14) Nažalost, ni jedan marker ovarijske rezerve nije idealan, no ipak su neki biljezi točniji pokazatelji ovarijske rezerve od drugih te ako se kombiniraju mogu nam dati dobar uvid u ovarijsku rezervu žene. (15)

#### **3.1. Ovarijsko starenje u žena**

Dobro je poznato da se žene rađaju s konačnim brojem oocita koje se nakon rođenja više ne mogu stvarati, a njihov broj se smanjuje starenjem zbog atrezije folikula. Iz te činjenice proizlazi zaključak da je starenje žene rizičan čimbenik za smanjenje

ovarijske rezerve. Dokazana je intrinzična varijabilnost među ženama i smanjenja broja primordijalnih folikula u korteksu jajnika. (16)

O varijabilnosti ovarijskog starenja među ženama govori činjenica o relativno širokom dobnom intervalu u kojem žene mogu ući u menopauzu. Menopauza u žena nastupa kada se broj primordijalnih folikula u jajniku smanji ispod 1000. Do menopauze najčešće dolazi u dobi između 40. i 50. godine života. (17)

Do značajnog pada fekundabilnosti žene dolazi za vrijeme ranih 30-ih godina života, a značajno rapidniji pad bilježimo kod žena poslije navršene 37. godine života. Ovaj pad fekundabilnosti proizlazi iz povezanosti niskih stopa začeća i aneuploidije u jajnim stanicama starijih žena. (4) Učestalost aneuploidnih jajnih stanica u mlađih žena iznosi 22-24%, dok u starijih žena u dobi između 35 i 39 godina ta učestalost iznosi više od 50%. U žena starijih od 40 godina 90% oocita kromosomski je abnormalno. Upravo su ove činjenice razlog sve veće neplodnosti do koje u žena dolazi zbog starenja, razlog veće učestalosti i rizika od spontanih pobačaja te slabog uspjeha liječenja neplodnosti starijih žena.

Zbog navedenih razloga opravdano je testirati ovarijsku rezervu u pacijentica starijih od 35. godine života, kod obiteljske pojavnosti prijevremene menopauze, žena koje su imale ginekološke operacije, koje su bile zračene i/ili primale kemoterapiju, kod prijašnjih slabih odgovora na stimulaciju ovulacije, ako žena ima povišen rizik za hiperstimulaciju te kod žena neobjašnjene neplodnosti. (2)



### **3.2. Normalna ovarijska rezerva**

Nakon stimulacija ovulacije egzogenim gonadotropinom kod žene možemo procijeniti je li njena ovarijska rezerva normalna na temelju broja dobivenih oocita. Za ovarijsku rezervu kažemo da je normalna ako nakon stimulacije u žene dobijemo 8 do 12 folikula te ako nakon nje folikularnom punkcijom prikupimo odgovarajući broj zdravih oocita. (2,18)

### **3.3. Smanjena ovarijska rezerva (DOR)**

Žena može imati normalne i redovite menstruacijske cikluse s ovulacijom, a imati lošiji odgovor na stimulaciju jajnika u odnosu na neku drugu ženu iste ili približno iste dobi zbog smanjenog broja folikula u jajniku. Za takvu ženu kažemo da ima smanjenu ovarijsku rezervu (DOR) ili u težem slučaju može se raditi o primarnoj ovarijskoj insuficijenciji (POI). Smanjena ovarijska rezerva najčešće je posljedica starenja žene, no u nekim se slučajevima povezuje s pušenjem, genetičkim poremećajima, operacijama na jajnicima te uz kemoterapiju i/ili zračenje zdjelice. (4)

Smanjena ovarijska rezerva može označavati fiziološko (posljedica starenja) ili patološko smanjenje primordijalnih folikula uz redovite menstrualne cikluse.

Dobro je poznato da je smanjena ovarijska rezerva jedan od mogućih uzroka neplodnosti u žena, povezana s lošim odgovorom na indukciju ovulacije egzogenim gonadotropinom te lošijim postotkom uspješnosti ciklusa in vitro fertilizacije (IVF). (10)

Ako želimo kod pacijentice dokazati i potvrditi da ima DOR, mora zadovoljiti dva od tri Bologna kriterija, a to su: starija životna dob ( $\geq 40$  godina starosti) ili neki drugi rizični

čimbenik (prijane ginekološke operacije, zračenje i/ili kemoterapija, endometrioza...), prethodan slab odgovor na stimulaciju jajnika (<4 oocite) i abnormalni testovi ovarijske rezerve (AFC <5-7 ili AMH <1,1 ng/mL). (19)

U idućem poglavlju detaljno će biti opisani biljezi s kojima indirektno mjerimo ovarijsku rezervu u žena.

## **4. BILJEZI OVARIJSKE REZERVE**

Tijekom posljednjeg desetljeća brojna su istraživanja rađena u svrhu pronalaska biljega s kojima bi neizravno izmjerili i procijenili ovarijsku rezervu u žena. U polju reproduktivne medicine sve se veći značaj pridodaje procjeni biljega ovarijske rezerve zbog njihove dijagnostičke i prognostičke važnosti u pronalasku uzroka neplodnosti i svrhu liječenja. (10)

Danas u biljege ovarijske rezerve ubrajamo hormonske i ultrazvučne markere te dinamičke testove kojima indirektno procjenjujemo ovarijsku rezervu žene. (7) Ovarijsku rezervu možemo procijeniti i biopsijom jajnika, no ona se rutinski ne radi u dijagnostici neplodnosti. Trenutno ne postoji ni jedan genski marker za procjenu ovarijske rezerve u populaciji. (20)

### **4.1. Hormonski biljezi**

Smanjeni broj folikula u jajnicima te smanjena receptivnost izravno utječe na proizvodnju i razine hormona u krvi. Iz tog razloga mjerenjem i određivanjem hormona možemo dobiti dobar uvid u ovarijsku rezervu žena. U hormonske biljege ovarijske rezerve ubrajamo: bazalnu razinu FSH (folikulostimulirajućeg hormona) i estradiola, AMH (anti-Müllerovog hormona) te inhibina B. (2)

#### 4.1.1. Anti-Müllerov hormon (AMH)

Anti-Müllerov hormon (AMH) je homodimerni glikoprotein vezan disulfidnom vezom, a pripada u skupinu proteina transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). (21) U žena reproduktivne dobi proizvode ga granulosa stanice rastućih folikula jajnika i luče ga u folikularnu tekućinu i cirkulaciju. U žena čiji su jajnici uklonjeni, razina serumskog AMH je nemjerljiva. (22)

Proizvodnja i lučenje AMH u žena započinje već za vrijeme fetalnog razvoja počevši svoje lučenje u 36. tjednu gestacije te se njegovo lučenje nastavlja tijekom cijelog reproduktivnog razdoblja žene. Koncentracija hormona nakon rođenja raste i pozitivno korelira sa životnom dobi žene sve do 16. godine starosti, a daljnji rast hormona u serumu nastavlja se do 25 godine starosti kada je koncentracija AMH u serumu najviša upravo u periodu kada je ženina plodnost najveća. Iako razina AMH kreće rasti već nakon rođenja, njegova koncentracija je u krvi nedetektibilna sve do nastupa puberteta. Kada razina hormona u serumu dosegne svoju najveću koncentraciju u krvi, na toj razini se zadržava neko vrijeme, a onda počinje padati kako kreće i pad ženinog reproduktivnog potencijala. Nakon 25. godine starosti možemo uočiti negativno koreliranje AMH sa životnom dobi. Koncentracija u serumu pada kako se iscrpljuje ovarijska rezerva sve do nastupa menopauze kada razina AMH doseže nemjerljive koncentracije u krvi. (14, 22)

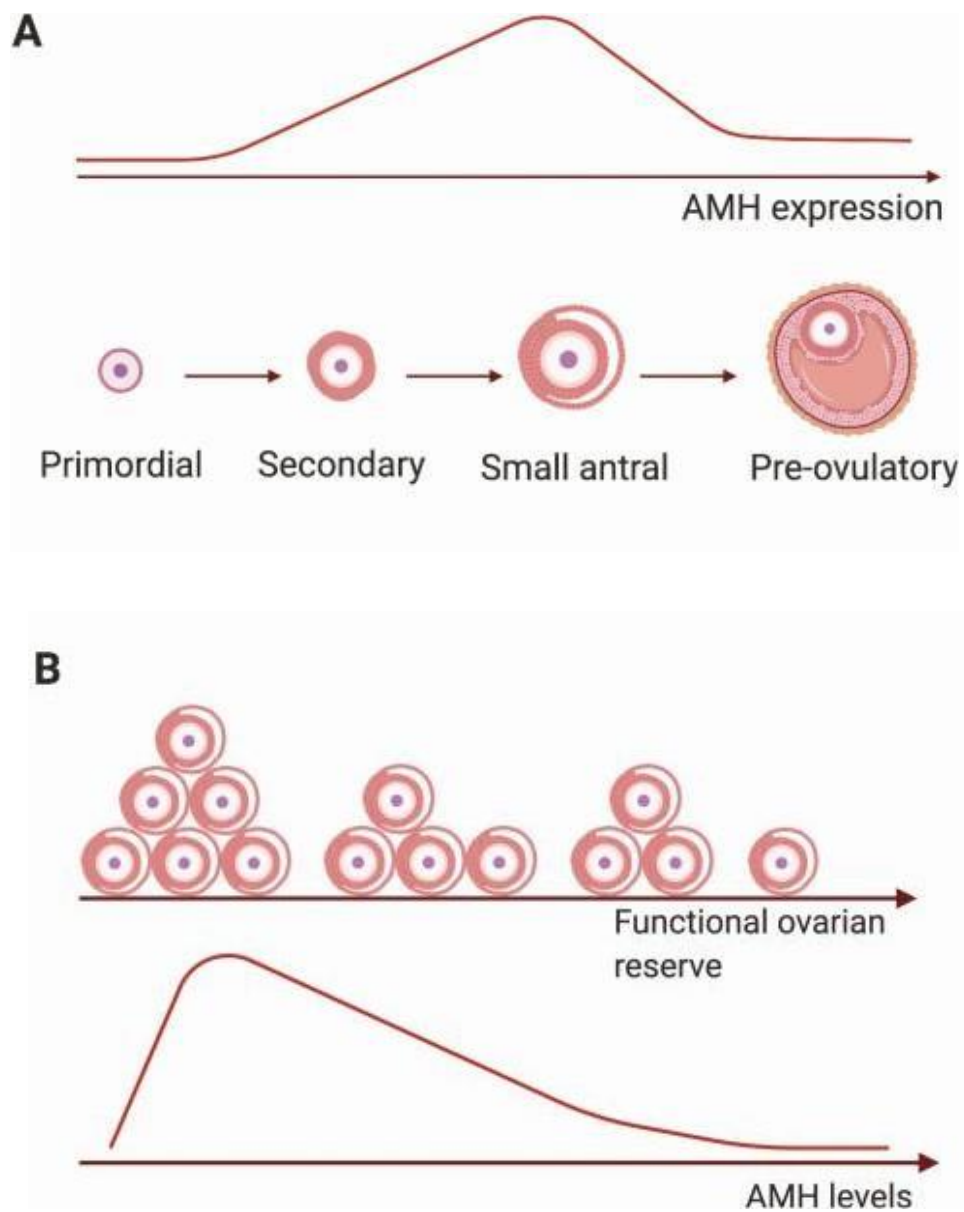
Ekspresija anti-Müllerovog hormona najveća je u sekundarnim, preantralnim te malim antralnim folikulima koji sežu do 4 mm u promjeru. Njegova ekspresija prestaje kada antralni folikuli dosegnu veličinu 4-8 mm u promjeru. Uloga AMH na razini jajnika je da parakrino smanjuje regulaciju folikulogeneze posredovanu FSH-om i selektivno

inhibira oslobađanje FSH. Njegova sistemska uloga u organizmu još uvijek nije jasna i poznata, ali izgleda da djeluje samo na reproduktivne organe. (23)

Budući da rastući folikuli luče AMH sve dok ne dosegnu veličinu i razvojni stadij u kojem mogu biti odabrani kao dominantan folikul ovisno o FSH selekciji, a njegova je koncentracija mjerljiva pa je upravo iz tih razloga AMH smatra jednim od markera ovarijske rezerve. Broj rastućih folikula koji mogu biti regrutirani iz rezerve primordijalnih folikula reflektira ukupan broj primordijalnih folikula. Svi biljezi ovarijske rezerve zapravo su indirektna mjera za ovarijsku rezervu jer ne postoji ni jedan marker kojim bismo direktno mogli izmjeriti točan broj primordijalnih folikula u jajnicima. Mjera za broj rastućih folikula trenutno je najbolja alternativa za procjenu stvarne ovarijske rezerve žene. Brojna istraživanja pokazala su da razine AMH usko povezane s brojem rastućih folikula te da se oboje smanjuju s kronološkom dobi žene. (14)

Kako bismo jasno razlikovali broj preostalih primordijalnih folikula u jajnicima (OR) i broj rastućih folikula u jajnicima te kako ne bi došlo do pogrešne interpretacije, uveden je novi pojam, funkcionalna ovarijska rezerva (FOR). FOR predstavlja broj folikula koji su u promjeru između 2 i 5 mm od kojih je jednom suđeno da bude odabran FSH hormonom i da ovulira. Ti folikuli proizvode AMH i zapravo serumska razina AMH reflektira FOR i pravilnije je reći da je AMH biljeg funkcionalne ovarijske rezerve. (24)

Novije studije pokazale su da u mlađoj životnoj dobi razine serumskog AMH predstavljaju mjeru samo za FOR i da je povezanost FOR-a i OR u mlađoj životnoj dobi slaba. Tek u starijoj životnoj dobi pravilno je reći da su serumske razine AMH biljeg OR-a jer se veza FOR-a i OR s godinama povećava. (14)



**Slika 2. A)** Prikaz pada serumske koncentracije AMH kako folikuli u jajnicima sazrijevaju. **B)** Vidljivo je smanjenje razine AMH kako se FOR troši dok s godinama dolazi do atrezije folikula u jajnicima. (14)

Ovisno o željenoj ravnoteži osjetljivosti i specifičnosti testa rezultati testa mogu varirati, ali tipična koncentracija serumske razine AMH koju povezujemo sa smanjenom ovarijskom rezervom iznosi <1 ng/mL. Prag za menopauzu niži je od najmanje mjerljive vrijednosti koja se drugim testovima može mjeriti, a iznosi manje od 0.1 ng/mL. Žene u kojih je koncentracija AMH <0.5 ng/mL usko povezujemo s dobivanjem 3 ili manje folikula za prikupljanje nakon stimulacije ovulacije. Koncentracije 0.5-1 ng/mL ukazuju nam na slabiji odgovor na stimulaciju od normalne, a kod normalnog odgovora na stimulaciju ovulacije očekujemo koncentracije 1-3.5 ng/mL. Žene u kojih detektiramo vrijednosti AMH >3.5ng/mL imaju povišen odgovor na stimulaciju i veći rizik za nastanak sindroma hiperstimulacije jajnika (OHSS). Vrijednosti AMH koje smatramo normalnima variraju ovisno o dobi žene pa su tako normalne vrijednosti AMH u žena u 30-ima oko 2 ng/mL, 1.5 ng/mL u žena s 35 godina te oko 1 ng/mL u žena koje su u dobi od 40 godina.

Koncentraciju AMH određujemo imunohistokemijski iz uzorka krvi. Prednost ovog testa je u tome da mjerene vrijednosti AMH možemo smatrati valjanima bilo kojeg dana i za vrijeme bilo koje faze menstrualnog ciklusa žene za razliku od ostalih hormonskih biljega OR. Vjeruje se da mjerene razine AMH ostaju valjane čak i nakon supresije jajnika do koje dolazi zbog pušenja, oralne hormonske kontracepcije, GnRH agonista te trudnoće budući da se primarno luči prije nego se pojavi odgovor na FSH. Iako navedeni faktori utječu na razine AMH, njihov učinak na koncentraciju hormona je reverzibilan i nakon uklanjanja tih faktora razina hormona vraća se na svoju normalnu razinu na kojoj je bila i prije pojave tih faktora (npr. razina AMH se već nakon 7 dana prestanka uzimanja oralnih kontraceptiva vraća na staru razinu). (23)

Činjenica da se razina AMH hormona može mjeriti bilo kojeg dana menstrualnog ciklusa dovela je do široko rasprostranjene zablude o tome da je koncentracija hormona u krvi statična. Iako su razine hormona u perimenopauzalnih pacijentica relativno stalne, to nije slučaj i u pacijentica s normalnom ovarijskom rezervom. U žena s redovitim menstrualnim ciklusom dolazi do vidljive fluktuacije u razini hormona ovisno o fazi ciklusa u kojem se žena nalazi pa su tako serumske razine hormona u folikularnoj fazi ciklusa više od razine u lutealnoj fazi menstruacijskog ciklusa. No, čak i unatoč fluktuacijama za vrijeme menstrualnog ciklusa te varijacije nisu toliko značajne, a ni dovoljno velike da bi ženu s normalnom ovarijskom rezervom kategorizirale kao da ima sniženu ovarijsku rezervu. (23,25)

Testovi za određivanje razine AMH sve se više razvijaju, a osjetljivost i specifičnost testova sve je veća. Ona može varirati između 70 i 90%. (2) Trenutno postoji 20-ak različitih imunohistokemijskih testova kojima je moguće odrediti koncentraciju AMH u serumu od 14 različitih proizvođača. Tehnike se sve više razvijaju, no problem AMH kao biljega ovarijske rezerve i dalje ostaje, još uvijek ne postoji internacionalna standardizacija za mjerenje AMH. (26)

Uzevši sve u obzir čini se da AMH ima manje ograničenja od ostalih testova ovarijske rezerve te se danas zajedno s AFC smatraju najboljim biljezima ovarijske rezerve. Kada postoje razlike u AFC i AMH najčešće se radi o tome da ni jedan nije točniji biljeg, nego da žena ima manju rezervu od žena s normalnom OR, ali je ipak ne možemo kategorizirati kao da ima DOR. Ono što AMH čini boljim biljegom od ostalih je činjenica da je njegovo lučenje neovisno o lučenju gonadotropina što ne vrijedi za FSH i inhibin B. Upravo iz tog razloga, njegovu koncentraciju mjerimo neovisno o fazi ciklusa. Osim toga, novije studije pokazale su da broj primordijalnih folikula ima jaču povezanost s



AMH nego s drugim hormonskim biljezima, a njegov pad u koncentraciji uočava se ranije nego kod drugih biljega te nam ranije može ukazati na to da kod žene dolazi do smanjenja njene ovarijske rezerve. Uza sve to, AMH pokazuje stanje ovarijske rezerve u žena koje su zračene, koje su primale kemoterapiju te kod onih koje su imale prijašnje operacije na jajnicima. Sve ove navedene karakteristike čine AMH boljim pokazateljem ovarijske rezerve od drugih, što su pokazale i brojne studije. (4, 23)

#### **4.1.2. Inhibin B**

Inhibin B je heterodimerni glikoprotein kojega luče granuloza stanice folikula. (13) Proizvode ga preantralni i antralni folikuli jajnika. Uloga mu je da izravno potiskuje lučenje FSH iz hipofize. Iako inhibin A pripada istoj skupini proteina, njega ne smatramo biljegom ovarijske rezerve kao što smatramo inhibin B jer se luči iz dominantnog folikula, a ne iz ranijih folikularnih stadija pa zbog toga ima manju prediktivnu vrijednost od inhibina B. (23) Inhibin B pripada u biljege ovarijske rezerve, no njegova koncentracija u krvi ne pokazuje postepeni pad vezan uz starenje žene, već njegove koncentracije u krvi počinju padati 4 do 5 godina prije menopauze. (27)

Koncentracija inhibina B se određuje imunohistokemijski iz uzorka krvi. Njegova koncentracija u krvi varira ovisno o fazi menstrualnog ciklusa, a najviša je od rane do srednje folikularne faze te za vrijeme ovulacije. U žena s redovitim menstrualnim ciklusima, uglavnom se njegova razina mjeri 3. dana ciklusa. (23)

Budući da je inhibin B kasni pokazatelj smanjenog broja folikula, ne smatra se dobrim biljegom za praćenje ovarijske rezerve. (27)

### 4.1.3. Folikulostimulirajući hormon (FSH)

Folikulostimulirajući hormon (FSH) je glikoproteinski hormon kojeg proizvodi adenohipofiza. Njegova uloga je promoviranje napredovanja antralnih folikula u dominantni folikul. Estrogen, inhibin i aktivin povratnom spregom utječu na pulsatilno lučenje GnRh iz hipotalamusa koji određuje hipofiznu ekspresiju FSH hormona. FSH bio je prvi hormon povezan s ovarijskim starenjem u žena. (23) Koncentracija FSH raste 10-ak godina prije nastupa menopauze i ukazuje na smanjenu ovarijsku rezervu. (27) Određivanje i mjerenje razine FSH jedan je od najproučavanijih i najstarijih biljega OR u subfertilnih žena. (9)

U ranoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa razine inhibina B i estradiola su najniže te je tako i supresija FSH najniža pa tada možemo mjeriti koncentraciju bazalnog serumskog FSH. (28) Njegova razina se uglavnom mjeri 3. dana menstrualnog ciklusa, a njegovu razinu određujemo imunohistokemijski iz uzorka krvi. WHO karakterizira koncentraciju FSH  $>16,7$  mIU/mL kao visoku,  $>11,4$  mIU/mL kao umjereno visoku, a koncentraciju  $<10$  mIU/mL kao normalnu. (23) Žene s normalnom ovarijskom rezervom proizvode dovoljnu količinu estradiola i inhibina B iz granuloza stranica folikula u jajnicima da održavaju razinu FSH u normalnom rasponu. No, kako se broj folikula u jajnicima s godinama smanjuje, razine inhibina B i estradiola su nedovoljne da suprimiraju lučenje FSH pa tako njegova koncentracija u ranoj folikularnoj fazi ostaje povišena. Preporučeno je kod mjerenja razine FSH mjeriti i razinu estradiola radi točnije interpretacije dobivenih rezultata. (28)

Razine FSH variraju svaki menstrualni ciklus te od žene do žene što ukazuje na njegovu limitiranu prediktivnu vrijednost kao markera ovarijske rezerve. Na to ukazuju sljedeće činjenice: 75% žena u dobi od 40 do 44 godine imaju normalne razine FSH

koje su manje od 10 mIU/mL, dok 50% žena u dobi od 45 do 49 godine života ima tek blago povišenu koncentraciju FSH manju od 11mIU/mL iako je ovarijske funkcija u toj dobi već izrazito smanjena u većine žena. (23) Povišena razina bazalnog serumskog FSH specifičan je marker ovarijske rezerve, no nedovoljno osjetljiv. (12)

U današnje vrijeme i AMH i AFC pokazuju bolju prediktivnu vrijednost ovarijskog odgovora od FSH tako da je njegov značaj kao markera ovarijske rezerve sve manji i manji. No, njegovo određivanje i mjerenje u serumu i dalje ima značaj kod procjene perimenopauzalnog statusa, hipergonadotropnog i hipogonadotropnog hipogonadizma te centralnog preuranjenog puberteta. (23)

#### **4.1.4. Estradiol (E2)**

Estradiol je steroidni hormon koji nastaje aromatizacijom androgena, a luče ga jajnici. On potiče razvoj ženskog reproduktivnog sustava i dojki te sekundarnih spolnih značajki, a ima i ulogu u normalnom odvijanju menstrualnog ciklusa žene. Proizvode ga granulosa stanice folikula jajnika, a znak je rasta i sazrijevanja folikula. Smanjenjem broja primordijalnih folikula u jajnicima smanjuje se njegovo stvaranje i koncentracija u serumu. (8)

Najviše koncentracije estradiola za vrijeme menstruacijskog ciklusa su za vrijeme kasne folikularne faze i u sredini lutealne faze ciklusa. Kako starenjem dolazi do smanjenja ovarijske rezerve tako se i dužina trajanja menstrualnog ciklusa skraćuje. To znači da je i folikularna faza ciklusa kraća zbog smanjenja negativne povratne sprege koju uzrokuju folikuli regrutirani u prošlom ciklusu pa zbog toga razina

estradiola počinje rasti bliže menstruaciji. Upravo iz tog razloga povišena razina E2 3. dana menstrualnog ciklusa može ukazivati na DOR.

Povišena koncentracija estradiola (>60-80 pg/mL) može zbog svog supresivnog učinka na FSH dovesti do lažno normalne razine FSH hormona u krvi. S druge strane vrijednosti <20pg/mL 3. dana menstrualnog ciklusa mogu biti povezane s normalnom funkcijom jajnika, hipogonadotropnim hipogonadizmom ili zatajenjem jajnika. (23)

Povišenu koncentraciju estradiola možemo uočiti i kod žena s endometriozom, kod dobroćudnih i zloćudnih novotvorina jajnika, kod PCOS (sindroma policističnih jajnika) i još brojnih drugih bolesti tako da je kod interpretacije razine estradiola u krvi potrebno biti oprezan. (29)

Razinu estradiola određujemo imunohistokemijski iz uzorka krvi. Uzorak se uglavnom uzima 3. dana menstrualnog ciklusa, zajedno s uzorkom za određivanje FSH iz krvi, a u žena s amenorejom bilo koji dan ciklusa.

Isti rizični čimbenici koji mogu promijeniti razinu FSH u krvi djeluju i na estradiol, a to su: medicinski uvjeti, glukokortikoidi, spolni steroidni hormoni, klomifen, letrozol, GnRH antagonisti i agonisti te drugi lijekovi. (23)

Ove činjenice dovode nas do zaključka da razinu estrogena i FSH nikad ne mjerimo samu nego u kombinaciji zbog njihovog međusobnog učinka te točnije interpretaciju u svrhu procjene ovarijske rezerve. Osim toga, ovaj biljeg ovarijske rezerve nije niti dovoljno osjetljiv niti specifičan za točnu procjenu ovarijske rezerve. (12) Uza sve to, studije su pokazale da nema prediktivnu vrijednost u predviđanju stopa trudnoće te nisku prediktivnu vrijednost slabog odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije. (13)

## 4.2. Ultrazvučni biljezi

Ultrazvučne metode također nam mogu pomoći pri procjeni ovarijske rezerve. U ultrazvučne biljege ovarijske rezerve ubrajamo: broj antralnih folikula (AFC) te mjerenje volumena jajnika. Oba test izvode se transvaginalnim ultrazvukom. (13)

### 4.2.1 Broj antralnih folikula (AFC)

Za vrijeme ženinih reproduktivnih godina života samo 400-tinjak jajnih stanica ovulira što čini manje od 1% svih primordijalnih folikula s kojima je žena rođena. Po ciklusu se na jednu ovulaciju utroši čak 660-ak folikula. Pošto su zbivanja u jajniku dinamična, u njima možemo pronaći folikule u raznim razvojnim stadijima. Zbroj antralnih folikula koji u promjeru iznose 2-10 mm čine rezervu (pričuvu) antralnih folikula koju nazivamo broj antralnih folikula (AFC – eng. antral follicle count). (2)

Ti folikuli koji neće biti odabrani kao dominantan folikul okruženi su tekućinom i moguće ih je vidjeti ultrazvučno prije regresije. (23) Broja antralnih folikula (AFC) određujemo transvaginalnim ultrazvukom (UZV) u ranoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa žene (2.-5. dan nakon menstruacije). (28) Mjerenje AFC je jednostavno za izvođenje, a rezultati su odmah poznati. Varijabilnost između različitih menstrualnih ciklusa nije dovoljno značajna da se uzima u obzir pri interpretaciji nalaza, no ipak postoji. (30)

Što više takvih antralnih folikula nađemo UZV-čnim mjerenjem, to je vjerojatnije da je ovarijska rezerva žene normalna te da će bolje odgovoriti na stimulaciju ovulacije. AFC pokazuje vrlo usku korelaciju s primordijalnom folikularnom zalihom u jajnicima na histološkoj analizi te ga se smatra vrlo dobrim biljegom OR. Brojne studije i istraživanja

još uvijek pokušavaju dokazati odražava li smanjena ovarijska folikularna zaliha kvalitetu oocita jednako dobro kao i njihov broj, dokazano je da žene sa smanjenom ovarijskom rezervom imaju manji broj antralnih folikula, nego one koje imaju normalnu ovarijsku rezervu i plodnost. (23)

Normalnim izmjerenim brojem antralnih folikula smatramo između 8 i 10 te kod takvog AFC očekujemo normalan odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije. Kod AFC >14 možemo očekivati prenaplašen odgovor na stimulaciju, dok je  $\geq 20$  folikula rizičan čimbenik za OHSS. (31, 32) Ako UZV-om pronađemo u žena  $\geq 12$  folikula treba posumnjati na sindrom policističnih jajnika jer je to upravo jedan od Rotterdamskih kriterija za dijagnozu ovog sindroma. (33) Niskim AFC-om smatramo ukupno 3-6 antralnih folikula i kod takvog AFC pretpostavljamo da će žena imati slab odgovor na stimulaciju ovulacije. (4)

Jedna od limitacija AFC je ta što UZV-om ne možemo razlikovati normalne od atretičnih folikula u jajniku pa tako lažno možemo dobiti bolji nalaz, nego što on zapravo jest. (27) Osim toga AFC ima slabu prediktivnu vrijednost ishoda trudnoće. (28)

AFC je prihvaćen kao prediktor broja preostalih folikula u jajnicima i kao biljeg ovarijske rezerve jer ima najbolji potencijal predviđanja slabog odgovora jajnika na stimulaciju jajnika u usporedbi s volumenom jajnika, inhibinom B, bazalnim serumskim koncentracijama FSH i estradiola 3. dana menstrualnog ciklusa. No, različiti standardi UZV opreme u različitim centrima ukazuju na to da AFC ne treba biti jedini biljeg OR, a najbolju korelaciju pokazuje s AMH. (34)

#### 4.2.2. Volumen jajnika

Volumen jajnika mjerimo transvaginalnim UZV-om, a mjeri se u tri ravnine. Te izmjerene vrijednosti uvrštavamo u formulu za elipsoid ( $D1 \cdot D2 \cdot D3 \cdot \pi/6$ ). Neki ultrazvučni softveri mogu ga izračunati automatski. (13)

Ovarijskom volumenu pridonosi slijedeće: folikuli, stroma te vaskularizacija. Njihov udio razlikuje se od žene do žene, njenoj individualnoj dobi, različitim ginekološkim stanjima koja uzrokuju promjene na jajniku te ovisno o fazi menstrualnog ciklusa u kojem se nalazi. (23)

Žene s volumenom jajnika  $<3$  mL povezujemo sa smanjenom ovarijskom rezervom, no njegova vrijednost je ograničena i nedovoljno osjetljiva. (2)

Volumen jajnika kasni je biljeg ovarijske rezerve zbog toga što smanjenje u njegovom volumenu uočavamo tek u doba perimenopauze, negdje oko 40-e godine života. (13)

#### 4.3. Klomifen-citrat dinamički test (CCCT)

Klomifen-citrat dinamički test je osmišljen zbog vjerovanja da neke žene mogu imati DOR unatoč „normalnim vrijednostima FSH“ (lažno negativan nalaz testa). (9) Ovaj test uključuje mjerenje koncentracija FSH i estradiola prije i nakon izlaganja klomifenu. Klomifen je selektivni modulator estrogenskih receptora (SERM), a on inhibira negativnu povratnu spregu hipotalamusa estradiolom. (23)

Test se provodi tako da žena 5. dana ciklusa krene svakog dana oralno uzimati 100 mg klomifena kroz pet dana (5.-9. dana menstrualnog ciklusa). Bazalnu razinu FSH u

serumu određujemo prvo 3. dana ciklusa, a na kraju provođenja test opet 10. dana ciklusa. Ako se 3. ili 10. dana izmjere abnormalne vrijednosti FSH možemo zaključiti da se će jajnici imati slabi odgovor na stimulaciju. (13)

CCCT učinkovito preslikava kvalitetu i kvantitetu regrutiranih oocita, no njegova prediktivna vrijednost je slaba, skup je, iziskuje puno vremena te su uočene i nuspojave vezane uz korišteni lijek. Osim toga metaanaliza pokazuje da ima jednaku ako ne i lošiju prediktivnu vrijednost od FSH tako da se danas rutinski slabo upotrebljava. (13, 34)



## 5. USPREDBA AMH I AFC

Anti-Müllerov hormon i broj antralnih folikula danas se smatraju najboljim biljezima ovarijske rezerve zbog svojih najpovoljnijih analitičkih i izvedbenih karakteristika te najbolje korelacije sa stvarnom ovarijskom rezervom. (35) Iako oba biljega imaju slične prediktivne vrijednosti ovarijske rezerve i ishoda MPO-a, danas se prednost ipak daje AMH. (36) Ovo poglavlje prikazat će prednosti i nedostatke oba ova biljega.

AFC ima vrlo dobru prediktivnu vrijednost za odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije te broj dobivenih oocita nakon same stimulacije. Njegove prediktivna vrijednost pomaže nam u donošenju odluka vezanih uz MPO te samo izvođenje tih metoda. Prednost AFC-a kao biljega ovarijske rezerve je i u tome što rezultate nakon provedene ultrazvučne metode možemo znati odmah, a broj folikula po jajniku moguće je odrediti za manje od dvije minute. Osim toga lak je za izvođenje s mogućnošću personaliziranja, a sama metoda je neinvazivna za razliku od određivanja drugih biljega ovarijske rezerve za koje je potrebno raditi venepunkciju. (36)

Jedan od glavnih nedostataka AFC je varijabilnost rezultata od operatera do operatera koji izvodi ovu metodu. Kako je metoda subjektivna, rezultati mogu varirati, a njihova varijabilnost može biti posljedica različitog iskustva i obuke samog operatera, specifične metodologije te tehnoloških resursa tj. razlučivosti UZV-a ili pak oboje. Veća varijabilnost interpretacije je uočena kod AFC, nego kod AMH. UZV uređaji s lošom kvalitetom slike mogu dovesti do pogreške u interpretiranju nalaza, posebno kod žena s cistama jajnika, fibroidima te ožiljcima od prethodnih operacija. Uz to AFC-om ponekad možemo precijeniti stvaran broj FSH-osjetljivih folikula i dobivenih oocita nakon stimulacija jer ponekad je teško razlikovati normalne folikule od atretičnih

folikula iste veličine. (36) Ta varijabilnost izraženija je u mlađih žena. Istraživanja pokazuju da je čak polovica detektiranih folikula >2mm u promjeru u mlađih žena zapravo u ranijem ili kasnije stadiju atrezije tako da kod interpretacije nalaza u mlađih žena treba pristupiti s oprezom. (37) Metoda određivanja AFC-a jest neinvazivna, no na probleme s izvođenjem nailazimo u adolescentica te onih pacijentica koje još nisu imale spolne odnose. Kod njih se transvaginalno UZV mjerenje ne provodi. (36) Značajno je još to da AFC pokazuje veću varijabilnost rezultata mjerenih različitih dana menstrualnog ciklusa te za vrijeme različitih ciklusa od AMH. (38) Iz tog razloga preporuča se određivanje AFC na početku menstrualnog ciklusa (uglavnom 3. dan ciklusa). (36)

Referentne vrijednosti AMH za pacijentice u adolescentnoj i reproduktivnoj dobi vrlo dobro su poznate. (39) Na temelju njih, određivanjem koncentracije AMH u krvi možemo dobiti dobar uvid u odgovor pacijentice na stimulaciju ovulacije te broj dobivenih oocita nakon same stimulacije. Određivanjem razine AMH stječemo dobar uvid u ovarijsku rezervu žene te nam može pomoći pri odlučivanju vrste korištene MPO, ali i u modificiranju protokola radi što bolje uspješnosti provedenih metoda. (36) Iako razina AMH varira za vrijeme menstrualnog ciklusa te je njegovo lučenje za vrijeme folikularne faze nešto više nego u lutealnoj fazi, ta varijabilnost za vrijeme ciklusa je manja nego u drugih biljega ovarijske rezerve. Upravo ta činjenica daje mu prednost nad ostalim biljezima, a njegovu koncentraciju možemo određivati za vrijeme bilo kojeg dana menstrualnog ciklusa. (25) Koncentracija AMH za vrijeme različitih ciklusa pokazuje minimalne razlike tako je to još jedna prednost ovog biljega. Osim toga, određivanje AMH je objektivna metoda određivanja ovarijske rezerve tako da promjena prilikom određivanja njegova koncentracije kod različitih operatera nema. Također ako se razina AMH određuje u nekoj drugoj bolnici, razlike u koncentraciji ne

bi trebalo biti. To mu daje prednost u odnosu na AFC. Cijena određivanja AMH također je manja u odnosu na UZV koji je potreban za određivanje AFC.

Jedan od nedostataka AMH je u tome što rezultate ne možemo znati odmah kao što je to slučaj kod AFC. Kako bismo odredili razinu AMH potrebno je i do nekoliko sati, a potrebno je i znanje kod obrade uzorka krvi te samo iskustvo pri venepunkciji. No, jedan od glavnih problema AMH kao biljega ovarijske rezerve i dalje ostaje, a to je problem standardizacije između raznih imunohistokemijskih testova koji trenutno postoje za određivanje razine AMH. To predstavlja problem kod usporedbe razine AMH određene različitim tipovima imunohistokemijskih testova. (36)

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci AMH i AFC, rađeno prema (36)

<b><u>BROJ ANTRALNIH FOLIKULA</u></b>	<b><u>ANTI-MÜLLEROV HORMON</u></b>
<b>PREDNOSTI</b>	
dobra prediktivna vrijednost odgovora na stimulaciju ovulacije i dobivenog broja oocita	dobra prediktivna vrijednost odgovora na stimulaciju ovulacije i dobivenog broja oocita
pomoć u provođenju MPO-a i odlukama liječenja	pomoć u provođenju MPO-a i odlukama liječenja
lako provođenje i mogućnost personalizacije	dobro određene referentne vrijednosti za sve dobne skupine
neinvazivna metoda	mjerenje moguće bilo kojeg dana ciklusa zbog male varijabilnosti za vrijeme menstrualnog ciklusa
brzi rezultati	mala varijabilnost u različitim ciklusima
-	bez varijacija u različitim operatera
-	niska cijena

<b>NEDOSTACI</b>	
mjerenje na početku ciklusa zbog varijabilnosti tijekom samog ciklusa	duže vrijeme potrebno za rezultate
subjektivnost i razlike u mjerenju kod različitih operatera	potrebno znanje pri dobivanju i pripremi uzorka za analizu
UZV nerazlikovanje normalnih od atrećičnih folikula	nedostatak standardizacije različitih imunohistokemijskih testova
neprijmjerena metoda za žene koje još nisu imale spolne odnose	-
veća varijabilnost između ciklusa u žena s prekomjernom težinom	-
trošak na sam UZV	-

Ova tablica zorno prikazuje sve nedostatke i prednosti AMH i AFC kao biljega ovarijske rezerve. Na temelju tablice vidimo da AMH ima manje nedostataka i limitacija, nego AFC. Upravo te navedene činjenice o obje metode nam ukazuju na to da je AMH danas ipak najbolji biljeg ovarijske rezerve. Iako ni on nije idealan, trenutno je najbolji biljeg za indirektnu procjenu ovarijske rezerve žene.

## 6. MEDICINSKI POMOGNUTA OPLODNJA (MPO)

Medicinski pomognuta oplodnja (MPO) podrazumijeva sve metode kojima se kontrolira i pomaže oplodnja jajne stanice, ali i transport gameta/zigota, implantacija te razvitak trudnoće. (3) U njih ubrajamo homologne i heterologne metode. Homologne metode liječenja su one u kojima koristimo gamete samog neplodnog para, dok su heterologne one u kojima je jedna gameta od darovatelja (darovateljica). U MPO ubrajamo: intracitoplazmatske injekcije spermija (ICSI), izvantjelesnu oplodnju (IVF – in vitro fertilizacija), intrauterinu ili intratubarnu inseminaciju (IUI, ITI) te prijenos gameta ili zigota u jajovod (GIFT, ZIFT). (40)

Godišnje se zbog neplodnosti MPO-om liječi 10 do 12 tisuća parova. Obično se na liječenje javljaju nakon 2 do 3 godine neplodnosti, a s ciljanim liječenjem se započinje tek nakon 4 godine. (2)

Žensku neplodnost učinkovito liječimo IVF-om, dok za mušku neplodnost uglavnom koristimo ICSI. Postotak uspješnosti IVF-a u 2018. u Europi je iznosio 32,1%, ali točan postotak uspješnosti MPO varira od centra do centra. Ako u to uračunamo i zamrzavanje (krioprezervaciju) i doniranje jajne stanice, taj postotak iznosi 49,6%. (41) Tako velik postotak uspješnosti MPO možemo očekivati u mlađih žena, a znatan pad postotka uspješnosti zabilježavamo u žena starijih od 38. U četrdesetim godinama postotak je izrazito mali. Žene koje navršše 44. godine i starijima preporuča se uporaba darovanih oocita mladih donorica. (2) Donirana oocita se može koristiti odmah u MPO ili može biti krioprezervirana na temperaturi  $-196^{\circ}\text{C}$  u tekućem dušiku. (3,4) IVF s doniranom jajnom stanicom od mlade plodne žene ima uspješnost i do 50%. (42)

O tome kako je smanjena ovarijska rezerva (DOR) sve veći problem govore i slijedeći podaci o postotku žena koje prolaze kroz IVF postupke s primarnom dijagnozom

neplodnosti zbog DOR-a. U Sjedinjenim Američkim Državama u 2003. godini 10% žena je išlo na IVF zbog DOR-a, u 2008. godini 14% dok je 2015. godine taj postotak žena iznosio 19%. (40)

Žene koje pristupaju IVF-u u rutinskoj obradi se mjeri ovarijska rezerva iz više razloga. Kao prvo ako u žene otkrijemo izrazito sniženu ovarijsku rezervu, možemo očekivati loše rezultate MPO-a te je potrebno razmotriti mogućnost doniranja oocite. Osim toga, na temelju biljega ovarijske rezerve možemo predvidjeti ishode stimulacije ovulacije te na temelju toga možemo prilagoditi samo izvođenje stimulacije. Uz to što nam daje uvid u stanja kada možemo očekivati smanjeni odgovor, pokazatelji su nam žena koje imaju rizike za nastanak OHSS-a. Iznimno veliku važnost ima i kod žena koje primaju kemoterapiju i/ili zračenje te žena kojima je potrebna ginekološka operacija tj. u svih žena kod kojih očekujemo pad ovarijske rezerve kako bismo procijenili stanje pacijentice. (11) Iako je FSH najviše proučavani marker OR, brojna istraživanja ukazuju na to da su AMH i AFC trenutno najbolji pokazatelji ovarijske rezerve s najvećom osjetljivošću i specifičnošću testova. (10) AMH i AFC izvrsno koreliraju međusobno i pokazuju vrlo slične vrijednosti kada radimo procjenu OR. (2)

### **6.1. Biljezi ovarijske rezerve i ishod IVF-a**

Određivanje ovarijske rezerve spada u rutinsku pripremu žene za liječenje neplodnosti i stimulaciju ovulacije. Nažalost, ni jedan od tih markera ne mogu poslužiti kao sigurni prediktor trudnoće i ishoda IVF-a, već kao prediktor odgovora na stimulaciju ovulacije. (43) Odgovor jajnika na stimulaciju može biti normalan, slab ili prenaplašen.

(2) Nedostatak AFC kao biljega OR je ta što je za njega puno teže odrediti točnu graničnu vrijednost za koju očekujem slab odgovor na stimulaciju za razliku od AMH kod kojeg je ta vrijednost poznata. (10)

**Tablica 2.** Biljezi ovarijske rezerve i procjena očekivanog odgovora na stimulaciju ovulacije, prema Šimunić: Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost (2)

<u>Očekivani odgovor na stimulaciju ovulacije</u>	<u>AMH</u> <u>pmol/L</u>	<u>AFC</u> <u>folikuli 2-10 mm</u>
NR (8-12 oocita)	8-20	10-15
LR (do 4 oocite)	4-7	5-8
VLR/NR (1 ili 0 oocita)	<4,0	<4
HR (>20 oocita)	>25	≥20

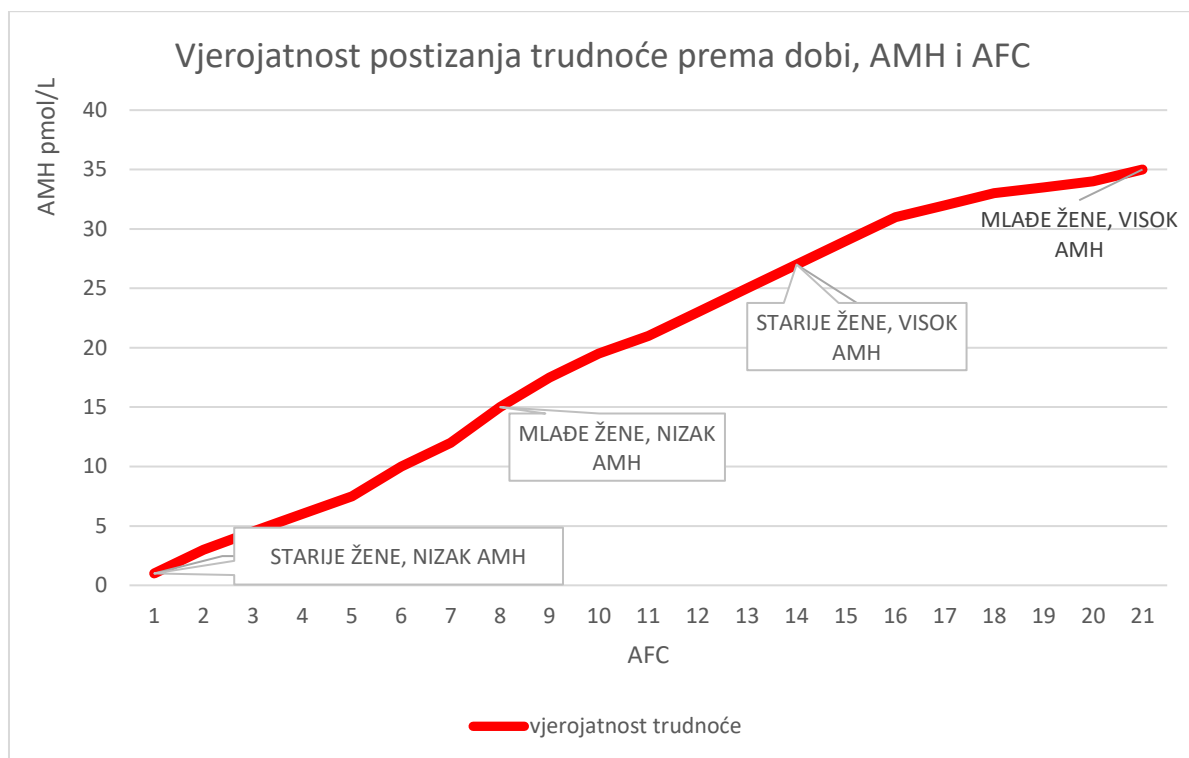
NR – normalan odgovor, LR – slab odgovor, VLR/NR – vrlo slab odgovor/ odgovor izostaje, HR – prenatlašen odgovor

U tablici 2 možemo vidjeti kakav je očekivani odgovor na stimulaciju ovulacije s obzirom na nalaze AMH i AFC u sklopu rutinske obrade neplodnosti.

Brojne studije pokazale su da unatoč dobroj prediktivnoj vrijednosti kao biljezima ovarijske rezerve, AMH i AFC ne mogu s točnošću potvrditi ishode IVF postupaka. Iz toga se da zaključiti da onda ni postotak trudnoće, a ni broj živorođene djece nakon MPO ne mogu biti određeni iz biljega ovarijske rezerve. (12)

Slika 3 prikazuje vjerojatnost postizanja trudnoće u odnosu na dob, AMH i AFC. (2) Unatoč tome što krivulja vjerojatnosti raste proporcionalno s AMH i AFC vrijednostima, dosadašnja istraživanja ne pokazuju statistički značajnu povezanost s postizanjem trudnoće. (44, 45)

**Slika 3.** Vjerojatnost postizanja trudnoće prema dobi, AFC i AMH (2)





## 7. ZAKLJUČAK

Dakle, na kraju zaključujemo da je neplodnost danas izraziti problem u svijetu te da žene zbog promjene stila života odgađaju rađanje do kasnije dobi, a ne kao što je to bilo u prošlosti. Što je žena starija, njena je plodnost manja i kvaliteta oocita je lošija te zbog toga rizik za kromosomskim anomalijama raste. Starenjem se u žena smanjuje ovarijska rezerva. Smanjena ovarijska rezerva ne daje nikakve kliničke simptome tako da se ona može otkriti tek kada žena planira trudnoću te kada naiđe na problem neplodnosti. Smanjenje ovarijske rezerve varira od žene do žene, a predodređena je i genetskim i okolišnim čimbenicima.

Još uvijek ovarijsku rezervu ne možemo mjeriti direktno, već ju procjenjujemo na neizravan način biljezima ovarijske rezerve. Biljega ovarijske rezerve ima mnogo, no ni jedan nije idealan. Trenutno najbolji biljezi ovarijske rezerve koje poznajemo jesu AMH i AFC. Njihova varijabilnost za vrijeme menstrualnog ciklusa, ali i između ciklusa je minimalna za razliku od drugih biljega. Osim toga testovi za AMH i AFC imaju veću specifičnost i osjetljivost od ostalih, a smanjenje njihove razine i broja vidimo pravovremeno kada je kod žene još moguć uspjeh s MPO. Razine ostalih biljega smanjuju se puno kasnije, kada su ishodi MPO i uspjeh već ograničeni te treba razmišljati i o donoru oocite.

Unatoč jakoj povezanosti AMH i AFC, prednost se danas daje AMH te se on smatra najboljim pokazateljem ovarijske rezerve. AMH ima manje limitacija od AFC, a trenutni problem AMH je što njegovo testiranje još uvijek nije standardizirano. Imunohistokemijskih testova ima nekoliko vrsta, a izmjerena razina AMH varira od

laboratorija do laboratorija. Iako je AMH trenutno najbolji biljeg ovarijske rezerve, potraga za idealnim markerom i dalje traje.

Premda danas dosta dobro možemo procijeniti ovarijsku rezervu žene, ovarijski biljezi nažalost još uvijek ne mogu s točnošću predvidjeti uspjeh MPO, kao ni trudnoću nakon MPO. Mogu nam dati okvirnu sliku, no odstupanja kod pojedinih žena još uvijek su izrazita pa se istražuju i drugi okolni čimbenici koji utječu na uspjeh MPO. AMH i AFC jedino mogu predvidjeti odgovor žene nakon stimulacije ovulacije.

U odnosu na svoje začetke krajem prošlog stoljeća, današnja suvremena medicina pokazuje izraziti napredak u uspješnosti MPO.

No, prostora za poboljšanje još uvijek itekako ima jer ovaj problem nije samo medicinski, već i sociološki, kulturološki pa čak i demografski.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem mentorici doc. dr.sc. Tatjani Pavelić Turudić na usmjeravanju, pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Također bih se htjela zahvaliti i svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i strpljenju tijekom cijelog mog školovanja kao i inače u životu.

## 9. POPIS LITERATURE

1. World Health Organization. Infertility [Internet.] Geneva: World Health Organization; c2023 [pristupljeno 7.6.2023.] Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
2. Šimunić V i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012.
3. Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2001.
4. Hoffman BL, Schorge JO, Halvorson LM, Hamid CA, Corton MM, Schaffer JI. Williams Gynecology. 4. izd. New York: McGraw-Hill Education; 2020.
5. Beckmann CRB, Ling FW, Herbert WNP, Laube DW, Smith RP, Casanova R i sur. Obstetrics and Gynecology. 7. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
6. Eurostat. Demography 2023 Edition [Internet.] Luksemburg: Eurostat; c 2023 [pristupljeno 8.6.2023.] Dostupno na: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/interactive-publications/demography-2023#fragment-15944082-xtpc-inline-nav-7>
7. Roudebush WE, Kivens WJ, Mattke JM. Biomarkers of Ovarian Reserve. Biomark Insights. 2008 Apr 16;3:259-268. doi:10.4137/bmi.s537
8. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija–udžbenik. 13. izd. Andreis I, Kukolja Taradi S, Taradi M, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
9. Ruben A, Schlaff WD. Reproductive Endocrinology and Infertility: The Requisites in Obstetrics & Gynecology. Philadelphia: Elsevier; 2006.
10. Grisendi V, Mastellari E, La Marca A. Ovarian Reserve Markers To Identify Poor Responders in the Context of Poseidon Classification. Front Endocrinol (Lausanne). 2019 May 8;10:281. doi:10.3389/fendo.2019.00281

11. Gupta S, Sharma D, Surti N, Kesavan S, Khanna P, Agarwal A. Ovarian Reserve Testing: systematic review of the literature. *Arch Med Sci.* 2009;5,1A: S143-S150
12. Penzias A, Azziz A, Bendikson D, Falcone D, Hansen K, Hill M i sur; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and Interpreting Measures of Ovarian Reserve: a Committee Opinion. *Fertil Steril.* 2020 Dec; 114(6): 1151-1157 doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.09.134
13. Jirge PR. Ovarian Reserve Tests. *J Hum Reprod Sci.* 2011 Sep-Dec; 4(3): 108-113 doi: 10.4103/0974-1208.92283
14. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Nov; 105(11):3361-3373 doi: 10.1210/clinem/dgaa513
15. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian Reserve. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Apr 17;1127 (1): 27-30 doi: 10.1196/annals.1434.011
16. Cedars MI. Managing poor ovarian response in the patient with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2022 Apr; 117 (4) : 655-656 doi: 10.1016/j.fertnstert.20220.026
17. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Edocr. Rev.* 2009 Aug 1; 30(5): 465-493 doi: 10.1210/er.2009-0006
18. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A Systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006 Nov/Dec; 12(6): 685-718 doi: 10.1093/humupd/dml034
19. Roque M, Haahr T, Esteves SC, Humaidan P. The POSEIDON stratification – moving from poor ovarian response to low prognosis. *JBRA Assist Reprod.* 2021 Apr-Jun; 25(2):282-292 doi: 10.5935/1518-0557.20200100

20. Wood MA, Rajkovic A. Genomic Markers of Ovarian Reserve. *Semin Reprod Med.* 2013 Nov; 31(6): 399-415 doi:10.1055/s-0033-1356476
21. Shrikhande L, Shrikhande B, Shrikhande A. AMH and Its Clinical Implications. *J Opstet Gynaecol India.* 2020 Aug 19; 70(5): 337-341 doi: 10.1007/s13224-020-01362-0
22. Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2019 Nov 21; 37(1): 89-100 doi: 10.1007/s10815-019-01622-7
23. Deadmond A, Koch CA, Parry JP. Ovarian Reserve Testing. *Endotext* [Internet]. 2022 Dec 21. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279058/>
24. Russell N, Gilmore A, Roudebush WE. Clinical Utilities of Anti-Müllerian Hormone. *J Clin Med.* 2022 Dec 4; 11(23): 7209 doi: 10.3390/jcm11237209
25. Khodavirdilou R, Pournaghi M, Rastgar Rezaei Y, Hajizadeh K, Khodavirdilou L, Javid F i sur. Does Anti-Müllerian hormone vary during a menstrual cycle? A systematic review and meta-analysis. *J Ovarian Res.* 2022 Jul 1; 15: 78 doi: 10.1186/s13048-022-01006-z
26. Li HWR, Robertson DM, Burns C, Ledger WL. Challenges in Measuring AMH in the Clinical Settings. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 May 24; 12: 691432 doi: 10.3389/fendo.2021.691432
27. Strauss III JF, Barbieri RL. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology – physiology, pathophysiology and clinical management.* 8. izd. Philadelphia: Elsevier; 2019.
28. Ulrich ND, Marsh EE. Ovarian reserve testing: A review of the options, their applications, and their limitations. *Clin Obstet Gynecol.* 2019 Jun; 62(2): 228-237 doi: 10.1097/GRF.0000000000000445

29. Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Aug 18; 13:839005 doi: 10.3389/fendo.2022.839005
30. Kesharwani DK, Mohammad S, Acharya N, Joshi KS. Fertility with Early Reduction of Ovarian Reserve. *Cureus*. 2022 Oct 15; 14 (10): 30326 doi: 10.7759/cureus.30326
31. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ i sur. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod*. 2007 Jul; 22(7): 1925-31 doi: 10.1093/humrep/dem081
32. Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007 Mar 15; 5: 9 doi: 10.1186/1477-7827-5-9
33. Smet ME, McLennan A. Rotterdam criteria, the end. *Australas J Ultrasound Med*. 2018 May 17; 21(2): 59-60 doi: 10.1002/ajum.12096
34. Amanvermez R, Tosun M. An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. *Int J Fertil Steril*. 2016 Jan-Mar; 9(4): 411-5 doi: 10.22074/ijfs.2015.4591
35. Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. *Hum Reprod Update*. 2014 Jan 8; 21(6): 698-710 doi: 10.1093/humupd/dmu062
36. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jul 3; 31(4): 486-496 doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.015

37. Broekmans FJM, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*. 2009 Jul 8; 94(3): 1044-1051 doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.040
38. Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CWN, Eijkemans MJC, Fauser BC, Broekmans FJM. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod*. 2010 Jan; 25(1): 221-227 doi: 10.1093/humrep/dep366
39. La Marca A, Broekmans FJM, Volpe A, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod*. 2009 Sep 11; 24(9): 2264-2275 doi: 10.1093/humrep/dep210
40. Taylor HS, Pal L, Seli E. *Speroff's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 9. izd. Philadelphia: Wolter Kluwer; 2019.
41. ESHRE [Internet.] Strombeek-Bever: European Society of Human Reproduction and Embryology. Fact sheets; 2022 Jan. Dostupno na: <https://www.eshre.eu/Press-Room/Resources/Fact-sheets>
42. Hacker NF, Hobel C. *Hacker & Moore's Essentials of Obstetrics and Gynecology*. 6. izd. Philadelphia: Elsevier: 2015.
43. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. *PLoS One*. 2011 Jul 15; 6(7): 220224 doi: 10.1371/journal.pone.0022024
44. Tal R, Tal O, Seifer B, Seifer D. Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015 Jan; 103(1): 119-30



45. Yao L, Zhang W, Li H, Lin W. The role of serum AMH and FF AMH in predicting pregnancy outcome in the fresh cycle of IVF/ICSI: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Feb 15; 8(2): 1755-67

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 5. prosinca 1998. godine u Bjelovaru. II. osnovnu školu Bjelovar završila sam 2014. godine. Maturirala sam 2017. godine u Gimnaziji Bjelovar. Te godine sam i upisala studij medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Aktivan sam član Studentske sekcije dobrovoljnih darivatelja krvi. Aktivno se služim engleskim jezikom u govoru i pismu, a znam i njemački jezik na osnovnoj razini.