

# Uloga anti-Müllerovog hormona u predviđanju ishoda liječenja metodama pomognute oplodnje

---

Kavur, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:105:108319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Lana Kavur**

**Uloga anti-Müllerovog hormona u predviđanju  
ishoda liječenja metodama pomognute  
oplodnje**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Dinke Pavičić Baldani, dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS KRATICA

AFC- broj antralnih folikula, engl. *antral follicle count*

AMH- anti-Müllerov hormon

ART- metode pomognute oplodnje, engl. *assisted reproductive technologies*

AUC- površina ispod krivulje, engl. *area under the curve*

BC- Bologna kriteriji, engl. *Bologna criteria*

BMI- indeks tjelesne mase, engl. *body mass index*

COS- kontrolirana ovarijska stimulacija, engl. *controlled ovarian stimulation*

DOR- smanjena ovarijska rezerva, engl. *diminished ovarian reserve*

E2- estradiol

ELISA- enzimski povezani imunosorbentni test, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ER- endoplazmatski retikulum

ESHRE - Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology*

ET- transfer embrija, engl. *embryo transfer*

ffAMH- AMH mjeren u folikularnoj tekućini, engl. *follicular fluid AMH*

FOR- funkcionalna pričuva jajnika engl. *functional ovarian reserve*

FSH- folikulostimulirajući hormon

HDGEHR- Hrvatsko društvo za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju

HR- prenatlašeni odgovor, engl. *high response*

ICSI- intracitoplazmatska injekcija spermija, engl. *intracytoplasmic sperm injection*

IUI- intrauterina inseminacija, engl. *intrauterine insemination*

IVF- in vitro oplodnja, engl. *in vitro fertilization*

LBR- stopa živorođene djece, engl. *live birth rate*

LH- luteinizirajući hormon

MPO – metode pomognute oplodnje

OHSS – sindrom hiperstimulacije jajnika, engl. *ovarian hyperstimulation syndrome*

OR- pričuva jajnika, engl. *ovarian reserve*

ORT- test pričuve jajnika, engl. *ovarian reserve test*

PGT-A - preimplantacijski genski probir na anuploidije, engl. *preimplantation genetic testing for aneuploidy, PGT-A*

PCOS- sindrom policističnih jajnika, engl. *polycystic ovary syndrome*

POSEIDON- engl. *Patient Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number*

PR – slab odgovor jajnika na ovarijsku stimulaciju, engl. *poor response*

ROC- krivulja osjetljivosti, engl. *receiver operation characteristic*

SNP- jednonukleotidni polimorfizam, engl. *single nucleotide polymorphism*

TGF- $\beta$ - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , engl. *transforming growth factor  $\beta$*

# SAŽETAK

## Uloga anti-Müllerovog hormona u predviđanju ishoda liječenja metodama pomognute oplodnje

Lana Kavur

Anti-Müllerov hormon (AMH) proizvodi se u granulosa stanicama rastućih folikula u jajniku. Njegova koncentracije mjerena u serumu visoko korelira s brojem antralnih folikula (AFC) i predstavlja pouzdan biomarker pričuve jajnika. Prednost u odnosu na druge markere ovarijske rezerve mu je visoka reproducibilnost zbog male varijacije između i unutar menstrualnih ciklusa. Odličan je prediktor kvantitativnog odgovora jajnika na kontroliranu ovarijsku stimulaciju (COS) u liječenju metodama pomognute oplodnje (MPO). Predviđa mogućnost slabog odgovora jajnika, ali i rizika razvoja ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS). Glavna klinička primjena mu je optimizacija odgovora jajnika u COS-u i smanjenje rizika nastanka OHSS, odabirom prikladnih stimulacijskih protokola i doze gonadotropina. Iako odlično procjenjuje prinos oocita, AMH se smatra slabim prediktorom stopa kliničkih trudnoća kao i stopa živorođene djece. Dokazi o mogućnosti predviđanja kvalitete oocite, kvalitete embrija te stope gubitka trudnoće su ograničeni. Ipak, zamijećena je korelacija AMH mjenenog u folikularnoj tekućini s nekim kvalitativnim ishodima liječenja MPO-om. Također, AMH bi mogao biti i indirektni prediktor nastupa preuranjene menopauze u rizičnih pacijentica. Sve veći klinički značaj ovog hormona pridonio je razvoju brojnih imunoeseja za određivanje njegove koncentracije. Do sada je usporedba vrijednosti AMH mjenenih različitim imunoesejima predstavljala problem zbog velikih varijacija u rezultatima, ali rješenje nude novi automatizirani imunoeseji. Serumski AMH danas je zlatni standard u određivanju ovarijske rezerve. U budućnosti je važno dodatno istražiti korisnost AMH u individualizaciji stimulacijskih protokola i razviti točne prediktivne modele. Također je važno raditi na uspostavi međunarodnog standarda u njegovom mjerenju te istražiti dodatne čimbenike koji utječu na serumsku koncentraciju AMH kako bi se poboljšalo tumačenje vrijednosti ovog hormona u kliničkoj primjeni.

ključne riječi: anti-Müllerov hormon, metode pomognute oplodnje, in vitro oplodnja

## SUMMARY

The role of anti-Müllerian hormone in predicting assisted reproductive technology outcomes

Lana Kavur

Anti-Müllerian hormone (AMH) is produced by the granulosa cells of the growing follicles in the ovary. Serum AMH highly correlates with the antral follicle count (AFC) and represents a reliable biomarker of ovarian reserve (OR). The advantage of AMH over other markers of the ovarian reserve lies in its high reproducibility due to the small variations in concentration between and within menstrual cycles. It is an excellent predictor of quantitative ovarian response to controlled ovarian stimulation (COS) protocols used in assisted reproductive technology (ART). AMH predicts the possibility of poor ovarian response, as well as the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. Its main clinical application is to optimize ovarian response in COS and reduce hyperstimulation risks by aiding the selection of appropriate stimulation protocols and gonadotropin doses. Although it is a great predictor of oocyte yield, AMH has a weak predictive utility regarding clinical pregnancy and live birth rates. There is also limited evidence of predicting oocyte quality, embryo quality and miscarriage rates. However, a correlation of follicular fluid AMH with some qualitative ART outcomes has been observed. AMH could also be an indirect predictor of premature menopause onset in patients at risk. The growing importance of this hormone in clinical practice contributed to the development of numerous AMH immunoassays. So far, the comparison of AMH values measured by different immunoassays has been a problem due to large variations in results. However, a solution is offered with new automated immunoassays being developed. AMH is the marker of choice in assessing ovarian reserve. In the future, its utility in the individualization of stimulation protocols could be further explored and more accurate prediction models could be developed. It is important to work on establishing an international AMH measuring standard and investigate additional factors influencing its serum concentration in order to improve the interpretation of AMH values in clinical application.

keywords: anti-Müllerian hormone, assisted reproductive technology, in vitro fertilization

## Sadržaj

Sažetak.....	
Summary.....	
1. Uvod.....	1
1.1. Povijest AMH.....	1
1.2. Fiziologija AMH.....	2
1.3. Principi kontrolirane stimulacije jajnika u MPO-u.....	4
2. Uloga AMH u predviđanju kvantitativnih ishoda liječenja MPO-om .....	6
2.1. Uloga AMH u predviđanju slabog odgovora jajnika (POR) na COS.....	6
2.1.1. Bologna kriteriji i POSEIDON klasifikacija.....	7
2.1.2. Određivanje granične vrijednosti AMH za predviđanje POR-a .....	8
2.2. Uloga AMH u predviđanju prenatrženog odgovora jajnika na COS .....	9
2.2.1. Rizici prenatrženog odgovora jajnika na COS .....	9
2.2.2. Određivanje granične vrijednosti AMH za predviđanje HR-a.....	10
3. Uloga AMH u predviđanju kvalitativnih ishoda liječenja MPO-om .....	12
3.1. Predviđanje kvalitete oocita i implantacijskih stopa embrija .....	12
3.2. Predviđanje stope kliničke trudnoće i rađanja živog djeteta .....	13
3.3. Predviđanje gubitka trudnoće .....	14
3.4. Uloga AMH u folikularnoj tekućini u predviđanju kvalitativnih ishoda liječenja MPO-om .....	15
4. Određivanje koncentracije AMH u uzorku .....	17
4.1. Vrste AMH imunoeseja .....	17
4.1.1. Usporedba različitih AMH imunoeseja .....	18
4.1.2. Zamjenjivost dvaju automatiziranih eseja u kliničkoj primjeni.....	18
4.1.3. Nedostatak međunarodnog standarda u mjerenju AMH.....	20
4.2. Čimbenici koji mijenjaju serumsku koncentraciju AMH.....	20
4.2.1. Hormonska kontracepcija .....	20
4.2.2. Indeks tjelesne mase.....	21
4.2.3. Vitamin D.....	21
5. Primjena AMH u individualizaciji kontrolirane stimulacije jajnika .....	22
5.1. Individualizacija doze gonadotropina temeljena na AMH .....	22
5.2. Biranje stimulacijskih režima baziranih na predviđenom odgovoru .....	24
5.3. Predložene smjernice za kliničku primjenu i prediktivni modeli .....	24
6. Zaključak.....	26



7. Zahvale .....	27
8. Literatura .....	28
9. Životopis.....	34

# 1. Uvod

Anti-Müllerov hormon (AMH) je glikoproteinski dimer iz obitelji transformirajućih čimbenika rasta i diferencijacije  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), kojeg proizvode granulosa stanice rastućih folikula u jajniku. Danas se smatra pouzdanim biomarkerom pričuve jajnika (engl. *ovarian reserve*, OR), pojma koji se odnosi na ukupan broj i kvalitetu folikula u jajniku te posljedičnu sposobnost ovulacije i ostvarivanja trudnoće. Glavna klinička primjena AMH je predviđanje odgovora jajnika na kontroliranu ovarijsku stimulaciju (engl. *controlled ovarian stimulation*, COS) pri liječenju pacijentica metodama pomognute oplodnje (MPO ili engl. *assisted reproductive technologies*, ART). Pored dokazane primjene u predviđanju kvantitativnih ishoda liječenja MPO-om, u vidu prinosa oocita, uloga AMH istražuje se i u kvalitativnim aspektima ishoda takvog liječenja, u vidu kvalitete oocita i embrija te stope trudnoća. Pri određivanju ovog hormona važno je u obzir uzeti i okolišne i genetske čimbenike koji utječu na izmjerene vrijednosti te samu metodu mjerenja AMH (1,2).

## 1.1. Povijest AMH

AMH otkrio je Alfred Jost 1947. kao testikularni čimbenik odvojen od testosterona odgovoran za regresiju Müllerovih cijevi. Tada se smatralo da mu je funkcija ograničena na spolnu diferencijaciju *in utero*, ali u kasnom 20. stoljeću otkriveno je da ima važnu ulogu u postnatalnoj biologiji jajnika. Važnost za MPO je zabilježena 2002. godine, a u tom je pogledu najvažnija upotreba AMH danas personalizacija doziranja gonadotropina u protokolima stimulacije jajnika čime se smanjuje rizik sindroma ovarijske hiperstimulacije (engl. *ovarian hyperstimulation syndrome*, OHSS), ali i slabog odgovora jajnika. AMH je najraniji i najsenzitivniji marker reproduktivnog starenja. Može identificirati i žene sa potencijalno smanjenom OR koje mogu razmotriti smrzavanje jajnih stanica ukoliko odgađaju trudnoću. Novije primjene AMH istražuju se u u smislu procjene dobi nastupa menopauze, dijagnosticiranja sindroma policističnih jajnika (engl. *polycystic ovary syndrome*, PCOS) i ocjenjivanju funkcije jajnika prije i nakon ginekoloških operacija ili primjene gonadotoksičnih lijekova kod pacijentica sa zloćudnim bolestima (3).

## 1.2. Fiziologija AMH

Gen koji kodira AMH nalazi se na kromosomu 19p13.3. U ranom *in utero* razvoju muškog fetusa, AMH se izlučuje iz Sertolijevih stanica testisa i potiče regresiju Müllerovih cijevi. U njegovom odsutstvu, Müllerove cijevi razvijaju se u maternicu, gornju trećinu vagine i jajovode. U ženskih fetusa počinje se lučiti od 36. tjedna gestacije. Proizvode ga granulosa stanice folikula u razvoju- primarnih, preantralnih i malih antralnih folikula te se može mjeriti u serumu (1). Serumska koncentracija AMH korelira s brojem rastućih folikula pa je zapravo ispravnije govoriti o AMH kao markeru funkcionalne rezerve jajnika (FOR), budući da opisuje bazen folikula koji rastu i potencijalno mogu ovulirati. Ukupnu ovarijsku rezervu čine broj i kvaliteta primordijalnih folikula koje se smanjuju s godinama. Ne postoji serumski marker koji direktno mjeri broj primordijalnih folikula. Međutim, iako u mlađoj reprodukcijskoj dobi AMH opisuje uglavnom FOR, u pacijentica starije reprodukcijске dobi reflektira i ukupnu OR. Kao indirektni serumski marker OR-a, AMH se mjeri već dva desetljeća. Gotovo da nije mjerljiv u novorođenačkom razdoblju, serumska koncentracija postepeno raste s nastupom puberteta, a dostiže maksimalne vrijednosti u dobi od 25 godina. Nakon 25. godine života, serumska vrijednost AMH pada različitom brzinom u različitim žena, a nekoliko se godina prije nastupa menopauze više ne registrira u plazmi. Ekspresija AMH u folikulima raste dok im dimenzije ne dosegnu 7-8 mm u promjeru i zatim oštro pada (4).

Razvoj folikula u jajnicima kreće inicijalnim regrutiranjem primordijalnih folikula koji vodi do rasta kohorte malih antralnih folikula iz kojih se odabire dominantni. Folikulostimulirajući hormon (FSH) usmjerava cikličku regrutaciju folikula u menstrualnom ciklusu. Jednom regrutirani, primarni folikuli počinju izlučivati AMH. Kada u višim stadijima razvoja folikuli postanu ovisni o FSH, ekspresija AMH se gotovo potpuno snižava i kasnije preostaje samo u stanicama kumulusa. AMH ima inhibitornu ulogu u dva stadija folikulogeneze. Prvi je inhibicija tranzicije primordijalnih folikula u zrelije stadije i regulacija broja folikula koji zaostaju u primordijalnom bazenu. Time se sprječava njihova prerana deplecija. Drugi je inhibitorni učinak na folikularnu osjetljivost na djelovanje FSH koji ima ulogu u procesu selekcije dominantnog folikula. FSH djeluje na dominantni folikul u kojemu se AMH više ne izlučuje, osim u stanicama kumulusa (1). AMH također smanjuje kapacitet enzima aromataze u granulosa stanicama rezultirajući nižom proizvodnjom estradiola (E2) u

manjim folikulima. Kada oni povećaju svoj promjer, snizi se koncentracija AMH i dolazi do porasta E2.

U ranoj folikularnoj fazi, broj antralnih folikula dimenzija 2-10 mm (engl. *antral follicle count*, AFC) i koncentracija AMH su u korelaciji. AMH ne fluktuiraju značajno tijekom ciklusa za razliku od FSH i inhibina B, jer je uglavnom određen stopom regrutacije ranih folikula u ukupnom bazenu primordijalnih folikula i ne ovisi o menstrualnom ciklusu (2). Ipak može postojati određena intraindividualna varijabilnost, prema nekim istraživanjima i do 20% u jednom ciklusu. Taj fenomen je češći u mladim žena s visokom OR, pa je time i manje klinički relevantan. Međutim, ipak se preferira mjerenje AMH u ranoj folikularnoj fazi kada se mjere i ostali hormoni poput FSH, inhibina B i E2.

Više vršne koncentracije AMH u dobi od 25 godina zabilježene su kod pacijentica iz Kine u usporedbi s pacijenticama iz Europe, ali pacijentice iz Kine imaju i brži pad AMH pa tako s 30 godina imaju 28% niži, a s 45 godina čak 80% niži AMH od Europljanki. Obrnuta situacija je zabilježena kod Afroamerikanki s nižim vršnim AMH vrijednostima i njihovim sporijim padom u usporedbi s europskim pacijenticama. Pri usporedbi ovih mjerenja, važno je uzeti u obzir i metodu određivanja AMH te ostale čimbenike koji mogu utjecati na njegovu koncentraciju u serumu (4).

U fiziologiji jajnika važan je i odnos AMH i androgena. Ako je narušen, može imati ulogu u patogenezi smanjivanja rezerve jajnika ili nastanka PCOS-a. Obje situacije mogu rezultirati neplodnošću. AMH preko svojih receptora aktivira stanice koji luče gonadotropin oslobađajući hormon (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) u hipotalamusu i tako povećava pulsatilnost i sekreciju luteinizirajućeg hormona (LH). LH povećava proizvodnju AMH u granulosa stanicama i njihova međusobna amplifikacija pridonosi nastanku PCOS-a. Povećana sekrecija AMH inhibira daljnji razvoj folikula. Inhibicijom aromataze dolazi do dodatnog nakupljanja androgena. S druge strane, ako je koncentracija androgena preniska, insuficijentni androgeni ne mogu opskrbiti jajnik za sintezu ovarijskih steroidnih hormona. U žena sa smanjenom ovarijskom rezervom (engl. *diminished ovarian reserve*, DOR) nizak AMH vodi do ubrzane potrošnje folikula. Nadomještanje androgena u žena sa DOR-om ili supresija androgena u PCOS-u mogu biti od koristi u kontroliranoj ovarijskoj stimulaciji (COS). Primjerena razina androgena je nužna u folikularnom razvoju (5).

### 1.3. Principi kontrolirane ovarijske stimulacije u MPO-u

Metodama pomognute oplodnje liječi se neplodnost jednog ili obaju partnera. U MPO ubrajaju se intrauterina inseminacija (IUI), *in vitro* fertilizacija (IVF) i intracitoplazmatska injekcija spermija (ICSI). Nakon obrade neplodnog para, odabire se što jednostavnija učinkovita metoda liječenja. Usmjeravanje na složene metode provodi se ranije, kod pacijentica starijih od 36 godina i pri onkofertilitetnim postupcima. Postupci mogu biti homolgni ili heterolgni, ovisno o podrijetlu gameta. MPO zahtijevaju primjenu kontrolirane ovarijske stimulacije (COS), iako se u određenim okolnostima mogu provoditi i u prirodnom ciklusu (6).

COS je proces definiran kao farmakološki tretman radi indukcije ili stimulacije rasta i razvoja folikula u jajniku. Ima dvije moguće svrhe. Prva je poticanje ovulacije za planiranje seksualnog odnosa ili intrauterinu inseminaciju (IUI). Druga je stimulacija razvoja multiplih folikula radi aspiracije oocita i provođenja IVF postupka (7,8). Dakle, principi stimulacije jajnika razlikuju se kod IUI u odnosu na IVF i ICSI. Kod intrauterine inseminacije željeni odgovor jajnika je razvoj jednog folikula (monoovulacija) uz eventualno jedan kodominantni folikul. U IVF/ICSI postupcima cilj je postići višestruku folikulogenezu uz optimalan razvoj 9-12 oocita.

Stimulacija ovulacije mora biti indicirana, individualizirana i kontrolirana. Prema hrvatskim kliničkim smjernicama za medicinski pomognutu oplodnju iz 2013. godine (6), sa svrhom individualizacije protokola ovarijske stimulacije koriste se parametri ovarijske rezerve: AMH i AFC. Važni podatci su i dob žene, prethodni postupci MPO-a i indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*). Čest problem je slab odgovor jajnika i niska rezerva jajnika koja se javlja s učestalošću od 10-50 % i ovisi o dobi.

Biljezi pričuve važni su za odabir protokola i doze lijekova za COS. Protokoli se razlikuju u dozama primijenjenih gonadotropina i odabiru ostalih lijekova pa tako postoje blagi i standardni protokoli, a MPO se također mogu provoditi i u prirodnom ili modificiranom prirodnom ciklusu. Za stimulaciju folikulogeneze primjenjuju se gonadotropini s početkom primjene između 2. i 7. dana ciklusa, u trajanju od 6 do 12 dana. Doza može biti 25- 400 i.j. dnevno, obično 100-225 i.j. dnevno, a odabir ovisi velikim dijelom o biljezima OR. Primjenjuju se također i lijekovi za supresiju endogenog LH, a to su agonisti i antagonisti GnRH. Oni se mogu primjenjivati svakodnevno ili kao depo-pripravci. Za konačno dozrijevanje oocita koristi se humani korionski gonadotropin (hCG) u dozi 5000-

10000 i.j. Agonisti GnRH poput triptorelina u dozi 0,1 mg- 0,2 mg subkutano mogu se također koristiti za dozrijevanje oocita u ciklusima u kojima se koriste antagonisti GnRH, a sa svrhom izbjegavanja ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma. U takvim se protokolima, zbog, neadekvatne luteinske faze izbjegava vraćanje zametaka, embrio transfer, već se svi dobiveni zameci zamrznu. Adjuvantni lijekovi u stimulaciji ovulacije mogu biti metformin, dehidroepiandrosteron (DHEA), hormon rasta, heparin, aspirin i kortikosteroidi, ali njihova učinkovitost u smislu povišenja stope živorođene djece, nije dokazana u randomiziranim studijama (6). Danom ovulacije (aspiracije oocita) počinju se primjenjivati lijekovi za pomoć žutom tijelu koji se daju 5-10 tjedana. Primjenjuje se progesteron, vaginalno, intramuskularno ili subkutano, odnosno didrogesteron *per os*. U posebnim se indikacijama dodaje i E2. Danas je primjena hCG-a kao pomoći žutom tijelu uglavnom napuštena, zbog povećanog rizika nastanka OHSS-a. Kod primjene hCG-a, rani testovi trudnoće mogu biti lažno pozitivni jer hCG ostaje u cirkulaciji do 10 dana.

Standardni protokol može uključivati dugu odnosno kratku primjenu agonista GnRH ili primjenu antagonista GnRH po fiksnom ili fleksibilnom protokolu (6). Protokoli s GnRH antagonistima smatraju se boljim izborom za pacijentice s očekivanim normalnim odgovorom jajnika, a poglavito za one s očekivanim jakim odgovorom, zbog jednake učinkovitosti uz istovremeni manji rizik nastanka OHSS-a. Kod žena s očekivanim slabim odgovorom na stimulaciju, snaga preporuke je jednaka za primjenu protokola s GnRH agonistima ili antagonistima (7,9).

Posebni protokoli provode se kod visokog rizika razvoja OHSS-a. Na taj rizik upućuju: vrijednosti AMH u cirkulaciji > 30 pmol/L, AFC > 20, prethodno zabilježen OHSS i vrijednosti E2 u cirkulaciji > 4000 pg/ mL. Kod pacijenata s visokim rizikom za nastanak OHSS-a primjenjuju se niže doze gonadotropina (preporučeno oko 100 IU), dodatak metformina, zamjena hCG-a kao okidača finalne maturacije oocita s GnRH agonistom uz *freeze-all* postupak ili odgoda primjene hCG-a uz prestanak stimulacije u trajanju od 1 do 5 dana do zadovoljavajućeg pada E2 (engl. *coasting*). To je pogotovo korisno u pacijentica s dijagnosticiranim PCOS-om i tendencijom prenaplašenog ovarijskog odgovora (engl. *high response*, HR).

Nepotrebno velike doze gonadotropina ne postižu bolji uspjeh IVF-a. Optimalno je prikupiti 9-12 oocita, koje su i visoko euploidne. Doza folitropina ne bi trebala prelaziti 400 i.j. niti kod žena s predviđenim slabim odgovorom (engl. *poor responders*, PR) (6). Prema novijim istraživanjima, preporučena doza gonadotropina ne prelazi niti 300 i.j. dnevno kod PR-a (7,10). U svim protokolima uspjeh je bolji uz GnRH agoniste ili antagoniste u

usporedbi s primjenom samih gonadotropina. Radi inhibicije endogenog FSH i sinkronizacije antralnih folikula može se provoditi i predpostupak primjenom oralne hormonske kontracepcije prije samog ciklusa IVF-a. Preporuke o primjeni i doziranju fertilitetnih lijekova u Republici Hrvatskoj donosi Hrvatsko društvo za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju (HDGEHR) (6).

## **2. Uloga AMH u predviđanju kvantitativnih ishoda liječenja MPO-om**

### **2.1. Uloga AMH u predviđanju slabog odgovora jajnika (POR) na COS**

Već je 2002. godine otkrivena poveznica serumske koncentracije AMH i odgovora jajnika na stimulaciju gonadotropinima (11). U brojnim je studijama potvrđeno da žene s većim brojem jajnih stanica dobivenih aspiracijom imaju veći AMH (12–14). Niska ovarijska rezerva, odnosno slab odgovor jajnika na stimulaciju ovulacije, jedan je od ključnih problema u liječenju metodama pomognute oplodnje. Pacijentice s POR-om ukupno imaju niže stope trudnoće u usporedbi s pacijenticama normalnog odgovora jajnika iste dobi i istog indeksa tjelesne mase. Etiopatogenetski bi u podlozi mogle biti deplecija ovarijskih folikula, uznapredovala endometrioza, kromosomske alternacije, operacije i zdjelične priraslice, metaboličke, autoimune i enzimske bolesti (15). Predviđanje odgovora na COS bitno je pri savjetovanju pacijenata i postavljanju realističnih očekivanja glede mogućeg odustajanja od postupka, dužeg trajanja primjene terapije i manjih stopa trudnoće. Do nedavno, ključni je problem pri interpretaciji rezultata studija bio nedostatak globalno prihvaćene definicije POR-a. Moguće definicije bile su suboptimalan broj dominantnih folikula ili prikupljenih oocita ili pak potreba za odustajanjem od ciklusa (3). Različite *cut-off* vrijednosti AMH u predviđanju POR-a bile su zabilježene u različitim istraživanjima pa su tako Nelson i suradnici (16) ustanovili su da je optimalna *cut-off* vrijednost AMH 0,7 ng/mL uz senzitivnost od 75% i specifičnost 91%, dok je jedna druga studija je ocijenila optimalnom vrijednost AMH od 1,36 ng/mL sa senzitivnošću 75,5 % i specifičnošću 74,8 % (17,18).

### 2.1.1. Bologna kriteriji i POSEIDON klasifikacija

U zadnjem desetljeću proces dijagnosticiranja POR-a pokušao se standardizirati razvitkom Bologna kriterija (BC), a zatim i POSEIDON klasifikacije. Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE) je donijelo Bologna kriterije kako bi se smanjila heterogenost u dijagnosticiranju POR-a. Ti kriteriji zahtijevali su da budu prisutna barem dva od navedenih čimbenika: uznapredovala dob pacijentice  $\geq 40$  godina, prethodni POR na stimulaciju jajnika označen s  $\leq 3$  aspirirane oocite nakon konvencionalne stimulacije ovulacije i/ili abnormalni testovi ovarijske rezerve (ORT) sa AFC-om  $< 7$  ili AMH  $< 1,1$  ng/mL. U odsutstvu zadovoljenja ovih kriterija, pacijentica može biti dijagnosticirana nakon dvije epizode POR-a na maksimalnu stimulaciju. Prema ovim kriterijima bile su zabilježene konzistentno niske stope rađanja živog djeteta, ali velik problem je predstavljala heterogenost pacijentica čak i unutar BC populacije. Subpopulacije pacijentica imale su i različite prognoze, koje su poglavito ovisile o dobi.

Zato su razvijeni kriteriji POSEIDON grupe (Patient Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number) (15). Klasifikacija predlaže podjelu pacijentica u četiri skupine, temeljene na kvantitativnim i kvalitativnim parametrima. To su dob i očekivana stopa aneuploidije, markeri OR-a: AFC i/ili AMH te prethodni odgovor ako je pacijentica već bila podvrgnuta COS-u. Uveden je i novi marker za uspjeh u liječenju MPO-om, a to je za pacijenticu specifičan minimalan broj potrebnih oocita kako bi imala barem 1 euploidni embrij za tranfer (engl. *embryo transfer*, ET). Prema ovim kriterijima razvijen je i *online* kalkulator za pomoć u procjeni broja potrebnih oocita za POSEIDON marker uspjeha.

POSEIDON skupine 3 i 4 pripadaju očekivanom POR-u, dok skupine 1 i 2 neočekivanom POR-u. Pacijentice iz skupina 1-4 predstavljaju polovicu svih pacijentica koje zatraže liječenje MPO-om. U skupinu 4 očekivanog POR pripada 55% pacijentica. To su pacijentice u dobi od 35 godina i starije uz AFC  $< 5$  i/ili AMH  $< 1,2$  ng/mL. Skupina 3 obuhvaća 10 % pacijentica. One su mlađe od 35 godina uz AFC  $< 5$  i AMH  $< 1,2$  ng/mL. U današnje vrijeme, veći se broj žena odlučuje na kasniju trudnoću pa i do 76% pacijentica pripada grupi 4.

U „neočekivanim“ POR skupinama 1 ( $< 35$  godina) i 2 ( $\geq 35$  godina) pacijentice imaju AFC  $\geq 5$  i AMH  $\geq 1,2$  ng/mL, ali im je nekog razloga prikupljeno  $< 4$  oocite ili suboptimalnih 4-9 oocita, nakon standardne stimulacije ovulacije. Teorija za suboptimalan odgovor kod



ovih pacijentica je moguće postojanje polimorfizama (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) gonadotropina FSH i/ili LH ili receptora za gonadotropine (15).

### 2.1.2. Određivanje granične vrijednosti AMH za predviđanje POR-a

Meta-analizom 28 istraživanja ustanovljeno je kako je AMH bolji prediktor POR-a nego dob. Vrijednosti površine ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) u predviđanju POR-a za AMH i dob bile su 0,78, odnosno 0,61. Kombinacijom obje varijable u toj analizi nije stvoren bolji prediktivni model. (12) Problem u određivanju granične vrijednosti AMH za dijagnozu POR-a do sada je bio u korištenju različitih mjernih esejja za AMH i posljedično neusporedivih vrijednosti tog hormona u različitim istraživanjima. Međutim, taj se problem nastoji riješiti novim automatiziranim esejima koji imaju mnogo veću preciznost od prethodnih manualnih. Poboljšano mjerenje AMH je dovelo do mogućnosti da se odredi donji prag koncentracije pri kojoj bi se s velikom sigurnošću moglo predvidjeti koja će pacijentica imati ograničen ili nikakav odgovor na maksimalnu stimulaciju ovulacije. Poboljšana mjerenja novim esejima koji registriraju niže koncentracijske raspone AMH otvaraju mogućnosti za savjetovanje pacijentica sa vrlo niskom ovarijskom rezervom, odnosno niskim vrijednostima AMH u cirkulaciji.

Provedeno je istraživanje s ciljem da se pokuša odrediti minimalna koncentracija AMH u cirkulaciji pri kojoj je moguće postignuti klasične kriterije za primjenu hCG-a kao okidača ovulacije (barem 3 folikula  $\geq 17\text{mm}$  na dan primjene hCG-a). Mjerenje je izvedeno uz pomoć potpuno automatiziranog Elecsys AMH esejja tvrtke Roche Diagnostics koji može detektirati AMH pri koncentraciji 0,07 pmol/L. Zaključeno je da je vrijednost AMH od 4 pmol/L prediktivna za razvoj manje od tri zrela folikula (sa stopom lažno pozitivnih žena od 11%) odnosno mali broj dobivenih oocita (sa stopom lažno pozitivnih pacijentica od 12%). U svim mjerenjima AMH je bio usporedive prediktivne vrijednosti s AFC-om, međutim imao je bolju prediktivnu moć u promatranju broja dobivenih jajnih stanica. Stopa živorođene djece (engl. *live birth rate*, LBR) za žene s AMH  $<4$  pmol/L iznosila je 5,7% po započetom ciklusu. Smatra se da jedno mjerenje bazalnog AMH nije razlog da se pacijentici uskrati liječenje, pa čak ni ako je mjereno novim osjetljivim esejem. Vrijednost AMH u predviđanju POR-a ipak postoji, jer se parovima može pružiti više informacija o tome kolika je vjerojatnost da će MPO postupak rezultirati trudnoćom. Za točniji zaključak o ulozi AMH u predviđanju POR-a potrebno je učiniti istraživanja o kumulativnoj stopi živorođene djece po jednom ciklusu

(19). Kumulativna stopa trudnoća/živorođene djece po ciklusu označava broj trudnoća/živorođene djece koji se postiže iz svježeg ciklusa.

Ustanovljeno je da čak i žene s vrlo niskim AMH, ispod 0,16 ng/mL, imaju stopu rađanja po ciklusu od 9,5%, premda je stopa odustajanja od stimulacije ovulacija kod takvih žena bila visoka i iznosila je 54%. (20) Također, u još jednom istraživanju čak 23,5% žena s nedetektabilnim razinama AMH, ali mlađih od 40 godina, zatrudnjelo je nakon IVF postupaka (21). Sukladno navedenom, AMH može pomoći u predviđanju slabog odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije, međutim, nikako ne može biti osnova za uskraćivanje provođenja MPO postupka.

## **2.2. Uloga AMH u predviđanju prenatlaženog odgovora jajnika na COS**

### **2.2.1. Rizici prenatlaženog odgovora jajnika na COS**

Prenatlaženim odgovorom jajnika (engl. *high response*, HR) na stimulaciju ovulacije smatra se prikupljanje  $\geq 15$  oocita aspiracijom ili pak odustajanje od ciklusa zbog prekomjernog broja folikula (22). Oko trećina žena podvrgnutih IVF postupcima ima pretjeran odgovor na stimulaciju ovulacije. Prenatlaženi odgovor jajnika može rezultirati nižom vjerojatnošću trudnoće, slabijom kvalitetom embrija ili odustajanjem od ciklusa (2). Također je povezan s razvojem ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS), koji može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija s potrebom za hospitalizacijom i intenzivnom skrbi. Moguć je razvoj venske tromboembolije ili višestrukog zatajenja organa i izravnog ugrožavanja života pacijentica. Blagi i umjereni oblici OHSS-a mogu se javiti u 15-20% svih ciklusa COS-a, dok se teški oblik pojavljuje u 1-3% njih (1). Specifični čimbenici rizika za OHSS uključuju mlađu dob, niži BMI, PCOS i prethodno zabilježen razvoj OHSS-a (23). Prepoznavanje ovih čimbenika rizika je važno prije započinjanja stimulacije ovulacije jer je individualni odabir, uglavnom niže od standardne doze gonadoprina, primarni preventivni čimbenik. Blagi oblik OHSS-a može se manifestirati kao nadutost i blaga bol u abdomenu, uz prisutno povećanje veličine jajnika  $< 8$  cm. Umjereni OHSS karakteriziran je veličinom jajnika 8-12 cm, umjerenim bolovima i mučninom uz moguće povraćanje te ultrazvučni dokaz ascitesa. Teški OHSS se prezentira klinički vidljivim ascitesom, ponekad hidrotoraksom ,

oligurijom, hematokritom većim od 45%, hipoproteinemijom i veličinom jajnika obično iznad 12 cm (24).

### 2.2.2. Određivanje granične vrijednosti AMH za predviđanje HR-a

Važnost AMH u predviđanju izraženog odgovora jajnika na stimulaciju istraživana je u brojnim studijama. U meta-analizi provedenoj na 4 786 žena, predložen je prediktivni model za pretjeran odgovor jajnika na COS koji uzima u obzir serumske koncentracije AMH, AFC i dob. Prema modelu, ROC (engl. *receiver operation characteristic*) regresijskom analizom ustanovljeno je da je zbirna prediktivna vrijednost tih parametara prikazana AUC (engl. *area under the curve*) vrijednošću od 0,85. Slična točnost dobivena je i upotrebom samo AMH i AFC-a. Zaključeno je kako su AMH i AFC vrlo dobri prediktori HR-a. AUC vrijednost za AMH bila je 0,81, a za AFC 0,79. Također je zaključeno da oba parametra imaju nisku prediktivnu vrijednost za nastanak trudnoće nakon IVF-a (AUC vrijednosti 0,5, odnosno 0,55) (14,25). Različita istraživanja na velikom broju ispitanica zabilježila su relevantne vrijednosti AMH u predviđanju HR-a. U jednom je istraživanju *cut-off* od 3,36 ng/mL (24 pmol/L) mjeren Diagnostic System Laboratories imunoesejem predvidio razvoj OHSS-a uz senzitivnost od 90,5% i specifičnost 81,3 % (26). Danas se vrijednosti AMH koriste se pri određivanju početne doze gonadotropina i predviđanju broja jajnih stanica dobivenih aspiracijom. U predviđanju broja dobivenih oocita mogu se koristiti nomogrami (27).

U brojnim istraživanjima o povezanosti HR-a i povišene serumske koncentracije AMH prijavljene su osjetljivosti između 0,57 i 0,93 i specifičnosti između 0,62 i 0,96 pri različitim *cut-off* vrijednostima abnormalnog testa. Pokazano je da je AMH bolji prediktor pretjeranog odgovora na stimulaciju ovulacije u odnosu na dob, BMI, bazalni FSH ili inhibin (26,28,29). Smatra se da AMH ima sličnu prediktivnu vrijednost kao i AFC (29).

Dva istraživanja koja su koristila GnRH agonistički, odnosno antagonistički protokol, predložila su *cut-off* vrijednost AMH od 15 pmol/L (2,10 ng/mL) u predviđanju HR-a koristeći AMH „Gen 2“ ELISA (Beckman-Coulter) i DSL AMH ELISA imunoeseje (16,30). Ta je vrijednost validirana u istraživanju učinjenom na 149 žena mlađih od 44 godine upotrebom automatiziranog Elecsys1 AMH imunoeseja. Značajne razlike primijećene su kod žena slabog, normalnog i izraženog odgovora i to u broju folikula prije aspiracije, broju dobivenih oocita i pojavi OHSS-a ( $p < 0,001$ ). AUC vrijednost za AMH u predviđanju HR-a

iznosila je 82,1% (95% interval pouzdanosti (CI): 72,5%–91,7%). Uz *cut-off* vrijednost AMH od 15 pmol/L, osjetljivost u predviđanju visokog odgovora bila je 81,3%, a negativna prediktivna vrijednost (NPV) bila je 96,6% u isključenju HR-a (24).

Za određivanje *cut-off* vrijednosti za pojavu HR-a, korištene su usporedne studije vrijednosti AMH kod pacijentica s PCOS-om i onih bez PCOS-a. Tako je jedno istraživanje na 246 pacijentica utvrdilo u skupini pacijentica bez PCOS-a graničnu vrijednost od 4,85 ng/ml (34,6 pmol/L) sa specifičnošću od 89,7 % i osjetljivošću od 85,7% za HR. U skupini s PCOS-om *cut-off* vrijednost bila je 6,85 ng/mL (48,9 pmol/L) s osjetljivošću od 66,7 % i specifičnošću od 68,7%(31).

Određivanje AMH je prediktivno i za sam AFC. U multicentričnom istraživanju ispitivala se vrijednost Elecsys AMH imunoeseja u identifikaciji žena s AFC-om >15. Istraživanje je rađeno u 13 klinika za reproduktivnu medicinu u SAD-u na ženama u dobi 21-44 godine kojima je AFC određen transvaginalnim ultrazvukom, a uzorci seruma prikupljeni su između 2. i 4. dana ciklusa. U derivacijskoj kohorti od 306 pacijentica određen je optimalni AMH *cut-off* od 1,77 ng/mL (12,6 pmol/L) za AFC >15. Senzitivnost je iznosila 88,34%, a specifičnost 68,29%. AMH je prema ROC analizi imao bolju prediktivnu vrijednost za AFC nego estradiol (AUC 57,1%) ili FSH (AUC 69,7%) s AUC AMH od 85,7%. Žene s AMH vrijednostima ispod 1,77 ng/mL imale su vrlo malu vjerojatnost da će im broj malih antralnih folikula biti viši od 15. Zaključeno je kako je Elecsys esej pouzdan za određivanje OR-a i mogao bi olakšati informirano kliničko donošenje odluka za žene koje se savjetuju oko liječenja MPO-om (32).

Potrebna su dodatna istraživanja koji bi utvrdila optimalnu graničnu vrijednost AMH u predviđanju izraženog odgovora jajnika na stimulaciju ovulacije gonadotropinima, kao što je potrebna i standardizacija mjernih imunoeseja. Mogući razlog za različite predložene *cut-off* vrijednosti može biti i varijabilnost vrijednosti AMH u različitim etničkim populacijama žena. Unatoč svim nedostacima i nedorečenosti, danas se AMH zajedno s AFC smatra najtočnijim prediktorom prenaplašenog odgovora na kontroliranu ovarijsku stimulaciju.

### **3. Uloga AMH u predviđanju kvalitativnih ishoda liječenja MPO-om**

#### **3.1. Predviđanje kvalitete oocita i stope implantacije embrija**

Starenjem ženama pada broj, ali i kvaliteta oocita. Posljedična aneuploidija embrija je vodeći uzrok povišene stope spontanih pobačaja u dobi iznad 35 godina (33). Već su prve studije o povezanosti AMH i kvalitete oocita u IVF i ICSI postupcima ukazale da su niske ili visoke razine serumskog AMH povezane s manjim brojem prikupljenih oocita dobre kvalitete u odnosu na normalan raspon AMH koncentracija. Morfološki, u pacijentica niskog AMH, oocite su imale tamne središnje granulacije u citoplazmi, a od nepravilnosti kod pacijentica s visokim AMH postojale su agregacije u glatkom ER-u. Suprotno tome, nije dokazana povezanost između vrijednosti AMH i stope oplodnje, kao ni niti kvalitete embrija na razini brazdanja i izgleda blastocisti (34). Druga je studija pokazala je da vrijednosti bazalnog AMH ne stoje u korelaciji s kvalitetom embrija niti formacijom blastociste, ali su njegove vrijednosti utjecale na kvalitetu oocita, stopu fertilizacije te implantacije (35).

Novе studije ukazuju o mogućoj povezanosti serumskog AMH i stope aneuploidije embrija (3). U istraživanju La Marce iz 2017. pokazano je kako, neovisno o dobi, postoji odnos serumskog AMH i stope euploidnih blastocista dobivenih IVF i ICSI postupkom odnosno da za svaki 1 ng/mL povećanja koncentracije AMH postoji 27% veća vjerojatnost dobivanja jedne euploidne blastocite u populaciji žena u dobi od 27 do 43 godine (36). Iako je ovaj učinak zabilježen kod gotovo svih dobnih skupina, ipak Jiang i suradnici pronalaze da kod AMH vrijednosti nižih od 1,5 ng/mL postoji veći rizik aneuploidije, ali samo kod žena iznad 35 godina starosti (37). Ova zapažanja svakako ukazuju na prediktivnost AMH za rizik aneuploidije.

Kvaliteta oocita smatra jednim od glavnih čimbenika za uspješnu implantaciju. Zanimljivo je da su zabilježene značajno niže stope implantacije embrija u žena s vrijednostima AMH <1 ng/mL u serumu, i to u dobnj skupini mlađoj od 35 godina (38). Razlog niže stope implantacije embrija u žena s niskim AMH vjerojatno stoji u smanjenoj proizvodnji AMH u folikulima što dovodi do do inkompetentnosti oocita (3).

### 3.2. Predviđanje stope kliničke trudnoće i stope živorođene djece

Dob je najtočniji prediktor zanošenja kao i stope živorođene djece (engl. *live birth rate*, LBR) u liječenju MPO-om, ali joj je prediktivna točnost umjerena. U potrazi za drugim markerima ovih ishoda još je 2004. godine primijećeno da postoji značajna poveznica između serumskog AMH i ishoda IVF-a. Visoke razine AMH bile su povezane s većim brojem dobivenih zrelih oocita i embrija visoke kvalitete te višom stopom trudnoća u žena mlađih od 42 godine (39). Nađena je pozitivna korelacija oocitnog prinosa i LBR-a u svakoj dobnoj skupini žena. Zabilježen je rast stope živorođene djece ukoliko se stimulacijom ovulacije te aspiracijom dobilo do 15 oocita te postupan pad nakon 20 i više prikupljenih oocita (40). Temeljem navedenih ispitivanja, moglo bi se zaključiti, da ukoliko AMH predviđa odgovor jajnika i oocitni prinos nakon stimulacije ovulacije, također bi trebao biti i prediktor LBR-a. Nekoliko meta analiza ocijenilo je AMH vrlo slabim prediktorom stope zanošenja, stope kliničkih trudnoća i stope živorođene djece (12,41,42). U jednom retrospektivnom kohortnom istraživanju, žene s nižim AMH imale su manju vjerojatnost postizanja kliničke trudnoće, ali nije bilo razlike u stopi trudnoće u tijeku (43). U navedenoj studiji Pacheco i suradnici zaključuju da kod žena s niskim AMH koje uspiju postići transfer embrija postoji razumna vjerojatnost uspješne trudnoće, poglavito u mlađih pacijentica. Slični su zaključci dobiveni i u istraživanju Peuranpää P. i sur. koji su pokazali da niske ( $<1,0 \mu\text{g/L}$ ) ili umjerno niske ( $1,0\text{--}1,9 \mu\text{g/L}$ ) vrijednosti AMH stoje u korelaciji s nižom stopom kliničkih trudnoća (engl. *clinical pregnancy rate*, CPR) i stope živorođene djece (LBR) usporedbi sa normalnim vrijednostima ( $\geq 2,0 \mu\text{g/L}$ ) AMH. Navedeni rezultati mogu se objasniti manjim brojem oocita dobivenih aspiracijom, posljedičnim manjim brojem embrija prikladnim za embriotransfer, kao i starijom životnom dobi žena s niskim AMH. Pokazano je da žene s niskim AMH imaju jednaku vjerojatnost rađanja živog djeteta, kao i žene s normalnim AMH, kao i jednaku stopu spontanih pobačaja (44). Iz svega navedenog može se zaključiti da bi AMH mogao biti marker kvantitete, ali ne i kvalitete oocita. Zanimljivo je da su u populaciji žena koje ne liječe neplodnost, zabilježene slične stope trudnoća kod niskog i visokog AMH (45). U istraživanju Sunn i sur. dob, AMH i broj dobivenih oocita pokazani su kao nezavisni čimbenici koji utječu na stopu kliničkih trudnoća (46).

Seifer i sur. analizirali su prediktore CPR i LBR te zaključili da AMH nije kvalitetan prediktor CPR-a i LBR-a, odnosno da drugi čimbenici poput genetske kompetencije embrija, kvalitete i kvantitete spermija te receptivnosti endometrija snažnije utječu na šansu ostvarenja

trudnoće nego AMH (47). Iako je pokazana vrlo slaba povezanost između vrijednosti AMH i stope implantacije odnosno CPR-a u postupcima MPO-a, smatra se da vrijednost AMH može imati kliničku primjenu u savjetovanju pacijentica glede vjerojatnosti postizanja trudnoće, pogotovo onih sa niskom ovarijskom rezervom (41). U nedavno objavljenom istraživanju Tal i sur. pokazano je da vrijednosti AMH u cirkulaciji stoje u snažnoj korelaciji s kumulativnom stopom živorođene djece (engl. *cumulative live birth rate*, CLBR), neovisno o dobi (47).

### 3.3. Predviđanje gubitka trudnoće

Kromosomski abnormalni embriji čest su uzrok spontanih pobačaja. Kvaliteta jajnih stanica smanjuje se s dobi. Sunkara i suradnici pronašli su povezanost između broja oocita dobivenih aspiracijom i stope pobačaja u postupcima IVF-a. U navedenom istraživanju pokazano je da je u skupini pacijentica kod kojih je dobiveno 1-3 oocite aspiracijom, 20% njih imalo rane spontane pobačaje, dok je u skupini s 15 i više dobivenih oocita stopa pobačaja iznosila 13% (48). Nakon prilagodbe za dob, broj oocita je i dalje stajao u korelaciji s negativnim ishodom trudnoća, stoga je zaključeno da postoji povezanost niske ovarijske rezerve i stope spontanih pobačaja, neovisno o dobi. S obzirom da je AMH prediktor OR-a, posljedično se može zaključiti da je i prediktor spontanih pobačaja. Jedna je ranije objavljena studija zaključila da povišen rizik spontanih pobačaja postoji samo kod žena s niskom ovarijskom rezervom starije životne dobi (iznad 36 godina), dok taj rizik nije zamijećen u žena s istim vrijednostima AMH, ali mlađe reproduktivske dobi (49). Jiang i suradnici utvrdili su da postoji povezanost AMH i rizika aneuploidije u starijih žena, ali ne i mlađih žena. Suprotno tome, nedavna studija je preimplantacijskim genskim probirom na aneuploidije (engl. *preimplantation genetic testing for aneuploidy*, PGT-A) u IVF postupcima ukazala na povezanost AMH i stope euploidije blastociste, koja je bila statistički značajna samo u žena mlađih od 38 godina. Jednom kad je učinjen embriotransfer euploidnog embrija, stope biokemijske, kliničke i trudnoće u tijeku, kao i stope pobačaja, bile su usporedive u svim dobnim skupinama (49). Zaključci o ulozi AMH u predviđanju ploidnosti i stope pobačaja u različitim dobnim skupinama su kontradiktorni. Mogući razlog je provođenje istraživanja na premalim uzorcima. Ipak, može se zaključiti kako nizak AMH uistinu nosi rizik za

aneuploidiju, ali nema značajnu prediktivnu ulogu za daljnje ishode ako je transferiran euploidan embrij.

U ispitivanju AMH na 1060 pacijentica koje su postigle kliničku trudnoću nakon embriotransfera, one pacijentice koje su imale niži serumski AMH, imale su i više stope pobačaja neovisno o broju aspiriranih oocita, ali samo u dobnoj skupini starijih od 33 godine (50). Mlade žene imaju veći broj visoko kvalitetnih oocita za izbor. Kada s godinama OR postane limitirajući čimbenik, AMH ima značajniju ulogu u predikciji lošije kvalitete jajnih stanica. Obrnuta povezanost AMH i stope pobačaja prijavljena je i u prirodnim trudnoćama. Prilagođeno dobi, one žene koje su imale AMH ispod 0,4 ng/mL, imale su 2,3 puta veći rizik nastanka pobačaja u odnosu na one s normalnim vrijednostima AMH (višim od 1 ng/mL) (32). Zaključci navedene studije imali su neka ograničenja, koja se prvenstveno odnose na činjenicu da nije rađena kromosomska analiza pobačenih zametaka pa nema podataka o tome je li razlog gubitka trudnoće bila aneuploidija (33). Zaključno, može se reći da postoji povezanost niskog AMH i povećane vjerojatnosti gubitka trudnoće. Razlog može ležati u aneuploidiji, ali i promijenjenoj folikulogenezi koja utječe na implantaciju neovisno o kromosomskom statusu (3).

### **3.4. Uloga AMH u folikularnoj tekućini u predviđanju kvalitativnih ishoda liječenja MPO-om**

AMH se, osim u serumu, može mjeriti i u folikularnoj tekućini. Njegova ekspresija perzistira u stanicama kumulusa preovulatornog folikula koje mogu biti informativne i o kompetenciji oocite. Lin i suradnici istraživali su povezanost AMH sa stopom oplodnje, razvojem blastociste, kvalitetom embrija, CPR-om i LBR-om u pacijentica podvrgnutih IVF ili ICSI postupcima. Spearmanovom korelacijskom analizom zamijećeno je da su broj oocita, embrija visoke kvalitete i blastocista bili povezani s vrijednostima AMH ( $p < 0,05$ ) te da je stopa rađanja živog djeteta korelirala s vrijednostima AMH u folikularnoj tekućini (engl. *follicular fluid* AMH, ffAMH) ( $r = 0.495$ ,  $P < 0,05$ ). Stopa oplodnje označava broj oplođenih jajnih stanica od ukupnog broja aspiriranih oocita. U ovom istraživanju nije pronađena povezanost stope oplodnje i ffAMH, ali mogući je razlog tome što je folikularna tekućina za analizu dobivena iz većeg broja folikula i određena vrijednost ffAMH nije bila specifična za pojedinu oocitu. Kao embrij visoke kvalitete bio je označen onaj koji je imao 6-8 stanica trećeg dana od oplodnje ili 4-6 stanica drugog dana. Klinička trudnoća se verificirala



prisutstvom gestacijske vreće, a biokemijska trudnoća koncentracijom  $\beta$ -HCG-a višom od 50 mIU/mL (52).

Bazalni AMH, FSH, dob i AFC nisu uspješno predvidjeli CPR u IVF-u i ICSI-u, ali ffAMH jest. Prediktivna *cut-off* vrijednost ffAMH za predviđanje kliničke trudnoće bila je 1,77 nmol/L uz senzitivnost 91% i specifičnost 86% (ROC AUC 0,83). Studija je pokazala pozitivnu korelaciju bazalnog serumskog AMH, AMH mjenog 6. dana stimulacije ovulacije i ffAMH s brojem oocita dobre kvalitete i embrija dobre kvalitete. Zabilježeno je i da su samo ffAMH, stopa oplodnje i broj brazdanja zigote bili drugačiji u skupini žena koje su zatrudnile i onih koje nisu (52).

ROC analizom uspoređeni su različiti parametri predikcije CPR-a i ustanovljeno je da je jedino ffAMH imao prikladnu razinu osjetljivosti (91,2%) i specifičnosti (86,5%) (53). Ovi rezultati su indicirali da bi ffAMH mogao biti koristan marker za predviđanje razvoja blastociste i ishoda kao što su stope kliničke trudnoće i živorođene djece (51). U drugim istraživanjima zabilježeno je da je u ffAMH bio tri puta viši u oocita koje su bile oplodene nego koje nisu (52). Hattori i suradnici zabilježili su 2013. godine da su kod pacijentica bez PCOS-a više stope kliničke trudnoće prisutne pri višim koncentracijama izmjerenog ffAMH (53).

Ciepela i suradnici ustanovili su u istraživanju iz 2019. kako je ffAMH iz folikula pridruženog oociti odličan prediktor LBR-a nakon transfera pojedinačnog svježeg embrija (engl. *single embryo transfer*, SET) (55). Istraživanje je rađeno na 322 uzorka folikularne tekućine od 299 žena, a ffAMH koncentracije bile su više u oocita koje se se kasnije razvile u embrij visoke kvalitete. Viši ffAMH povećao je vjerojatnost rađanja živog djeteta (omjer šansi 1,93). AUC vrijednost za ffAMH u predviđanju LBR-a iznosila je 0,954 (specifičnost 91,7% i senzitivnost 91,2 %) (55).

Zaključeno je da visoko kompetentne humane oocite imaju u folikularnoj tekućini sastav AMH, FSH i androgena sličan kao u prirodnom ciklusu. Intrafolikularno hormonsko okruženje oocite u razvoju moglo bi biti prvi kritički indikator sposobnosti pojedine oocite da bude oplodena i razvije se u embrij. Kao *cut-off* vrijednost ffAMH određena je 4,44 ng/mL, a samo je 8% pacijentica ispod te koncentracije ffAMH imalo konačni ishod rađanja živog djeteta. Korelacija sa serumskim AMH bila je umjerena, ali uočena je autonomija ffAMH u odnosu na serumski.

Zaključak je da su AMH i FSH u folikularnoj tekućini na dan prikupljanja oocite bili povezani s kvalitetom oocite i predviđali razvoj embrija visoke kvalitete koji ima dobar implantacijski potencijal. Zabilježene su niže serumske koncentracije AMH u odnosu na ffAMH implicirajući folikularnu autonomiju. Ovi pronalasci bit će od kliničke važnosti ukoliko se proces prikupljanja i brze analize tekućine individualnih folikula uvede u praksu (54).

## 4. Određivanje koncentracije AMH u uzorku

### 4.1. Vrste AMH imunoeseja

AMH se u granulosa stanicama proizvodi kao homodimer od 140 kDa s disulfidnim vezama i u tome se prvotnom obliku zove proAMH. *In vitro* istraživanja na fetalnim testisima i staničnim linijama štakora upućuju na to da je potrebno proteolitičko cijepanje AMH nakon izlučivanja kako bi postao biološki aktivan, a pritom nastaju njegove različite izoforme. Zbog kliničke važnosti AMH mjerenja, razvijeno je u tu svrhu nekoliko imunoeseja koji su koristili različita protutijela za detekciju AMH. Trenutno često korišteni manualni imunoeseji uključuju: modificirani Gen II esej proizvođača Beckman Coulter te Ultrasensitive AMH enzim vezani imunosorbentni esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) i picoAMH imunoesej proizvođača Ansh Labs koji koriste različita antitijela od Gen II AMH imunoeseja. Imunoesej picoAMH ELISA ima poboljšanu osjetljivost u nižem rasponu koncentracija. Detektira AMH u koncentraciji od 1,3 pg/mL u usporedbi s Gen II esejem koji može detektirati 0,08 ng/mL AMH. Ova razlika u detekcijskoj moći klinički je relevantna u žena sa smanjenom OR (55). Imunoesej AMH Gen II ELISA eseja tvrtke Beckman Coulter izrađen je kako bi se prebrodio disparitet rezultata prikupljenih prije korištenim esejima proizvođača Diagnostic Systems Lab (DSL) i Immunotech (IOT). Antitijela korištena u Gen II esejima su zatim upotrijebljena za izradu prvih potpuno automatiziranih imunoeseja: Access AMH proizvođača Beckman Coulter i Elecsys AMH proizvođača Roche Diagnostics. Automatizirani eseji pokazali su optimalni performansi i stabilnost u usporedbi s prijašnjim manualnim (56). Izravna usporedba AMH vrijednosti izmjenjenih ovim esejima i dalje

predstavlja problem. Razlike u vrijednostima u manualnim esejima mogu se objasniti različitim parovima korištenih protutijela koji bi mogli detektirati različite AMH izoforme. Nestabilnost uzroka ili matrični efekt utječu na reproducibilnost mjerenja u različitim laboratorijima i također mogu pridonijeti različitim izmjerenim vrijednostima AMH na uzorcima. Razvoj automatiziranih eseja povećao je njihovu preciznost, reproducibilnost, ali i brzinu mjerenja. To ih čini superiornima manualnim imunoesejima (55).

#### **4.1.1. Usporedba različitih AMH imunoeseja**

Nekoliko istraživanja usporedilo je vrijednosti AMH dobivene ručnim i automatiziranim imunoesejima i predstavilo regresijske jednadžbe za usporedbu AMH koncentracija. Ovisno o istraživanju i koncentraciji AMH, mijenjao se stupanj i smjer konverzije koncentracija. Primjerice za koncentraciju AMH od 1 ng/mL zabilježene su varijacije od -12,8 % do -25,2% pri uspoređivanju Elecsys automatiziranog eseja i Gen II ELISA u različitim studijama. Međutim za koncentraciju AMH od 5 ng/mL dobivena je varijacija u interpretaciji od -24% do +45% (57–59). Iako utjecaj varijacije na apsolutne izmjerene AMH vrijednosti nije toliko velik, ove promjene utječu na odabrane *cut-off* vrijednosti i posljedično na kliničko prosuđivanje u liječenju neplodnosti. Razlike među esejima dovode do naizgled suprotnih rezultata u kliničkim istraživanjima koja se bave mjerenjem AMH koncentracije. Nedostatak internacionalnog standarda čak i 20 godina od izrade prvog AMH ELISA imunoeseja je jedan od glavnih problema u njegovoj kliničkoj primjeni (55).

#### **4.1.2. Zamjenjivost dvaju automatiziranih eseja u kliničkoj primjeni**

Novo istraživanje La Marce i suradnika bavilo se izmjenjivošću dvaju automatiziranih eseja, Rocheovog Elecsys AMH i Beckman Coulterovog Access AMH imunoeseja pri odabiru početne doze gonadotropina u IVF-u (56). AMH vrijednosti mjerene su na oba eseja i prema njima su određene početne doze FSH. Glavni ishod istraživanja bio je postotak žena koje bi bile stratificirane za primanje različitih doza gonadotropina temeljem razlika u AMH vrijednostima kad se usporede dva testa. Access AMH esej je sistematično pružao više vrijednosti kad se usporedio s Elecsys esejem.

Ispitivači su promatrali su kako će se primjena različitih testova odraziti na računanje doze folitropina alfa pri korištenju La Marca nomograma za personalizaciju COS-a i folitropina delta u Ferringovom algoritmu. La Marca nomogram razvijen je 2012. godine za računanje prikladne dnevne doze FSH (folitropina alfa), a ona se računa prema dobi žene, FSH mjenjenog 3. dana ciklusa i AMH (60). Koristi se za računanje optimalne početne doze gonadotropina u IVF ciklusima s dugim GnRH agonističkim ili GnRH antagonističkim protokolom za pacijentice koje prvi puta započinju liječenje MPO-om. AMH je vodeći prediktor i objašnjava velik dio varijabilnosti modela. Folitropin delta dozirao se prema unaprijed određenoj razini AMH mjenjenoj Elecsys AMH imunoesejem te prema tjelesnoj masi pacijentice. Folitropin delta je licenciran je za personalizirano doziranje u kombinaciji s dijagnostikom preko Rocheovog Elecsys eseja.

Istraživanje je rađeno na 113 pacijentica s redovitim menstrualnim ciklusom tijekom njihovog prvog ciklusa IVF-a. Uzorke se prikupljalo 2.-5. dana ciklusa. Srednja vrijednost izmjerenog AMH bila je 3,1 ng/mL ( $\pm$  2.2 ng/mL) na Elecsys imunoeseju i 3,8 ng/mL ( $\pm$  2.8 ng/mL) na Accessovom eseju. Folitropin alfa imao je >15% razlike u početnoj dozi za 2 od 113 pacijentica kod upotrebe Access eseja. Folitropin delta imao je >15% razlike u početnoj dozi kod 21 od 113 pacijentica. Promatrajući samo žene s visokom ovarijskom rezervom, 4 od 51 pacijentice bi primile folitropin delta u dozi koja je prelazila 15% razlike pri upotrebi Access eseja umjesto Elecsys eseja.

U zaključku Elecsys i Access imali su skromne razlike izmjerenih AMH vrijednosti i mali utjecaj na FSH kalibraciju u protokolima stimulacije jajnika. Nije postojala značajna razlika u primjeni ova dva testa pri korištenju La Marca nomograma, a minimalna razlika se javljala u upotrebi Ferring algoritma, s manje od 10% pacijentica koje bi zahtijevale različitu dozu folitropina delta. Iliodromiti i suradnici (61) zaključili su da Access imunoesej daje sistematično više koncentracije u odnosu na Elecsys, u prosjeku 10%, što bi rezultiralo s 29% žena s pogrešno određenom dozom FSH delta. Budući da Access daje više vrijednosti AMH, to može rezultirati suptilnim sniženjem doze folitropina. Teoretski takav bi «propust» mogao imati povoljan učinak na pacijentice s visokom OR, smanjujući rizik razvoja OHSS-a (56).

### **4.1.3. Nedostatak međunarodnog standarda u mjerenju AMH**

Odsutnost uniformno kalibriranih eseja ograničava razvoj standardiziranih AMH graničnih vrijednosti potrebnih kako bi se poboljšala sigurnost pacijentica i spriječilo krivo tumačenje izmjerenih vrijednosti. Iako još ne postoji internacionalni standard, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) odobrila je referentni reagens humanog rekombinantnog AMH za kalibraciju imunoeseja (62).

Razlike u rezultatima bi djelomično mogle biti objašnjene širokom varijabilnošću u populacijskim karakteristikama te je stoga potrebno učiniti dodatna istraživanja kako bi se postigla vjerodostojna usporedba različitih imunoeseja koristeći veće jasno definirane kohorte stratificirane prema dobi. Važno je u obzir uzeti i postojanje i kliničku važnost različitih AMH izoformi u cirkulaciji (55).

## **4.2. Čimbenici koji mijenjaju koncentraciju AMH u serumu**

### **4.2.1. Hormonska kontracepcija**

Poznavanje čimbenika koji utječu na koncentraciju AMH u serumu ključno je pri interpretaciji njegovih vrijednosti. Jedan od njih svakako je primjena hormonske kontracepcije (HK). U sistemskom pregledu 15 studija pronađeno je kako se razine AMH u serumu smanjuju ukoliko je HK korištena dulje od godinu dana, ali i da je taj učinak reverzibilan (63). Stupanj smanjenja varirao je 14-55% ovisno o tipu korištene HK, trajanju upotrebe, vremenu mjerenja AMH u menstrualnom ciklusu i o upotrebljenim imunosesejima. Landersoe i suradnici (64) otkrili su u retrospektivnoj studiji da su serumske AMH koncentracije bile 30-40 % niže u žena na oralnim kontraceptivima dok su kod žena s intrauterinim uloškom uočene 17 % niže koncentracije. Oba istraživanja primijetila su pad u AFC vrijednosti, a to upućuje na pretpostavku da AMH bio niži zbog promjene u dinamici samih folikula, iako se niti izravan učinak promijenjenih gonadotropina i spolnih steroida na AMH gensku ekspresiju ne može za sada isključiti.

#### 4.2.2. Indeks tjelesne mase

Nekoliko istraživanja identificiralo je da indeks tjelesne mase negativno utječe na AMH koncentraciju. Moslehi i suradnici reanalizirali su 26 istraživanja gdje su žene bile podijeljene u 3 skupine prema plodnosti i prisutstvu PCOS-a (65). Autori su našli negativnu korelaciju između BMI i AMH u svim skupinama. BMI nije korelirao s AFC-om sugerirajući da direktno utječe na AMH, ali ne i na funkcionalnu ovarijsku rezervu. Smatra se kako u tom učinku važnu ulogu igra leptin. Merhi i suradnici demonstrirali su u kulturi ljudskih granulosa stanica 45 izoliranih iz malih (<14 mm) i velikih folikula ( $\geq 14$  mm) da je terapija rekombinantnim leptinom značajno suprimirala razine mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid*) za AMH i AMH receptor II (66). Terapija JAK2/STAT3 inhibitorom prevenirala je leptinom inducirano smanjenje mRNA ekspresije.

#### 4.2.3. Vitamin D

Prepoznato je i da vitamin D utječe na koncentraciju AMH. Vitamin D ima sezonsku varijaciju s višim koncentracijama ljeti u usporedbi sa zimom. Primijećeno je da AMH također ima tu sezonsku varijaciju s 18 % nižim vrijedostima zabilježenim zimi (67). U studiji gdje su zdrave normoovulatorne žene su bile randomizirane da prime jednu oralnu dozu 1,25-dihidroksi vitamina D (vitamin D3, VD3), aktivnog metabolita vitamina D, i placebo, javio se porast koncentracije AMH u onih ispitanica koje su primile VD3 (68). Pitanje je utječe li VD3 na koncentraciju AMH u serumu preko regulacije ekspresije ili indirektno preko mijenjanja broja granulosa stanica. Xu i suradnici (69) pokazali su na rezus makaki majmunima kako VD3 povećava preživljenje preantralnih folikula uz rast koncentracije AMH u usporedbi s kontrolama. To je objašnjeno sprječavanjem apoptoze granulosa stanica kroz 3-5 tjedana od početka primjene vitamina D na kulturi rastućih folikula (25).

## **5. Primjena AMH u individualizaciji kontrolirane ovarijske stimulacije**

Svrha individualizacije COS-a je svakoj ženi omogućiti maksimalnu mogućnost da zatrudni uz smanjenje rizika iatrogenih komplikacija, primarno ovarijskog hiperstimulacijskog sindroma (OHSS). Strategija početka terapije jednakim folitropinskim dozama za svaku pacijenticu ima nedostatke zato što se očekivani odgovor na gonadotropinsku stimulaciju razlikuje ovisno o karakteristikama pojedine pacijentice. Važno uzeti u obzir pripada li pacijentica skupini s očekivanim normalnim, slabim ili prenatlašenim odgovorom jajnika na stimulaciju. Prema tim spoznajama može se provoditi personalizirani plan terapije.

Zadnjih godina je korištenje markera ovarijske rezerve u personalizaciji početne doze gonadotropina progresivno poboljšano, ali je pouzdanost ovih markera bila upitna. Kao prediktor OR korišteni su dob pacijentice, koncentracija hormonskih markera poput bazalnog FSH, LH, E2, inhibina B te konačno AMH i ultrazvučne mjere kao što su volumen jajnika prije terapije i broj malih antralnih folikula, AFC. Većina tih parametara ima ograničenu prediktivnu vrijednost. Dob nije direktan pokazatelj ovarijske rezerve, hormoni poput FSH, LH i E2 imaju visoku razinu varijabilnosti kod pojedine pacijentice, a broj antralnih folikula do sada je bio podložan varijabilnosti zbog primijenjene tehnologije ili različite individualne procjene. AMH je precizan, ne fluktuiraju značajno u menstrualnom ciklusu i danas se smatra zlatnim standardom u određivanju OR (56).

### **5.1. Individualizacija doze gonadotropina temeljena na AMH**

Provođena su prospektivna istraživanja da se razvije prilagođeni režim doziranja fertilitetnih lijekova temeljen na AMH. Time se pokušalo poboljšati kliničku učinkovitost i sigurnost u COS-u. U prospektivnoj kohorti od 538 ljudi, Nelson i suradnici (70) utvrdili su da je pri upotrebi AMH za prilagodbu doze FSH i individualizaciju terapije smanjen rizik HR-a, maksimiziran normalan odgovor i smanjena stopa odustajanja od ciklusa zbog slabog odgovora pri svim vrijednostima AMH, uz održane stope trudnoće. U retrospektivnoj kohorti provedenoj na 423 žene s konvencionalom stimulacijom jajnika i 346 s terapijom

prilagođenom prema AMH (71), primijećene su više stope trudnoće po započetom ciklusu u skupini s prilagođenom stimulacijom. (27.7% za razliku od 17.9%,  $p=0.002$ ) Pacijentice s individualiziranom terapijom imale su LBR od 23,9%, a one s konvencionalnom terapijom 15,9%. Smanjena je i učestalost nastupa OHSS-a sa 6,9% na 2,3%. Zanimljivo je i da je trošak fertilitetnih lijekova pao za 29%, a trošak skrbi za pacijentice s OHSS-om za 43%. (72).

U prospektivnom istraživanju učinjenom na 265 pacijentica, Arce i suradnici (30) evaluirali su odnos doze i odgovora na rekombinantni humani FSH (rhFSH) i utjecaj inicijalno izmjerenog AMH na tu krivulju. Prema očekivanjima, broj dobivenih oocita se povećao s povećanjem doze rhFSH. Za svakih 10% povišenja doze broj dobivenih oocita je bio veći za 0,5 oocita pri niskim koncentracijama AMH, odnosno 1 oocitu pri visokim. Taj odnos nije zamijećen u broju blastocista dobre kvalitete. Stopa oplodnje i vjerojatnost razvoja blastociste snizili su se povećanjem doze. Mogući razlog je prikupljenje većeg broja nezrelih oocita lošije kvalitete. Broj kvalitetnih oocita ovisi o OR. Ovo implicira da postoji optimalna prilagođena doza folitropina iznad koje više doze ne donose dodatni uspjeh.

### **5.1.1. Usporedba s AFC-om**

Iako AMH može uspješno usmjeriti stimulaciju jajnika, pitanje je je li bolji izbor od AFC-a. Lan i suradnici (72) usporedili su u istraživanju na 348 pacijentica upotrebu AMH ili AFC-a u određivanju početne doze rhFSH u COS-u. Nije bilo značajne razlike u proporciji ciklusa sa željenim odgovorom od 8-12 oocita. Međutim, pri korištenju AFC-a u individualizaciji terapije, zabilježeno je više prenaplašenih odgovora nego kod upotrebe AMH. (17.4% u odnosu na 8.6%;  $p= 0.02$ ). Nedavnije istraživanje na 308 subjekata pokazalo je kako dodatak AMH konvencionalnom režimu za doziranje koji uključuje dob, BMI i AFC nije urodilo boljim ishodom MPO postupaka (73). Zapravo je došlo do većeg udjela slabih odgovora, bez drugih značajnih promjena, moguće zbog toga što AFC daje slične rezultate kao AMH. Individualizirani dozni algoritmi ne povećavaju stopu trudnoće niti LBR, međutim inkorporacija AMH u određenim algoritmima poboljšava ishode MPO jer snižava rizik OHSS-a i povećava stopu normalnog odgovora. Tako se postiže veća sigurnost i smanjuje trošak MPO-a jer se smanjuje odustajanje od ciklusa i administracija preventivnih strategija zbog OHSS-a (3).



## 5.2. Biranje stimulacijskih režima baziranih na predviđenom odgovoru

Još jedna strategija optimizacije COS-a je odabir režima u vidu primjene GnRH agonista ili antagonista. Žene s višim AMH imaju očekivani HR pa bi terapija trebala biti usmjerena na smanjenje rizika od OHSS-a. U prospektivnom randomiziranom kontroliranom istraživanju na pacijenticama s PCOS-om uočena je prednost fleksibilnog režima s GnRH antagonistima u odnosu na protokol s agonistima (74). Statistički je bila smanjena stopa OHSS-a i ukupne doze FSH bile su niže uz kraći period trajanja stimulacije.

## 5.3. Predložene smjernice za kliničku primjenu i prediktivni modeli

Granger i Tal (3) navode generalne smjernice korisne za kliničku praksu. Ako je AMH ispod 1 ng/mL onda se očekuje POR s manje od 4 oocite. Pri koncentracijama AMH od 1-3,5 ng/mL, IVF protokol može biti standardni uz GnRH agonist ili preferabilno antagonist te dozu gonadotropina modificiranu prema dobi. Ako je koncentracija AMH viša od 3,5 ng/mL, postoji rizik OHSS-a, a u tih je pacijentica čest i PCOS te se koristi protokol s GnRH antagonistima s agonističkim okidačem ovulacije, a ponekad i dodatkom metformina, kabergolina i drugih lijekova.

Prema Nelsonu i suradnicima (75), predloženo je da pacijentice s AMH ispod 5 pmol/L imaju očekivani POR i da zahtijevaju stimulacijski protokol s GnRH antagonistima uz primjenu 300 i.j. FSH. Normalan odgovor se očekivao u žena od 5 pmol/L do 15 pmol/L, uz predloženi režim s GnRH agonistima i 225 i.j. FSH. Ako je AMH prelazio 15 pmol/L, očekivao bi se HR i predložen je protokol s GnRH antagonistima uz primjenu 150 i.j. FSH.

Nešto su drugačije pacijente stratificirali Yates i suradnici (71), uz očekivan slabiji odgovor ako je AMH koncentracija niža od 15,6 pmol/L, a prenatlašen odgovor ako AMH prelazi 28,6 pmol/L. Za slabi odgovor predložena je uporaba GnRH antagonista i doza FSH 300 i.j. U očekivanom normalnom odgovoru bili su predloženi GnRH agonisti i doza FSH od 200 i.j. Konačno, kod očekivanog prenatlašenog odgovora, predložen s antagonistički protokol uz 150 i.j. FSH. U tim je istraživanjima koncentracija AMH mjerena DSL imunoesejem (76).

Veći je broj prediktivnih modela izrađen za individualizaciju protokola u kontroliranoj stimulaciji jajnika. Jedan od njih je nomogram La Marce i suradnika iz 2012., korišten za

određivanje početne doze FSH u stimulaciji ovulacije temeljen na AMH. Model je razvijen na 346 žena podvrgnutih istom protokolu (standardnom dugom protokolu s GnRH agonistima) i istoj dozi gonadotropina. Varijable koje su analizirane kao mogući prediktori ovarijskog odgovora na stimulaciju bili su serumski FSH mjeren 3. dana, E2, AMH, BMI i pušački status. Multivarijatnom regresijskom analizom pokazano je da su neovisni prediktori ovarijskog odgovora (u smislu broja oocita) bili dob, AMH i FSH 3. dana. AMH je bio najvažniji prediktor. Prije usvajanja u kliničku praksu, svaki nomogram bi trebao biti validiran u vanjskoj, neovisnoj populaciji (76). Nomogram La Marce i suradnika validiran je kasnije u vanjskom randomiziranom kontroliranom istraživanju (77). Sličan prediktivni model konstruirali su i Moon i suradnici (27). U njemu su 4 glavna prediktora bili dob, FSH, AMH i AFC, a mogao je točno predvidjeti broj dobivenih oocita nakon stimulacije jajnika.

Slabost ovakvih modela, unatoč njihovoj prediktivnoj sposobnosti, je ograničena primjenjivost na različite populacije pacijentica. Kod objave prediktivnih modela važno je da prođu ekstenzivnu evaluaciju prije kliničke primjene kako bi se potvrdila njihova reproducibilnost i učinkovitost izvan populacije i MPO-programa na kojima su razvijeni. Interna i vanjska evaluacija trebale bi biti česte jer točnost modela nije konstantna ponekad niti unutar iste ustanove (78).

## 6. Zaključak

AMH se smatra visoko informativnim biokemijskim markerom jajnika i najraniji je i najosjetljiviji marker reproduktivnog starenja. Korelira pozitivno s folikularnim bazenom jajnika i negativno s kronološkom dobi (3). Pouzdano predviđa odgovor na stimulaciju jajnika u liječenju MPO-om, a ulogu ima i u predviđanju preuranjenog nastupa menopauze. Prednost u odnosu na druge markere ovarijske rezerve mu je visoka reproducibilnost zbog male varijacije između i unutar menstrualnih ciklusa. Točnost u predviđanju odgovora na COS dovela je do njegove ključne kliničke primjene, a to je optimizacija odgovora jajnika u stimulaciji ovulacije i minimiziranje hiperstimulacijskih rizika prilagodbom doze gonadotropina u prikladnim stimulacijskim protokolima. Iako se smatra dobrim prediktorom ovarijske rezerve i odgovora jajnika na kontroliranu stimulaciju u postupcima MPO-a, još uvijek ne postoje uvjerljivi zaključci o korelaciji s kvalitativnim ishodima liječenja. Za sada se smatra slabim prediktorom stope kliničkih trudnoća i LBR-a, a dokazi o mogućnosti predviđanja kvalitete oocite, embrija te stope gubitka trudnoće su ograničeni i inkonzistentni. Smatra se da nije prediktivan za količinu genskih oštećenja oocita koja u konačnosti određuju kvalitetu dobivenih embrija i mogućnost trudnoće. Ipak, zamijećena je korelacija AMH mjerenog u folikularnoj tekućini s nekim kvalitativnim ishodima liječenja. U budućnosti, trebalo bi se dodatno istražiti korisnost AMH u individualizaciji stimulacijskih protokola i razviti točne prediktivne modele. Razvoj novih automatiziranih imunoeseja za određivanje koncentracije AMH i moguće utvrđivanje međunarodnog standarda u mjerenju trebali bi razriješiti problem heterogenosti rezultata i graničnih vrijednosti AMH određenih u različitim studijama.

## **7. Zahvale**

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dinki Pavičić Baldani, na velikoj pomoći, strpljenju i uloženom trudu i vremenu pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem i svojim kolegama, prijateljima i obitelji na podršci tijekom cijelog studija.

## 8. Literatura

1. Broer SL, Mol B, Dólleman M, Fauser BC, Broekmans FJM. The role of anti-Müllerian hormone assessment in assisted reproductive technology outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22(3):193–201.
2. Oh SR, Choe SY, Cho YJ. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone in women. *Clin Exp Reprod Med*. 2019;46(2):50–9.
3. Granger E, Tal R. Anti-Müllerian Hormone and Its Predictive Utility in Assisted Reproductive Technologies Outcomes. *Clin Obstet Gynecol*. 2019;62(2):238–56.
4. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020;105(11):3361–73.
5. Lv PP, Jin M, Rao JP, Chen J, Wang LQ, Huang CC, i sur. Role of anti-Müllerian hormone and testosterone in follicular growth: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*. 2020;20(1):101.
6. Šimunić V. Kliničke smjernice za medicinski pomognutu oplodnju. *Medix*. 2013;104/105:132-46.
7. Ovarian Stimulation TEGGO, Bosch E, Broer S, Griesinger G, Grynberg M, Humaidan P i sur. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Hum Reprod Open*. 2020;1–13. doi:10.1093/hropen/hoaa009
8. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, i sur. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Hum Reprod*. 2017;32(9):1786–801.
9. Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, Homburg R, i sur. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: A systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update*. 2017;23(5):560–79.
10. Lensen SF, Wilkinson J, Leijdekkers JA, La Marca A, Mol BWJ, Marjoribanks J, i sur. Individualised gonadotropin dose selection using markers of ovarian reserve for women undergoing in vitro fertilisation plus intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2(2):CD012693. doi:10.1002/14651858.CD012693.pub2.
11. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*. 2002;77(3):468–71.
12. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P i sur. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: An individual patient data approach. *Hum Reprod Update*. 2013;19(1):26–36.
13. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artensio AC, i ostali. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2009;16:113–30.

14. Broer SL, Dólleman M, Van Disseldorp J, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PMM i sur. Prediction of an excessive response in in vitro fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: An individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;100(2):420-9.
15. Drakopoulos P, Bardhi E, Boudry L, Vaiarelli A, Makrigiannakis A, Esteves SC i sur. Update on the management of poor ovarian response in IVF: the shift from Bologna criteria to the Poseidon concept. *Ther Adv Reprod Heal*. 2020;14:1–11.
16. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: Prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles - Implications for individualization of therapy. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2414–21.
17. Al-Azemi M, Killick SR, Duffy S, Pye C, Refaat B, Hill N i sur. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction. *Hum Reprod*. 2011;26(2):414–22.
18. Zheng H, Chen S, Du H, Ling J, Wu Y, Liu H, i ostali. Ovarian response prediction in controlled ovarian stimulation for IVF using anti-Müllerian hormone in Chinese women: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(13):e6495. doi: 10.1097/MD.0000000000006495.
19. Grynnerup AG, Løssl K, Pilsgaard F, Lunding SA, Storgaard M, Bogstad JW, i sur. Prediction of the lower serum anti-Müllerian hormone threshold for ovarian stimulation prior to in-vitro fertilization using the Elecsys® AMH assay: A prospective observational study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019;17(1):11. doi: 10.1186/s12958-019-0452-4.
20. Seifer DB, Tal O, Wantman E, Edul P, Baker VL. Prognostic indicators of assisted reproduction technology outcomes of cycles with ultralow serum antimüllerian hormone: a multivariate analysis of over 5,000 autologous cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System database for 2012–2013. *Fertil Steril*. 2016;105(2):385-93.
21. Reichman DE, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Value of antimüllerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2014;101(4):1012-8e1.
22. van Tilborg TC, Eijkemans MJC, Laven JSE, Koks CAM, de Bruin JP, Scheffer GJ, i ostali. The OPTIMIST study: optimisation of cost effectiveness through individualised FSH stimulation dosages for IVF treatment. A randomised controlled trial. *BMC Womens Health*. 2012;12:29. doi: 10.1186/1472-6874-12-29.
23. Fauser BCJM, Diedrich K, Devroey P. Predictors of ovarian response: Progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2008;14:1–14.
24. Anckaert E, Denk B, He Y, Torrance HL, Broekmans F, Hund M. Evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone assay for the prediction of hyper-response to controlled ovarian stimulation with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist protocol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;236:133–8.
25. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(11):3361–73.

26. Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN i sur. Serum anti-müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod.* 2008;23(1):160–7.
27. Moon KY, Kim H, Lee JY, Lee JR, Jee BC, Suh CS i sur. Nomogram to predict the number of oocytes retrieved in controlled ovarian stimulation. *Clin Exp Reprod Med.* 2016;43(2):112–8.
28. Riggs RM, Duran EH, Baker MW, Kimble TD, Hobeika E, Yin L, i ostali. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone: a comparison of the predictive value of anti-Müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, inhibin B, and age. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(2):202.
29. Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Prediction of high ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: Anti-Müllerian hormone versus small antral follicle count (2-6 mm). *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(6):319–25.
30. Arce JC, Nyboe Andersen A, Fernández-Sánchez M, Visnova H, Bosch E, García-Velasco JA, i sur. Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone: A randomized, antimüllerian hormone-stratified, dose-response trial in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1633-40.
31. Vembu R, Reddy NS. Serum AMH level to predict the hyper response in women with PCOS and non-PCOS undergoing controlled ovarian stimulation in art. *J Hum Reprod Sci.* 2017;10(2):91–4.
32. Jacobs MH, Reuter LM, Baker VL, Craig LTB, Sakkas D, Surrey E, i sur. A multicentre evaluation of the Elecsys® anti-Müllerian hormone immunoassay for prediction of antral follicle count. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(5):845–52.
33. Lyttle Schumacher BM, Jukic AMZ, Steiner AZ. Antimüllerian hormone as a risk factor for miscarriage in naturally conceived pregnancies. *Fertil Steril.* 2018;109(6):1065-71.
34. Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod.* 2006;21(8):2022–6.
35. Borges E, Braga DPAF, Setti A, Figueira R de C, Iaconelli A. The predictive value of serum concentrations of anti-Müllerian hormone for oocyte quality, fertilization, and implantation. *J Bras Reprod Assist.* 2017;21(3):176–82.
36. La Marca A, Minasi MG, Sighinolfi G, Greco P, Argento C, Grisendi V, i sur. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2017;108(5):777-83.
37. Jiang X, Yan J, Sheng Y, Sun M, Cui L, Chen ZJ. Low anti-Müllerian hormone concentration is associated with increased risk of embryonic aneuploidy in women of advanced age. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(2):178–83.
38. Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, Lapensée L, Jamal W, Bissonnette F, i ostali. Anti-Müllerian hormone (AMH): A reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(4):493–8.

39. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1323–9.
40. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1768–74.
41. Tal R, Tal O, Seifer BJ, Seifer DB. Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015;103(1):119–30.
42. Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA, Nelson SM. The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Hum Reprod Update*. 2014;20(4):560–70.
43. Pacheco A, Cruz M, Iglesias C, García-Velasco JA. Very low anti-müllerian hormone concentrations are not an independent predictor of embryo quality and pregnancy rate. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(1):113–9.
44. Peuranpää P, Hautamäki H, Halttunen-Nieminen M, Hydén-Granskog C, Tiitinen A. Low anti-Müllerian hormone level is not a risk factor for early pregnancy loss in IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod*. 2020;35(3):504–15.
45. Dewailly D, Laven J. AMH as the primary marker for fertility. *European Journal of Endocrinology*. 2019;181:45–51.
46. Sun XY, Lan YZ, Liu S, Long XP, Mao XG, Liu L. Relationship Between Anti-Müllerian Hormone and In Vitro Fertilization-Embryo Transfer in Clinical Pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:595448. doi: 10.3389/fendo.2020.595448
47. Seifer DB, Tal R. Personalized prediction of live birth: Are we there yet?. *Fertil Steril*. 2015;104(2):283–5.
48. Sunkara SK, Khalaf Y, Maheshwari A, Seed P, Coomarasamy A. Association between response to ovarian stimulation and miscarriage following IVF: An analysis of 124 351 IVF pregnancies. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1218–24.
49. Gat I, AlKudmani B, Wong K, Zohni K, Weizman NF, Librach C i sur. Significant correlation between anti-müllerian hormone and embryo euploidy in a subpopulation of infertile patients. *Reprod Biomed Online*. 2017;35(5):602–8.
50. Tarasconi B, Tadros T, Ayoubi JM, Belloc S, de Ziegler D, Fanchin R. Serum antimüllerian hormone levels are independently related to miscarriage rates after in vitro fertilization–embryo transfer. *Fertil Steril*. 2017;108(3):518–24.
51. Lin WQ, Yao LN, Zhang DX, Zhang W, Yang XJ, Yu R. The predictive value of anti-müllerian hormone on embryo quality, blastocyst development, and pregnancy rate following in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(5):649–55.
52. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008;89(3):586–91.



53. Hattori Y, Sato T, Okada H, Saito C, Sugiura-Ogasawara M. Comparison of follicular fluid and serum anti-Mullerian hormone levels as predictors of the outcome of assisted reproductive treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;169(2):252–6.
54. Ciepiela P, Duleba AJ, Kario A, Chelstowski K, Branecka-Woźniakwoźniak D, Kurzawa R. Oocyte matched follicular fluid anti-Müllerian hormone is an excellent predictor of live birth after fresh single embryo transfer. *Hum Reprod.* 2019;34(11):2244–53.
55. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(11):3361–73.
56. La Marca A, Deenadayal Tolani A, Capuzzo M. The interchangeability of two assays for the measurement of anti-Müllerian hormone when personalizing the dose of FSH in in-vitro fertilization cycles. *Gynecol Endocrinol.* 2021;37(4):372–6.
57. Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Müllerian hormone. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(8):1143–52.
58. Hyldgaard J, Bor P, Ingerslev HJ, Tørring N. Comparison of two different methods for measuring anti-mullerian hormone in a clinical series. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:107.
59. Nelson SM, Pastuszek E, Kloss G, Malinowska I, Liss J, Lukaszuk A, i ostali. Two new automated, compared with two enzyme-linked immunosorbent, antimüllerian hormone assays. *Fertil Steril.* 2015;104(4):1016-21.
60. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, Argento C, Giulini S, Volpe A. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2012;119(10):1171–9.
61. Iliodromiti S, Salje B, Dewailly D, Fairburn C, Fanchin R, Fleming R, i sur. Non-equivalence of anti-Müllerian hormone automated assays - Clinical implications for use as a companion diagnostic for individualised gonadotrophin dosing. *Hum Reprod.* 2017;32(8):1710–5.
62. Ferguson J, Hockley J, Rigsby P, Burns C. Establishment of a WHO Reference Reagent for anti-Mullerian hormone. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):86.
63. Amer SAKS, James C, Al-Hussaini TK, Mohamed AA. Assessment of Circulating Anti-Müllerian Hormone in Women Using Hormonal Contraception: A Systematic Review. *J Women’s Heal.* 2020;29(1):100–10.
64. Landersoe SK, Forman JL, Birch Petersen K, Larsen EC, Nøhr B, Hvidman HW, i ostali. Ovarian reserve markers in women using various hormonal contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Heal Care.* 2020;25(1):65–71.
65. Moslehi N, Shab-Bidar S, Ramezani Tehrani F, Mirmiran P, Azizi F. Is ovarian reserve associated with body mass index and obesity in reproductive aged women? A meta-analysis. *Menopause.* 2018;25(9):1046–55.
66. Merhi Z, Buyuk E, Berger DS, Zapantis A, Israel DD, Chua S, i ostali. Leptin suppresses anti-Mullerian hormone gene expression through the JAK2/STAT3 pathway in luteinized granulosa cells of women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2013;28(6):1661–9.

67. Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, Van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):2450–5.
68. Dennis NA, Houghton LA, Pankhurst MW, Harper MJ, McLennan IS. Acute supplementation with high dose vitamin D3 increases serum anti-müllerian hormone in young women. *Nutrients.* 2017;9(7):719. doi: 10.3390/nu9070719.
69. Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. *Fertil Steril.* 2016;106(7):1815-20.
70. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, i ostali. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod.* 2009;24(4):867–75.
71. Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HYN, Pemberton PW, Smith A, i sur. Anti-Müllerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod.* 2011;26(9):2353–62.
72. Lan VTN, Linh NK, Tuong HM, Wong PC, Howles CM. Anti-Müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Reprod Biomed Online.* 2013;27(4):390–9.
73. Magnusson, Nilsson L, Oleröd G, Thurin-Kjellberg A, Bergh C. The addition of anti-Müllerian hormone in an algorithm for individualized hormone dosage did not improve the prediction of ovarian response - a randomized, controlled trial. *Hum Reprod.* 2017;32(4):811–9.
74. Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas GT, Alexopoulou E, i ostali. Flexible GnRH antagonist protocol versus GnRH agonist long protocol in patients with polycystic ovary syndrome treated for IVF: A prospective randomised controlled trial (RCT). *Hum Reprod.* 2010;25(3):683–9.
75. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, i ostali. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod.* 2009;24(4):867–75.
76. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice. *Hum Reprod Update.* 2014;20(1):124–40.
77. Allegra A, Marino A, Volpes A, Coffaro F, Scaglione P, Gullo S, i sur. A randomized controlled trial investigating the use of a predictive nomogram for the selection of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles. *Reprod Biomed Online.* 2017;34(4):429–38.
78. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Antoniou N, Maziotis E, Rapani A, Bakas P i sur. Making IVF more effective through the evolution of prediction models: is prognosis the missing piece of the puzzle?. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 2018;64: 305–23.

## 9. Životopis

Rođena sam 1997. u Zagrebu. Pohađala sam V. gimnaziju, a 2015. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija bila sam članica udruge studenata medicine CroMSIC, Studentske sekcije za anesteziologiju i Studentske sekcije za kardiologiju. Aktivno sam sudjelovala na kongresima studenata CROSS, ZIMS te SaMED, a prisustvovala sam i na Ljetnoj školi patofiziologije održanoj u Dubrovniku 2020. godine. Dobitnica sam Dekanove nagrade za poseban doprinos ugledu fakulteta u 2019./2020. godini zbog rada na projektu „Čuvajmo naše srce“ u organizaciji Studentske sekcije za kardiologiju.