

Biološka varijabilnost anti-Müllerovog hormona, inhibina B i androstendiona u žena reproduktivne dobi

Kuhtić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:295439>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

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



Kristina Kuhtić

**Biološka varijabilnost anti-Müllerovog hormona,
inhibina B i androstendiona u žena
reproduktivne dobi**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju i u Endokrinološkom laboratoriju KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i doc. dr. sc. Domagoja Marijančevića.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i doc. dr. sc. Domagoja Marijančevića na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Velike zahvale mojoj prijateljici Ivani na svim satima provedenim sa mnom u knjižnici tijekom ovog studija bez kojih ne bih stigla do ovdje. Također veliko hvala mom dečku Bruni na neizmjerljivoj podršci i motivaciji te mojoj prijateljici Emi najljepše hvala na iznimnoj podršci u najtežim trenucima.

Najviše hvala svim mojim prijateljima bez kojih ovo razdoblje jednostavno ne bi bilo isto. Zahvale mojoj obitelji na svojoj podršci tijekom svih ovih godina.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	ANTI - MÜLLEROV HORMON.....	1
1.1.1.	Uloga u fiziologiji jajnika	1
1.1.2.	Klinički značaj.....	3
1.1.3.	Metode određivanja.....	4
1.2.	INHIBIN B	5
1.2.1.	Uloga u fiziologiji jajnika	5
1.2.2.	Klinički značaj.....	7
1.2.3.	Metode određivanja.....	7
1.3.	ANDROSTENDION.....	8
1.3.1.	Uloga u fiziologiji jajnika	8
1.3.2.	Klinički značaj.....	9
1.3.3.	Metode određivanja.....	10
1.4.	BIOLOŠKA VARIJABILNOST.....	10
1.4.1.	Teorijske osnove	10
1.4.2.	Smjernice za izvođenje studija biološke varijabilnosti	11
1.4.3.	Primjena	12
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	14
3.	MATERIJALI I METODE	15
3.1.	ISPITANICI	15
3.2.	UZORKOVANJE.....	15
3.3.	ODREĐIVANJE ANTI-MÜLLEROVOG HORMONA	16
3.3.1.	Reagensi	16
3.3.2.	Načelo i postupak	16
3.4.	ODREĐIVANJE ANDROSTENDIONA	17
3.4.1.	Reagensi	17
3.4.2.	Načelo i postupak	18
3.5.	ODREĐIVANJE INHIBINA B.....	18
3.5.1.	Reagensi	18
3.5.2.	Načelo i postupak	19
3.6.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	20
5.	ZAKLJUČCI.....	28
6.	POPIS KRATICA	29
7.	LITERATURA.....	30
8.	SAŽETAK/SUMMARY	32
8.1.	SAŽETAK.....	32
8.2.	SUMMARY	33
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	34

1. UVOD

1.1. ANTI - MÜLLEROV HORMON

1.1.1. Uloga u fiziologiji jajnika

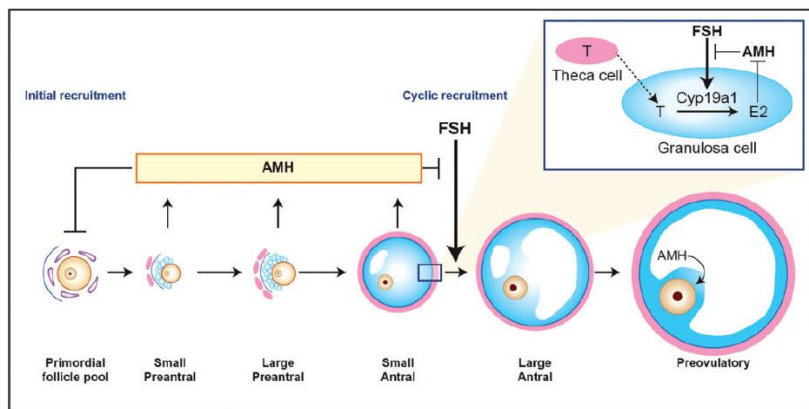
Anti – Müllerov hormon (AMH) je otkriven 1950-ih godina od strane Alfred Josta i suradnika kao važan čimbenik uključen u diferencijaciju unutarnjih spolnih organa embrija. Naime, AMH sintetiziraju fetalni testisi koji dovode do regresije Müllerovih kanala, a kod žena diferenciraju u maternicu, jajovode i gornje dijelove vagine (di Clemente i sur., 2021).

Anti – Müllerov hormon je homodimerni glikoprotein koji pripada superporodici tranformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β). Sintetizira se u obliku monomera koji se disulfidnom vezom povezuje s drugim monomerom formirajući AMH prekursor. Aktivira se cijepanjem na konsenzusnom jednobaznom mjestu cijepanja između Arg427 i Ser428, rezultirajući u N-domeni i C-domeni povezanim u nekovalentni kompleks. U C-domeni se nalazi aktivno mjesto AMH. Svoje djelovanje vrši preko specifičnog receptora tip 2, AMHR2 te receptora tip 1, koji uključuju ALK2/ACVR1, ALK3/BMPR1A, ili ALK6/BMPR1B. Nakon cijepanja prekursora, AMH se veže na AMHR2 te dolazi do disocijacije N-terminalnog dijela AMH i vezanja C- terminalnog dijela za receptor tipa 1. Fosforilacija receptora dovodi do daljnje fosforilacije SMAD proteina (odnosi se na homologiju *Caenorhabditis elegans* SMA i MAD obitelji gena u *Drosophili*) koji se translociraju u jezgru te reguliraju gensku ekspresiju (di Clemente i sur., 2021).

Kod žena, AMH ima temeljnu ulogu u folikulogenezi. Ekspresija AMH započinje u granulosa stanicama regrutiranih primordijalnih folikula u 36. gestacijskom tjednu i traje do menopauze (Visser i Themmen, 2005). Njegova ekspresija raste tijekom faza rasta folikula, a najveća je u preantralnim i malim antralnim folikulama. Rastuća razina AMH je utvrđena kod folikula do 8 mm veličine, dok kod onih većih naglo opada (Moolhuijsen i Visser, 2020).

Postoji usklađena ravnoteža između izlučivanja estradiola iz preovulacijskog folikula i gonadotropinske sekrecije luteinizirajućeg hormona (LH) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH) iz hipofize kako bi se ovulacija dogodila u pravom vremenu (Dewailly i sur., 2014). FSH stimulira rast i diferencijaciju folikula, dok LH pridonosi završnom sazrijevanju i okidač je ovulacije. *In vitro* je dokazano da FSH potiče ekspresiju AMH, no u *in vivo* uvjetima to nije moguće utvrditi jer u mediju gdje su prisutni androgeni dolazi do interferencije estrogena na razini AMH (di Clemente i sur., 2021).

Estrogeni se sintetiziraju djelovanjem enzima aromataze iz androgena kojeg izlučuju teka stanice, pod utjecajem FSH na rastući folikul. Tijekom folikulogeneze sekrecija AMH opada porastom razine estradiola (di Clemente i sur., 2021). Anti-Müllerov hormon ima vjerojatno značajnu ulogu u selekciji dominantnog folikula. Naime, nakon selekcije ekspresija AMH i razina proteina naglo opada. Estradiol (E_2) je ključan u ovom padu jer kroz E_2 receptor β reagira s AMH promotorskom regijom. Anti-Müllerov hormon u biti djeluje kao čuvar folikula te osigurava da svaki mali antralni folikul sintetizira malo E_2 prije selekcije, dopuštajući izravnu komunikaciju ovarija i hipofize koja pak regulira selekciju dominantnog folikula (**Slika 1**) (Dewailly i sur., 2014).



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja AMH u jajnicima (preuzeto iz Dewailly i sur. (2014) uz dopuštenje izdavača).

1.1.2. Klinički značaj

Ovarijska rezerva, koncept koji opisuje kvantitativno i kvalitativno stanje oocita u određenom trenutku, dobila je na značenju kako je medicinski pomognuta oplodnja postala sve raširenija. Krajem 2000-tih pokazana je korisnost i prednost AMH kao biljega ovarijske rezerve za predviđanje slabih i jakih odgovara na stimulaciju gonadotropinima. Na temelju ovoga otkrića, napravljeni su nomogrami koji uzimaju u obzir serumsku koncentraciju AMH kako bi se razvio i optimizirao protokol za stimulaciju, uključujući inicijalnu dozu FSH sve s ciljem smanjenja rizika od izostanka ciklusa ili hiperstimulacijskog sindroma. Utvrđena je linearna korelacija između prinosa oocita i serumske koncentracije AMH. Dodatno, žene s nižom koncentracijom AMH imaju nižu stopu uspješnosti trudnoće, no granična vrijednost još uvijek nije određena te za žene koje imaju nisku serumsku koncentraciju AMH ne možemo pretpostaviti vrlo nisku mogućnost trudnoće (Iwase i sur., 2018).

Mjerenje serumske koncentracije AMH u zdravoj populaciji se može koristiti za predviđanje menopauze. Vršna koncentracija AMH u žena se postiže oko 25 godine života, nakon čega se postepeno smanjuje. Pet godina prije menopauze koncentracija AMH pada ispod mjerljive razine. Dokazano je da kod žena koje u određenoj dobnoj skupini imaju niže razine AMH, menopauza nastupa ranije. Također je utvrđeno da je AMH bolji prediktor menopauze u kombinaciji s godinama nego broj antralnih folikula i FSH. Problematika leži u činjenici da koncentracije serumskog AMH jako variraju unutar određene dobne skupine što nas navodi da ispitamo odgovara li jednaka koncentracija AMH u različitim dobnim skupinama jednakoj ovarijskoj rezervi. Provedbom longitudinalnih studija kojima bi se određivala ovisnost koncentracije serumskog AMH o dobi mogli bi doći do zaključaka o vremenu nastupa menopauze. Ujedno brzina pada koncentracije AMH varira među ženama, te visoka koncentracija AMH u ranoj reproduktivnoj fazi života ne mora nužno upućivati na vrlo kasni nastup menopauze. Anti-Müllerov hormon ne može biti korišten kao biljeg kvalitete embrija i/ili stope uspješnosti trudnoće jer je teško predvidjeti razvoj embrija. Uz navedeno, AMH određivan u folikularnoj tekućini bolji je pokazatelj kvalitete oocite nego serumski AMH (Iwase i sur., 2018).

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) je učestali endokrini sindrom u žena reproduktivne dobi koji se manifestira u obliku cisti na jajnicima. Mali antralni folikuli koji stvaraju AMH ujedno su i dio uvećanih cističnih folikula kod žena s PCOS. Shodno tome, za pretpostaviti je da je razina AMH povećana u tih žena. Za dijagnozu PCOS predložena je granična vrijednost od 4,7 ng/mL (uz 82,8 % osjetljivost, 79,4 % specifičnost). Nadalje, postavljene su granice

stratificirane ovisno o dobi pacijenta koje su pridonijele postavljanju ispravne dijagnoze PCOS. Kod težih slučajeva koncentracije AMH su više. Kako je PCOS sindrom heterogenog porijekla, AMH može korelirati s drugačijim patologijama PCOS jer AMH ustvari suprimira rast folikula. Prema novijim publikacijama, omjer AMH i broja antralnih folikula (AFC) je signifikantno viši u fenotipu A i D nego u fenotipu C, što upućuje na važnu ulogu AMH u PCOS povezanoj anovulaciji (Iwase i sur., 2018).

AMH određen u serumu ima svoju svrhu i u procjeni ovarijske rezerve pacijenata nakon kemoterapije za bolesti poput raka dojke, hematoloških maligniteta, sarkoma te ginekoloških maligniteta. On je bitan alat u savjetovanju žena koje su prošle kemoterapiju, u situaciji kada žele planirati obitelj u budućnosti. No, kod nekih žena iako je AMH bio nemjerljiv, menstruacija nakon kemoterapije ostala je normalnom. Ovdje do izražaja dolazi odabir korištene metode određivanja, budući da se u slučaju osjetljivije metode AMH ipak može detektirati. Korelacija između koncentracije serumskog AMH i buduće plodnosti još nije sasvim utvrđena i zahtjeva daljnja istraživanja. Serumski AMH se koristi kako bi se procijenila ovarijska rezerva i nakon cistektomije uslijed endometrioze. Rizični čimbenici poput bilateralne operacije, težeg oblika endometrioze, većih cisti i terminalnog oštećenja utječu na koncentraciju postoperativnog AMH (Iwase i sur., 2018).

1.1.3. Metode određivanja

Klinička važnost određivanja AMH dovela je do razvitka nekoliko metoda za određivanje AMH. Trenutno se najčešće koriste ručne metode koje uključuju modificirani Gen II test (Beckman Coulter), ultra osjetljivu AMH enzimimunoanalizu (ELISA) i picoAMH test (oba Ansh Labs) koji koriste drugačija antitijela od Gen II AMH testa. picoAMH test je poboljšane donje granice osjetljivosti, rezultirajući granicom detekcije od 1,3 pg/mL, dok Gen II ima granicu od 0,8 ng/mL. Pomak granice detekcije dovodi do značajnog unaprjeđenja u određivanju AMH, posebice u slučajevima vrlo niske ovarijske rezerve. Nadalje, postoje dvije automatizirane metode određivanja AMH, Access AMH (Beckman Coulter) i Elecsys (Roche), koji su dostupni za rutinsku primjenu. Oba rabe ista antitijela kao Gen II test. Direktna usporedivost ovih testova predstavlja dijagnostički problem. Razlika u vrijednostima kod primjene ručnih metoda može biti opravdana korištenjem različitih antitijela koja mogu dovesti do detekcija različitih izoformi AMH. Stabilnost uzorka te efekt matriksa koji utječu na međulaboratorijsku usporedivost također mogu pridonijeti razlikama u dobivenim rezultatima. Razvoj automatiziranih metoda pridonio je povećanju preciznosti, ponovljivosti, brzini određivanja te je superiorniji način određivanja u odnosu na ručne metode. Nadasve, i

dalje postoji nedostatak internacionalnog standarda što dodatno pridonosi težoj usporedivosti različitih metoda za određivanje AMH. Nedostatak internacionalnog referentnog pripravka prema kojem su umjerene sve korištene metode za određivanje AMH ograničava razvoj harmoniziranih graničnih vrijednosti koje bi poboljšale kvalitetu brige o pacijentima i spriječile nepouzdanu interpretaciju rezultata uzrokovanu analitičkom varijabilnošću metoda za određivanje AMH. Ujedno, razvoj internacionalnog referentnog pripravka, bitan je za identifikaciju i kliničku relevantnost izoformi AMH. Trenutno dostupne metode detektiraju proAMH i AMH_{N,C} (25 kDa C-terminalna zrela regija; 110 kDa N-terminalna proregija). Malo se zna o drugim izoformama i njihovoj prisutnosti u cirkulaciji. Iako je AMH_C aktivna izoforma AMH, nije ga moguće detektirati u cirkulaciji pošto se javlja tek nakon vezanja AMH_{N,C} na receptor. U normoovulirajućih žena, proAMH čini svega 3 % ukupnog cirkulirajućeg AMH. Ovaj rezultat mora biti interpretiran s oprezom jer je moguć utjecaj matriksa na konformaciju izoforma. Trenutno još uvijek nije razjašnjeno ima li određivanje različitih izoformi ili njihovih udjela klinički značaj koji je važniji od određivanja koncentracije ukupnog AMH (Moolhuijsen i Visser, 2020).

1.2. INHIBIN B

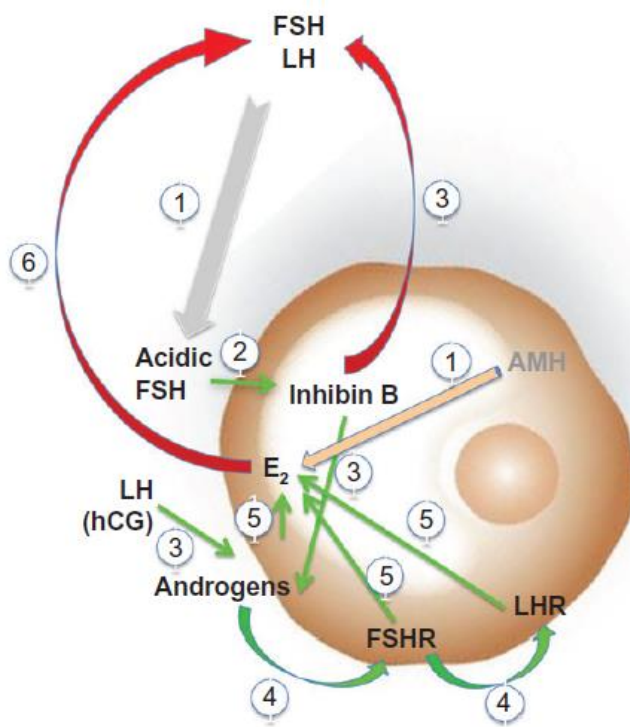
1.2.1. Uloga u fiziologiji jajnika

Inhibini su glikoproteini koje sintetiziraju granulosa i teka stanice jajnika. Postoje najmanje dva aktivna molekulska oblika u cirkulaciji, inhibin A i inhibin B. To su heterodimeri koji se sastoje od α podjedinice i β_A (inhibin A) ili β_B (inhibin B) podjedinice. Djeluju na aktivinske receptore tipa 1 i 2 koji sadrže izvanstaničnu domenu (veže hormon), transmembransku regiju te serin/treonin kinaznu unutarstaničnu domenu. Efekti inhibina su antagonistički aktivinima. U prisustvu specifičnih inhibin-vezujućih molekula poput betaglikana stanice vežu inhibin većim afinitetom od aktivina (Luisi i sur., 2005).

Inhibin B je hormon specifičan za granulosa stanice, a izlučuje se iz rastućeg folikula. Cirkulirajuće koncentracije manifestiraju folikularnu sintezu. Prema tome, vršna koncentracija u cirkulaciji tijekom sredine folikularne faze odražava sadržaj folikularne tekućine skupine folikula u tom stadiju ciklusa, posebice one dominantnog folikula. Pokazano je da folikuli promjera 10-12 mm prikazuju vršnu koncentraciju inhibina B, koja je unutar folikula tisuću puta veća nego u cirkulaciji. Sinteza inhibina B je pod regulacijom FSH što upućuje na klasičnu hormonsku povratnu spregu, u kojoj FSH stimulira izlučivanje hormona

koji zauzvrat inhibiraju otpuštanje FSH iz hipofize. Smanjenje koncentracije FSH u ranoj/srednjoj folikularnoj fazi zaslužno je za orkestraciju ovulacije jednog folikula u žena, a primarno je regulirana sekrecijom inhibina B iz dominantnog folikula. Sekrecija inhibina B potaknuta je djelovanjem FSH na granuloza stanice, tj. kiselim izoformama koje se izlučuju kada su razine E_2 niske. Odabrani folikul počinje pokazivati povećanu ekspresiju aromataze, ali manje nego što je sekrecija inhibina B jer je kisela izoforma manje efikasna u poticanju ekspresije aromataze. Par dana prije ovulacije dolazi do rasta koncentracije E_2 u cirkulaciji što utječe na hipofizu koja zauzvrat secernira manje kiselu izoformu FSH koja nadalje dodatno stimulira sekreciju E_2 te konačno dolazi do ovulacije zrele oocite (**Slika 2**).

Teka stanice pod utjecajem visokih koncentracija inhibina B povećavaju nastajanje androgena (androstendiona). Postoji jaka povezanost između intrafolikularne razine inhibina B i intrafolikularne razine androstendiona i testosterona, te između inhibina B i odgovarajućih razina mRNA u granuloza stanicama za receptor folikulostimulirajućeg hormona (FSHR), LH receptor i CYP19A1. Zaključno inhibin B ima važan parakrini učinak u osiguravanju androgenih supstrata za skupinu folikula od kojih će dominantni biti odabran. Intrafolikularne razine androgena potiču ekspresiju FSHR koja dovodi do povećane ekspresije LHR i aromataze. Folikul postaje osjetljiviji na gonadotropine što rezultira većom vjerojatnošću za nastavak rasta (Yding Andersen, 2017).



Slika 2. Mehanizam djelovanja inhibina B u selekciji dominantnog folikula tijekom menstruacijskog ciklusa (preuzeto iz Yding Andersen (2017) uz dopuštenje izdavača).

1.2.2 Klinički značaj

Kako koncentracija inhibina B odražava broj aktiviranih malih folikula u ranoj folikularnoj fazi, možemo tu koncentraciju koristiti u procjeni bazena folikula u jajnicima te za predviđanje odgovora na FSH stimulaciju. Padajuće razine inhibina B povezane su s povećanjem koncentracije FSH kod starijih žena koje se približavaju menopauzi (McNeilly, 2012). Nađeno je da je inhibin B konzistentan u procjeni ovarijske rezerve s AMH i AFC, te određena prednost u predviđanju $AFC < 5 - 7$ u usporedbi s FSH, što upućuje na korisnost određivanja inhibina B u predviđanju ovarijskog odgovora (Wen i sur., 2021).

S obzirom na povećani broj malih do srednjih antralnih folikula kod žena s PCOS, bilo je za očekivati da će koncentracije inhibina biti drugačije od onih u zdravih žena (McNeilly, 2012). No, dokazano je kako su koncentracije ukupnog inhibina dvostruko veće kod žena s PCOS, za razliku od koncentracije samog inhibina B koja se ne razlikuje bitno. Ovo sugerira na zaključak da kod žena s PCOS dolazi do nepotpunog procesiranja alfa-inhibin prekursora (Tsigkou i sur., 2008).

Karcinom jajnika je najsmrtonosniji ginekološki karcinom u žena, i dok je najčešći oblik prema pojavnosti uglavnom epitelnog porijekla ($> 90\%$), 5 % slučajeva predstavljaju tumori granulosa stanica. Koncentracija ukupnog inhibina je pouzdan biljeg za kasnije faze karcinoma jajnika u postmenopauzalnih žena, dok su koncentracije inhibin B i AMH pokazane kao korisni biljeg za dijagnozu i praćenje pacijenata s tumorom granulosa stanica (McNeilly, 2012).

1.2.3. Metode određivanja

Prve razvijene metode za određivanje inhibina bili su radioimunotestovi koji su se bazirali na poliklonskim antitijelima koja su vezala α podjedinicu inhibina i nisu mogli razlikovati druge bioaktivne oblike inhibina. Stoga se radilo na razvoju metoda koje su koristile antitijelima za vezanje na dva mjesta kako bi se razlikovali drugi oblici inhibina, no zbog velike strukturalne konzervacije inhibina među vrstama te slabe imunogeničnosti, takva antitijela bila su ograničenog afiniteta. U novije vrijeme, razvijen je panel monoklonskih antitijela na sintetske peptidne imunogene uz koje je razvijena vrlo osjetljiva ELISA metoda za određivanje inhibina A, inhibina B i prekursora inhibina pro-alfaC. Metoda za određivanje inhibina A i B koristi prethodnu obradu uzorka vodikovim peroksidom koji oksidira metioninske ostatke β

podjedinice i uvelike pridonosi povećanoj osjetljivosti metode. Dodatno povećanje specifičnosti postiže se zagrijavanjem uzorka s otopinom natrijevog dodecil sulfata koji ireverzibilno ometa aktivin-folistatin komplekse i otklanja efekt heterofilnih antitijela. Povećanje osjetljivosti i specifičnosti metode od velikog je značenja za određivanje inhibina u serumu čije fiziološke koncentracije mogu biti detektirane i do 5 pg/mL (Luisi i sur., 2005).

1.3. ANDROSTENDION

1.3.1. Uloga u fiziologiji jajnika

Androstendion je zajednički prekursor androgenima i estrogenima. Uz to što je hormonski prekursor, ima slabu androgenu aktivnost. Također ima određenu razinu estrogene aktivnosti, no afinitet za estrogenske receptore mu je iznimno mali (Michael Miller i sur., 2013).

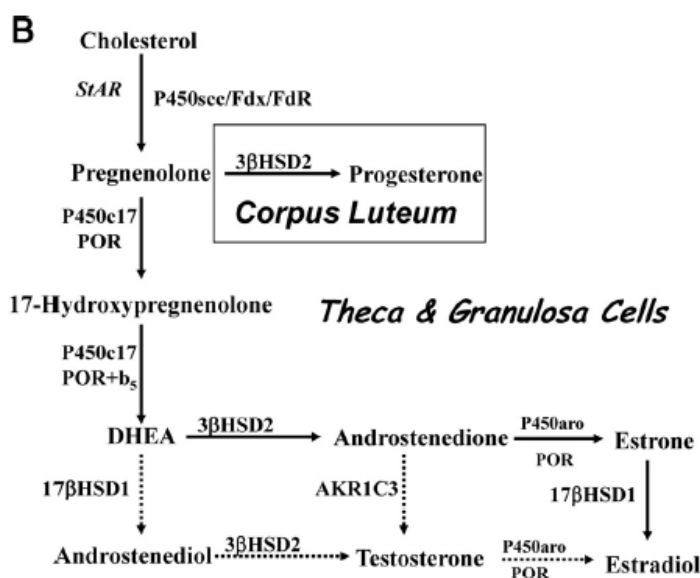
Androstendion se izlučuje iz adrenalne žlijezde i ovarijske strome (teka stanice).

Adrenokortikotropni hormon regulira adrenalnu produkciju androgena, dok LH regulira ovarijsku sintezu.

On je jedan od 19-C steroida koji nastaju putem enzimske konverzije uz citokrom P450 i $3\beta/17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu iz kolesterola (Davison & Bell, 2006).

Ovarijska steroidogeneza (**Slika 3**) uključuje enzimske korake podijeljene između granulosa i teka stanica koje okružuju oocitu i formiraju folikul. Granuloza stanice ne ekspimiraju 17α -hidroksilazu. Tako da se pod utjecajem LH putem cAMP (ciklički adenzin monofosfat) stimulira ekspresija P450_{scc} (enzim cijepanja bočnog lanca kolesterola) u granulosa stanicama. Pregnenolon i progesteron difundiraju u susjedne teka stanice. U teka stanicama androstendion se sintetizira jednim od dva puta. Primarni put uključuje konverziju 17α -hidrokisipregnelola u dehidroepiandrosteron (DHEA) putem 17α -hidroksilaze, te potom konverziju DHEA u androstendion uz enzim 3β -hidroksisteroid dehidrogenazu. Sekundarni put uključuje konverziju 17α -hidroksiprogesterona u androstendion direktno putem 17α -hidroksilaze. Mali dio androstenediona se izlučuje ili konvertira u testosteron uz 17β -dehidrogenazu tip 3, dok se većina vraća u granulosa stanice gdje se pretvara u estron te potom u estradiol uz aromatazu i 17β -hidroksisteroid dehidrogenazu tipa 1 pod utjecajem FSH (Miller i Auchus, 2011).

Stopa dnevne sinteze je 1,4 – 6,2 mg/dan, a koncentracija u cirkulaciji je 2 – 8 nmol/L. Androstendion pokazuje cirkadijalni ritam, tj. najveća koncentracija mu je zabilježena u jutranjim staima, i elevaciju u koncentraciji sredinom menstrualnog ciklusa koja korelira s vršnom koncentracijom estradiola (Burger, 2002.). U postmenopauzalnim ženama jajnici ne izlučuju estrogene, no značajne koncentracije estrona u krvi potječu iz periferne pretvorbe adrenalnog androstendiona. Glavno mjesto ove pretvorbe je adipozno tkivo te samim time razine estrona su povećane u pretilih postmenopauzalnih žena (Rifai i sur.,ured.,2018).



Slika 3. Steroidogeneza u jajnicima (preuzeto iz Miller i Auchus (2011) uz dopuštenje izdavača).

1.3.2. Klinički značaj

Amenoreja (izostanak menstruacije) uzrokovana suviškom androgena može biti posljedica kongenitalne adrenalne hiperplazije, kortikotropin-ovisnog Cushingovog sindroma ili sindroma policističnih jajnika. Suvišak androgena definira se kao serumske razine testosterona ili androstendiona iznad gornje granice odgovarajućeg referentnog intervala. Određivanje androstendiona pridonosi dijagnostici PCOSa. Temelji se na činjenici da periferna pretvorba androstendiona u testosteron može objasniti kliničke simptome hiperandrogenizma kod žena koje imaju normalnu serumsku koncentraciju testosterona. Serumski androstendion otkriva suvišak androgena u PCOS pacijenata s osjetljivošću od 88,3 % i specifičnošću od 97,7 % naspram 65,1 % i 88,3 % koliko iznose za testosteron (Rifai i sur.,ured., 2018).

Preuranjena adrenarha referira se na preuranjeni porast sinteze androgena koji je zaslužan za razvoj pubične dlake ili pubarhe, a očituje se kod djevojčica prije 8., a dječaka prije 9. godine života. Androstendion je jedan od androgena koji mogu biti povišenih koncentracija s obzirom na kronološku dob djece kod koje adrenarha nastupa preuranjeno, no unutar referentnog intervala za pubertetsku fazu razvoja pubičnih dlaka (Ibanez i sur., 2000).

1.3.3 Metode određivanja

Određivanje androstendiona se može provoditi pomoću imunokemijskih metoda ili pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Obje metode imaju svoje prednosti i nedostatke za rutinsko određivanje androstendiona. Imunokemijske metode su podložne križnoj reaktivnosti s različitim endogenim supstancama što rezultira lažno povišenim koncentracijama, posebice kod niskih koncentracija u žena i djece (Yucel i sur., 2018). Ujedno, istodobno uzimanje nekih lijekova može utjecati na izmjerenu koncentraciju korištenjem imunokemijskih metoda.

Automatizacija imunokemijskih metoda s druge strane povećava ukupni obrtaj određivanja te smanjuje vrijeme potrebno za dobivanje konačnog rezultata. U rutinskom određivanju androstendiona najčešće se koriste automatizirani imunokemijski sustavi s prihvatljivom dijagnostičkom točnošću (van Helden i Weiskirchen, 2018).

Suprotno tome, LC-MS/MS pokazuje puno bolju specifičnost i usporedivu osjetljivost mjerenja koncentracije androstendiona. U prošlosti negativni aspekti ove metode su uključivali dugo vrijeme obrade, značajnu količinu uzorka potrebnog za provedbu određivanja (500 μ L) te velike novčane izdatke kao i potrebu za visoko obrazovani osobljem. U proteklih godinama došlo je do razvoja kraćih metoda pripreme uzorka, konkretno za androstendion, više nije potrebno evaporirati uzorak i uz uobičajenu metodu pripreme koja uključuje jednostavnu proteinsku precipitaciju nakon koje slijedi analiza LC-MS/MS. Potreban volumen uzorka također se smanjio, kao i ukupno vrijeme obrade (van Helden i Weiskirchen, 2018).

1.4. BIOLOŠKA VARIJABILNOST

1.4.1. Teorijske osnove

Biološka varijabilnost je jedan od čimbenika koji pridonosi nesigurnosti rezultata u laboratorijskoj obradi. Prostoji više izvora biološke varijabilnosti, tako se na primjer koncentracija ili aktivnost nekih analita mijenja u različitoj dobi života, pogotovo u

razdobljima ubrzanog fiziološkog razvoja (neonatalno doba, pubertet, menopauza). Također se koncentracije analita mogu razlikovati između muškoga i ženskoga spola. Određeni broj analita ujedno ima i predvidivi ciklički ritam koncentracija koji se može mijenjati na dnevnoj, mjesečnoj ili sezonskoj bazi. Kvalitetno određeni referentni intervali uzimaju ove činjenice u obzir te se uzorci prikupljaju u unaprijed zadanim uvjetima. No, najbitnija vrsta biološke varijabilnosti je nasumična biološka varijabilnost. Na primjer, uzorci uzeti od različitih ljudi kojima je određen analit određivan u intervalima nekoliko dana međusobno će se razlikovati, a izvor ove varijacije su predanalitička, analitička i intraindividualna biološka varijabilnost. Aritmetička sredina ovih vrijednosti je homeostatska točka. Također, svaka individua ima drugačiju homeostatsku točku odnosno interindividualnu varijaciju koja se treba prevesti u referentne intervale. Omjer intraindividualne i interindividualne biološke varijabilnosti se naziva indeks individualnosti. Za daljnju diskusiju koristit ćemo sljedeće definirane termine i oznake (Rifai i sur.,ured., 2018):

- CV_I – intraindividualna biološka varijacija (varijacija unutar jedne individue determinirana kao ujedinjena varijacija homogene grupe individua)
- CV_G – interindividualna biološka varijacija (varijacija između centralnih tendencija grupe individua)
- CV_A – analitička varijacija (nepreciznost)
- II – indeks individualnosti

1.4.2. Smjernice za izvođenje studija biološke varijabilnosti

Provođenje studije biološke varijabilnosti temelji se na analizi više uzoraka pojedinca manje odabrane grupe ispitanika. Studija mora biti ustrojena tako da sve predanalitičke i analitičke varijacije budu svedene na najmanju moguću mjeru. Vrlo je bitno definirati i zabilježiti u kojim uvjetima i vremenskim intervalima su uzorci prikupljeni, prema potrebi provesti standardiziranu predanalitičku obradu uzorka te ga pravilno skladištiti do trenutka analize. Također, potrebno je detaljno opisati odabranu metodu analize koja je standardizirana, usporediva te podvrgnuta kontroli kvalitete. Navođenje točno procijenjene vrijednosti CV_A ključno je za pouzdanu procjenu biološke varijabilnosti te intervala pouzdanosti. Optimalno rješenje predstavlja analiza uzoraka u duplikatu unutar iste serije određivanja. Dodatno je važno da tijekom vremenskog perioda provedbe studije ne dođe do bitne sistemske promjene u koncentracijama ispitivanog analita, tj. potrebno je da ispitanik bude u stabilnom stanju. Ovo je naročito važno ako se ispitivanje provodi na populaciji bolesnika.

Statističkom analizom varijance ANOVA analiziraju se rezultati istraživanja te određuje CV_I , CV_G i CV_A . Pri analizi rezultata bitno je uočiti te isključiti netipične vrijednosti među ponavljajima jer one mogu dovesti do lažnog povećanja ili smanjena CV_I , dok netipične vrijednosti unutar serije koje nisu isključene mogu dovesti do prividnog povećanja CV_I . Potrebno je provesti procjenu normalnosti distribucije rezultata za svaku osobu te ako distribucija nije normalna treba biti transformirana. Normalnost raspodjele je bitna ako netipični rezultati i testovi homogenosti ili intervali pouzdanosti ovise o pretpostavci normalnosti. Nadalje, ona je ključ u izravnom računu klinički značajne promjene (RCV). Poželjno bi bilo naznačiti i broj rezultata koji su naposljetku korišteni za izračun vrijednosti biološke varijabilnosti. Za izračun intervala pouzdanosti za CV_I analita od interesa potreban je broj prikupljenih uzoraka, broj ispitanika te CV_A (Arsand i sur., 2018).

1.4.3. Primjena

Biološka varijabilnost pojedinog analita ima široku primjenu u laboratorijskoj praksi. Cilj laboratorija je osigurati odgovarajući stupanj kvalitete i pouzdanosti rezultata. Biološka varijabilnost analita je jedan od ključnih parametara koji tome doprinosi. Na temelju vrijednosti CV_I i CV_G izvedene su specifikacije kvalitete koje služe za detekciju slučajnih i sustavnih grešaka koje nastaju u rutinskim laboratorijskim postupcima. Ovisno o stupnju homeostatske regulacije vrijednosti biološke varijabilnosti analita primjenjujemo različite specifikacije kvalitete. Kod analita koji održavaju sastav i volumen unutarstaničnih i izvanstaničnih tekućina (natrij, albumin), tj. imaju nisku intraindividualnu i interindividualnu varijaciju, koristimo u praksi minimalne specifikacije kvalitete, definirane formulom $CV_A < 0,75CV_I$. Za razliku od njih, kod analita visokih vrijednosti varijacije (trigliceridi, ureja) primjenjujemo kriterije poželjne ili optimalne specifikacije kvalitete. Poželjne specifikacije kvalitete definiramo formulom $CV_A < 0,50 CV_I$, dok optimalne definiramo kao $CV_A < 0,25 CV_I$.

Kod validacije novih metoda i analitičkih sustava isto tako je poželjno upotrebljavati podatke o biološkoj varijabilnosti kao kriterije prihvatljivosti.

Biološka varijabilnost pojedinog analita također utječe na odabir vrste uzorka iz kojega ćemo provoditi analizu. Ona vrsta uzorka u kojoj je vrijednost CV_I niža je prikladnija za izvođenje analize. Uzorci plazme ili seruma su tako prikladniji od mokraće za provedbu analiza jer su manje podložni varijacijama.

Način na koji ćemo interpretirati rezultate pojedinih analita također je ovisan o biološkoj varijabilnosti tih analita. Prema indeksu individualnosti analite možemo svrstati u dvije kategorije:

- analiti niske individualnosti – II veći od 1
- analiti visoke individualnosti – II manji od 0,6

Kod analita niske individualnosti (npr. željezo u serumu) pogodnije je kod interpretacije rezultata korištenje referentnih intervala jer dolazi do značajnog preklapanja intraindividualnog variranja analita s referentnim intervalom. To ustvari znači ako kod pacijenta dođe do promjene koja nije unutar referentnog intervala, to možemo uzeti za klinički značajnu promjenu. Kod analita visoke individualnosti (npr. kreatinin) vrijednosti individualnih varijacija se nalaze u uskom rasponu unutar širokog raspona referentnog intervala. U ovom slučaju može doći do promjene koncentracije analita koja je klinički značajna, a i dalje se nalazi unutar referentnog raspona i ta promjena neće biti uočena ako se interpretacija nalaza oslanja na usporedbu dobivenog rezultata s referentnim intervalom. Iz toga razloga preporučuje se korištenje klinički značajne promjene (engl. *Reference change values*, RCV) kod interpretacije nalaza analita visoke individualnosti. Formula za izračun RCV je:

$$RCV = Z \times \sqrt{2} \times \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}$$

gdje je Z koeficijent čija vrijednost ovisi o postotku vjerojatnosti i smjeru promjene. Ovaj način se zasniva na praćenju promjena između dva uzastopna klinički značajna rezultata pacijenta. Kod odabira analita za dijagnozu određenog stanja, koristit ćemo analit niske individualnosti, dok kod praćenja stanja optimalan analit nam je onaj najmanje vrijednosti RCV. Primjena RCV pridonosi individualizaciji pristupa te boljoj skrbi o pacijentu (Dukić, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Biološka varijabilnost je prirodna fluktuacija analita oko homeostatske točke koja pridonosi nesigurnosti interpretacije dobivenih rezultata. Koncentracije ili aktivnosti analita mogu se mijenjati ovisno o životnoj dobi te mogu imati predvidivi ciklički ritam koji se može mijenjati na dnevnoj, mjesečnoj ili sezonskoj bazi. Varijacije analita u određenog pojedinca oko homeostatske točke nazivamo intraindividualna biološka varijabilnosti. Svaki pojedinac u istoj grupi referentnih osoba ima svoju homeostatsku točku čije variranje oko prosječne vrijednosti istog analita nazivamo interindividualna biološka varijabilnost. Specifikacije sastavnica biološke varijabilnosti uvelike se primjenjuju u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi. One pridonose definiranju analitičkih ciljeva kvalitete, tj. definiraju strategije unutarnje kontrole kvalitete te analize rizika. Nadalje, pomažu pri odabiru odgovarajućeg uzorka za analizu te odgovarajućih jedinica za izražavanje rezultata. Ujedno temeljem dobivenih vrijednosti možemo odabrati prikladniji način interpretacije nalaza ovisno o indeksima individualnosti za pojedini analit. Specifikacije biološke varijabilnosti također mogu pridonijeti odabiru najpogodnijeg analita za otkrivanje ili praćenje određenog poremećaja. Na mrežnoj stranici Europske federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (EFLM) dostupne su specifikacije intra- i interindividualne biološke varijabilnosti za iznimno velik broj analita dobivene sustavnim kliničkim ispitivanjima (<https://biologicalvariation.eu/>). Pregledom literature ustanovljeno je da nema nikakvih spoznaja o biološkoj varijabilnosti inhibina B i androstendiona između ciklusa kod žena reproduktivne dobi, dok su podaci za AMH uistinu ograničavajući budući da se temelje samo na jednom istraživanju koje je utvrdilo CV_I isključivo unutar različitih dana istoga menstrualnog ciklusa, primjenom neautomatizirane ELISA metode. Prema tome, primarni cilj ovoga istraživanja je utvrditi komponente biološke varijabilnosti za pretrage AMH, inhibin B i androstendion. Analiti će biti određeni u žena reproduktivne dobi u 3 uzastopna menstrualna ciklusa. Kod svake žene postoji velika vjerojatnost da će im hormoni varirati iz mjeseca u mjesec, stoga će rezultati dobivenih ovim istraživanjem uvelike pomoći u odgovoru na pitanje koliki je opseg te varijacije i kako ona utječe na interpretaciju nalaza od strane liječnika. Pretpostavka je da će biološka varijabilnost AMH, inhibina B i androstendiona između više uzastopnih menstrualnih ciklusa biti manja od mjerne nesigurnosti metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u Endokrinološkom laboratoriju Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu KBC-a Sestre Milosrdnice, Zagreb, u vremenskom periodu od ožujka 2021. do veljače 2022. Sudionice istraživanja bile su žene reproduktivne dobi koje je liječnik primarne zdravstvene zaštite uputio na laboratorijsku procjenu ovulacijskog ciklusa i ovarijske rezerve u folikularnoj fazi (2. do 3. dan menstruacijskog ciklusa). Sukladno Roraas i sur. (2012), izračunata je veličina uzorka od 38 ispitanica kako bi se osigurala dovoljna snaga za procjenu ukupne intraindividualne biološke varijabilnosti uz 95 % interval pouzdanosti širine 0.1 (ili 10 %); međutim, prilagođeni ukupni broj ispitanica iznosio je 40. Dob ispitanica bila je u rasponu od 19 do 42 godine s medijanom od 29 godina. Kriteriji isključenja obuhvaćali su: kronične upalne i/ili autoimune bolesti (sistemski eritemski lupus), akutna stanja unazad tjedan dana, hormonsko nadomjesno liječenje (izuzev hormona štitnjače) i pušenje.

3.2. UZORKOVANJE

S obzirom na pretpostavku da će koncentracije mjerenih hormona u ovom istraživanju očekivano varirati tijekom menstruacijskog ciklusa, uzorci su prikupljeni u određenom uskom vremenskom okviru (2. ili 3. dan menstruacijskog ciklusa) kako bi rezultati bili usporedivi kroz 3 uzastopna ciklusa. Također, kako se AMH i inhibin B izlučuju iz rastućeg folikula, određivanje istih je bilo potrebno provesti za vrijeme folikularne faze ciklusa (preporučeno do 5. dana ciklusa).

Prilikom dolaska ispitanica radi rutinske laboratorijske obrade, uzeta im je detaljna povijest bolesti, zabilježena su antropometrijska mjerenja (visina, težina, indeks tjelesne mase) te je organizirano uzorkovanje krvi prema sljedećem protokolu:

1. Uzorci su se prikupljali ujutro od 7:30 do 9:30 h.
2. Uzorkovala se venska krv, jedna epruvete s aktivatorom zgrušavanja od 7 mL.
3. Ispitanice su trebale biti natašte zadnjih 12 h prije uzorkovanja krvi.
4. Ispitanice su morale biti u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa, odnosno krv se uzorkovala od 2. do 3. dana ciklusa.
5. Istraživanje se potom nastavljalo u sljedeća dva menstruacijska ciklusa, kada su ispitanice ponovno dolazile u folikularnoj fazi te im se pristupilo identično (kako je opisano pod točkama 1. do 4.). Dakle, istraživanje je za svaku ispitanicu trajalo

ukupno 3 mjeseca tijekom kojih je svaka od njih tri puta dolazila na uzorkovanje krvi, svaki puta u folikularnoj fazi ciklusa.

6. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3100 okretaja po minuti korištenjem centrifuge Hettich Rotanta 460RC.
7. Neposredno nakon centrifugiranja uzorka, serum se odvojio i pohranio do analize na - 20 °C.
8. Nakon što su svi uzorci prikupljeni u cijelosti, analizirali su se serijski, mjerenjem u duplikatu, korištenjem istog lota/serije reagensa te izvedbom istog operatera.

3.3. ODREĐIVANJE ANTI-MÜLLEROVOG HORMONA

3.3.1. Reagensi

Za metodu određivanja AMH korišten je reagens Elecsys AMH Plus, proizvođača Roche Diagnostics, koji se sastoji od:

M – streptavidinom obložene mikročestice

R1 – biotinom obilježeno anti – AMH antitijelo (mišjeg podrijetla) 1,0 mg/L, u fosfatnom puferu 50 mmol/L, pH = 7,5

R2 – monoklonsko anti – AMH antitijelo (mišjeg podrijetla) obilježeno kompleksom s rutenijem 1,0 mg/L, u fosfatnom puferu 50 mmol/L, pH = 7,5

Elecsys AMH Plus je stabilan neotvoren do isteka roka, otvoren do 12 tjedana na 2-8 °C, dok je u analizatoru stabilan do 8 tjedana.

Za određivanje AMH također su potrebni:

Diulent Universal – za razrjeđivanje uzorka

ProCell – pufer

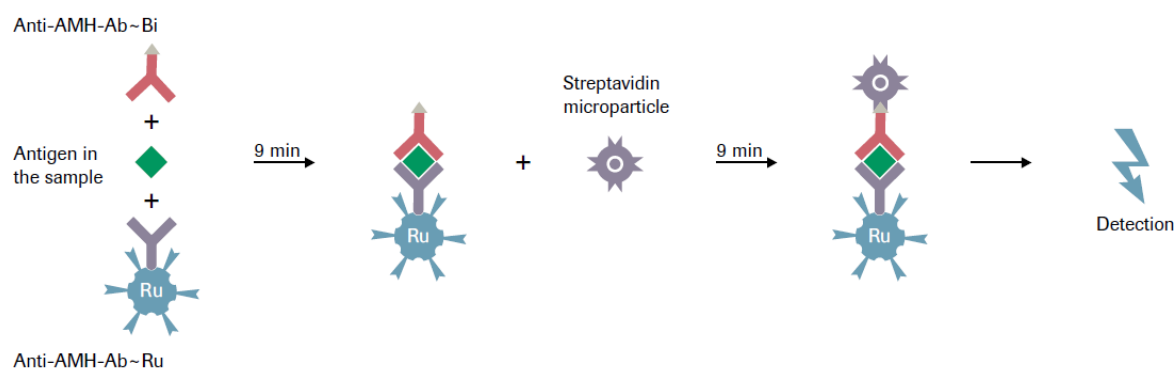
CleanCell – otopina za čišćenje ćelije za mjerenje

Elecsys SysWash – aditiv za ispiranje

3.3.2. Načelo i postupak

Koncentracija AMH u serumu je određena elektrokemiluminiscentnom imunokemijskom metodom ECLIA (eng. *Electrochemiluminescence Immunoassay*) na automatskom analizatoru Cobas 801e tvrtke Roche Diagnostics (**Slika 4**). U prvoj inkubaciji, koja traje 9 minuta, 50 µL uzorka se miješa s reagensom koji sadrži antitijela obilježena rutenijevim kompleksom i

antitijela obilježena biotinom. Nastaje sendvič kompleks analita s navedenim antitijelima. Zatim, dodaju se paramagnetske čestice obložene streptavidinom, za koje se kompleks veže preko biotina. Novonastali kompleks se preko interakcije streptavidina i biotina veže za čvrstu fazu. Ova inkubacija također traje 9 minuta. Reakcijska smjesa se potom aspirira u mjernu čeliju gdje se mikročestice magnetski vežu na površinu elektrode, a nevezane supstance se uklanjaju. Primjenom napona odvija se kemiluminiscentna reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Emisija fotona je proporcionalna koncentraciji AMH u uzorku. Koncentracija AMH izračunava se prema kalibracijskoj krivulji koja je uspostavljena na temelju standarda poznate koncentracije AMH.



Slika 4. Slikovni prikaz sendvič principa ECLIA metode (preuzeto iz uputa reagensa Elecsys AMH plus proizvođača, Roche Diagnostics).

3.4. ODREĐIVANJE ANDROSTENDIONA

3.4.1. Reagensi

Za određivanje androstenediona korištene su sljedeće radne otopine proizvođača Roche Diagnostics:

ASD koji se sastoji od:

1. M – mikročestice obložene streptavidinom 0,72 mg/mL
2. R1 – biotinizirano monoklonsko anti-androstendion antitijelo (rekombinantno ovčje) 10 ng/mL, u fosfatnom puferu 50 mmol/L, pH = 6,5
3. R2 – androstenedion vezan na sintetski peptid obilježen kompleksom s rutenijem 3 ng/mL, u fosfatnom puferu 50 mmol/L, pH = 6,5

Diulent Universal – za razrjeđivanje uzorka

ProCell II M – sistemska otopina

CleanCell – otopina za čišćenje čelije za mjerenje

ISE Cleaning Solution / Elecsys SysWash – otopina za ispiranje sistema

PreClean II M – otopina za ispiranje

3.4.2. Načelo i postupak

Određivanje androstendiona u serumu se provodi elektrokemiluminiscentnom imunokemijskom metodom ECLIA (eng. *Electrochemiluminescence Immunoassay*) na automatskom analizatoru Cobas 801e tvrtke Roche Diagnostics. U prvoj inkubaciji, inkubira se 6 µL uzorka sa biotiniliranim antitijelom anti – androstendion i androstendion konjugatom obilježenim rutenijevim kompleksom, koji formiraju imunokomplekse. Ostatna prazna mjesta na biotiniliranim antitijelima postanu popunjena formacijom kompleksa antitijelo-hapten koja ovise o koncentraciji androstendiona u uzorku. U drugoj inkubaciji kompleks se preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Zatim, reakcijska smjesa se aspirira u mjernu ćeliju gdje se mikročestice magnetski zarobe na površinu elektrode, dok se nevezane supstance ispiru s ProCell II M. Primjenom napona na površini elektrode odvija se kemiluminiscentna reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Emisija fotona je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita u uzorku. Koncentracija androstendiona izračunava se prema kalibracijskoj krivulji koja je uspostavljena na temelju standarda poznate koncentracije androstendiona.

3.5. ODREĐIVANJE INHIBINA B

3.5.1. Reagensi

Za određivanje inhibina B su korištene sljedeće radne otopine proizvođača Beckman Coulter:

Koncentrat antitijelo-biotin konjugata – sadrži otopinu biotiniliranog anti-inhibin α -podjedinica antitijela u puferu s proteinom zaštićenog sastava (mišje porijeklo), < 0,5 % ProClin* 300, potrebno ga je razrijediti s Inhibin B Gen II Biotin Konjugat Diulentom 10 do 30 minuta prije korištenja

Streptavidin – enzim konjugat – sadrži konjugiranu preoksidazu iz hrena (HRP) u puferu s proteinom zaštićenog sastava (ribljeg porijekla) i < 10 % metanol

Pufer – sadrži goveđi serumski albumin (BSA), protein zaštićenog sastava (govedo, miš, ovca), surfaktant i < 0,5 % ProClin 300

Biotin konjugat diulent – pufer koji sadrži goveđi serumski albumin (BSA), protein zaštićenog sastava (govedo, miš, ovca), surfaktant i < 0,5 % ProClin 300

TMB kromogen otopina – sadrži tetrametilbenzidinom (TMB) u citratnom puferu s vodikovim peroksidom

Wash solution U – sadrži boratni pufer s detergentom TWEEN, prije upotrebe potrebno je razrijediti s destiliranom vodom

Stopping solution A – sadrži 0,2 M sumpornu kiselinu

Sve otopine se mogu do roka isteka čuvati na 2 – 8 °C, dok se Stopping i Wash Solution mogu čuvati i na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C).

3.5.2. Načelo i postupak

Određivanje inhibina B provedeno je Inhibin B Gen II sendvič ELISA metodom sukladno uputama proizvođača Beckman Coulter. U ovoj metodi, kalibratori, kontrole i uzorci se inkubiraju u mikrotitarskim jažicama koje su presvučene anti-aktivin B antitijelima. Nakon inkubacije te ispiranja, jažice se inkubiraju s biotiniliranim anti-inhibin α -podjedinica detekcijskim antitijelima. Nakon druge inkubacije i ponovnog ispiranja, jažice se inkubiraju sa streptavidinom vezanim na HRP. Nakon treće inkubacije te ispiranja, jažice se ponovo inkubiraju sa supstratom TMB. Nakon zadnje inkubacije dodaje se kisela otopina za zaustavljanje reakcije. Stupanj enzimске pretvorbe se određuje mjerenjem apsorbancije na dvije valne duljine, na 450 nm kao primarni test filter te na 630 nm kao primarni referentni filter. Izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna koncentraciji inhibina B u uzorku. Kalibratori seta Inhibin B Gen II koje smo usporedno inkubirali s uzorcima koriste nam kako bi smo napravili kalibracijsku krivulju apsorbancije u odnosu na poznate koncentracije inhibina B. Koncentracija inhibina B u uzorku se potom može izračunati iz dobivene kalibracijske krivulje.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2007, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc® Statistical Software version 19.8 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021). Dob je, bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum-maksimum). Moguća povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom. Koeficijent korelacije (r) tumačen je na razini $P < 0,05$, a jačina povezanosti interpretirana je sukladno Coltonovu kriteriju (Colton, 1963). Svi rezultati interpretirani su na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U istraživanje je bilo uključeno 40 žena reproduktivne dobi, u rasponu od 19 do 42 godine, s medijanom od 29 godina. Od ukupnog broja ispitanica, 22 su bile u dobnoj skupini od 19 do 29 godina, dok ih je 18 bilo u dobnoj skupini 30 do 42 godine. U Tablici 1 prikazani su prikupljeni podaci o ispitanicama; starost, dan ciklusa kada su prikupljeni uzorci, visina i težina. Iz podataka o visini i težini izračunat je indeks tjelesne mase (BMI) čija je srednja vrijednost iznosila $22,8 \text{ kg/m}^2$ (raspon: $19,5 - 29,4 \text{ kg/m}^2$). Također su navedene izračunate vrijednosti ukupne varijabilnosti (CV_T), analitičke varijacije (CV_A), intraindividualne varijabilnosti (CV_I) te interindividualne varijabilnosti (CV_G) za svaku pretragu. Prosječna ukupna varijabilnost za AMH je iznosila 16,0 % (raspon: 2,3 do 37,6 %), od čega je prosječna analitička varijacija iznosila 4,6 % (raspon: 1,3 do 7,7 %), a prosječna intraindividualna varijabilnost 15,3 % (raspon: 2,9 do 37,4 %). Iz navedenih rezultata je vidljivo da intraindividualna varijabilnost doprinosi dva do tri puta više ukupnoj varijabilnosti nego analitička varijacija. Za androstendion prosječna ukupna varijabilnost je iznosila 18,1 % (raspon: 2,7 do 52,5 %), od čega je analitička varijacija iznosila 2,1 % (raspon: 0,6 do 5,0 %), a intraindividualna varijacija 17,9 % (raspon: 2,6 do 52,4 %). Za ovu pretragu također možemo zaključiti kako intraindividualna varijabilnost više doprinosi ukupnoj varijabilnosti od analitičke varijabilnosti. Za inhibin B prosječna ukupna varijabilnost je iznosila 34,5 % (raspon: 0,0 do 88,0 %), od čega je analitička varijacija iznosila 26,1 % (raspon: 0,0 do 81,3 %), a intraindividualna varijabilnost 33,1 % (raspon: 0,0 do 87,9 %). Kod pretrage inhibina B iako je ukupna analitička varijabilnost manja od ukupne intraindividualne, za nekolicinu uzoraka ipak analitička varijacija nadilazi intraindividualnu varijabilnost, što je vidljivo u **Tablici 1**. Ujedno, u **Tablici 1** navedene su interindividualne varijabilnosti za svaku pojedinu pretragu, te ona za AMH iznosi 67,7 %, za androstendion 41,2 % te za inhibin B 42,4 %.

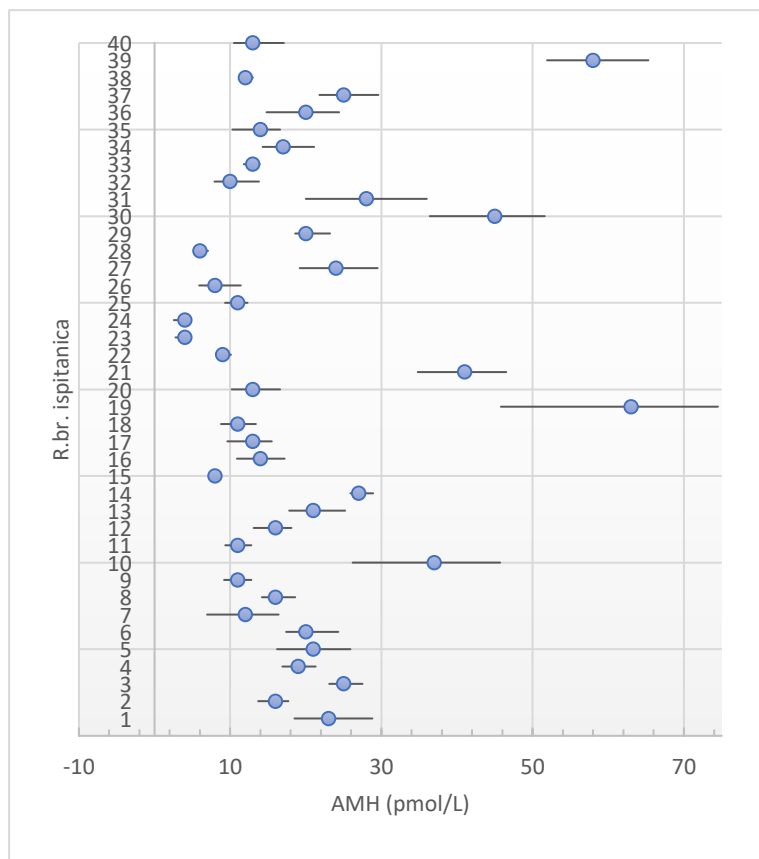
Tablica 1. Prikaz antropometrijskih podataka ispitanica te sastavnica biološke varijabilnosti AMH, androstendiona i inhibina B.

R.br.	Starost	Dan ciklusa	Visina (cm)	Težina (kg)	BMI (kg/m ²)	AMH				Androstendion				Inhibin B			
						CV _A (%)	CV _T (%)	CV _I (%)	CV _G (%)	CV _A (%)	CV _T (%)	CV _I (%)	CV _G (%)	CV _A (%)	CV _T (%)	CV _I (%)	CV _G (%)
1	40	2.	164	55	20,4	4,7	20,2	19,7		5,0	21,4	20,8		3,8	88,0	87,9	
2	20	2.	163	64	24,1	4,3	10,2	9,3		1,2	14,6	14,6		20,1	58,8	55,2	
3	30	3.	169	81	28,4	4,7	5,9	3,6		2,0	13,3	13,1		7,2	38,4	37,7	
4	23	3.	163	57	21,5	4,4	8,5	7,3		1,1	13,6	13,5		4,6	61,4	61,3	
5	24	2.	168	58	20,5	5,6	19,8	19,0		0,9	32,4	32,4		0,0	0,0	0,0	
6	24	3.	170	63	21,8	4,4	13,6	12,9		2,3	7,0	6,6		13,8	22,5	17,8	
7	19	3.	164	62	23,1	4,6	37,6	37,4		1,8	52,5	52,4		29,3	77,9	72,2	
8	27	3.	174	70	23,1	4,7	10,7	9,6		0,8	11,0	10,9		12,7	8,6	9,3	
9	22	3.	173	75	25,1	2,7	14,2	13,9		3,2	6,3	5,4		24,8	75,8	71,6	
10	34	3.	169	58	20,3	5,0	23,8	23,3		2,4	22,0	21,9		16,2	53,0	50,5	
11	32	2.	156	57	23,4	4,4	13,8	13,1		2,7	24,2	24,1		13,4	24,6	20,5	
12	27	3.	160	50	19,5	5,5	12,1	10,8		1,9	16,1	16,0		17,3	13,4	11,0	
13	29	2.	165	53	19,5	7,0	13,8	11,9		1,7	23,6	23,5		11,3	19,3	15,6	
14	23	3.	159	56	22,2	4,1	2,3	3,4		1,6	13,5	13,4		10,1	37,4	36,0	
15	33	3.	168	72	25,5	1,3	4,1	3,8		2,1	17,1	17,0		41,2	47,4	23,6	
16	31	2.	170	77	26,6	5,0	19,5	18,9		2,0	8,8	8,6		81,3	23,7	77,8	
17	42	3.	165	72	26,4	2,7	21,9	21,7		2,1	44,9	44,8		13,1	24,5	20,7	
18	29	3.	171	59	20,2	5,2	17,2	16,4		1,3	4,5	4,3		13,8	2,9	13,5	
19	27	3.	168	57	20,2	2,0	23,1	23,0		1,8	26,8	26,7		33,1	18,8	27,2	
20	29	2.	165	62	22,8	2,9	22,6	22,4		3,2	29,4	29,2		23,3	14,6	18,2	

21	31	2.	162	52	19,8	2,6	12,8	12,5		2,3	28,0	27,9		25,9	41,0	31,8	
22	33	3.	173	75	25,1	4,3	5,9	4,0		4,5	14,8	14,1		30,0	42,4	29,9	
23	38	2.	174	62	20,5	3,1	24,4	24,2		2,0	25,8	25,7		0,0	0,0	0,0	
24	38	3.	177	68	21,7	5,1	30,0	29,6		2,2	17,2	17,1		18,3	27,0	19,9	
25	26	2.	164	75	27,9	3,6	12,1	11,5		2,0	11,2	11,1		34,6	21,3	27,3	
26	38	3.	156	54	22,2	5,7	28,8	28,2		0,6	7,8	7,8		22,0	72,8	69,4	
27	24	3.	170	58	20,1	5,4	17,9	17,1		1,3	18,3	18,2		23,6	25,6	10,1	
28	33	3.	165	80	29,4	4,8	12,8	11,9		0,8	2,7	2,6		3,7	2,7	2,6	
29	22	3.	165	64	23,5	3,9	9,4	8,6		1,7	9,3	9,1		65,2	33,8	55,7	
30	36	3.	168	69	24,4	5,3	14,5	13,5		3,9	7,2	6,1		15,1	36,0	32,7	
31	26	2.	163	55	20,7	6,0	24,4	23,6		1,1	21,7	21,6		39,3	75,9	64,9	
32	25	3.	160	57	22,3	6,7	24,5	23,6		2,1	35,2	35,1		17,5	17,9	3,6	
33	41	3.	176	67	21,6	5,3	4,5	2,9		1,6	25,4	25,4		68,7	44,1	52,6	
34	29	3.	168	60	21,3	5,6	17,7	16,8		1,7	15,4	15,3		35,0	35,9	7,8	
35	30	3.	175	83	27,1	7,7	19,4	17,8		1,8	7,0	6,8		62,4	42,2	45,9	
36	23	2.	165	60	22,0	5,3	20,8	20,1		3,1	18,2	18,0		57,8	7,7	57,3	
37	33	3.	162	59	22,5	3,7	13,7	13,2		1,3	26,1	26,1		46,5	54,1	27,7	
38	37	3.	171	69	23,6	4,0	2,5	3,1		2,3	7,0	6,6		52,9	62,8	33,8	
39	21	3.	171	60	20,5	4,9	8,4	6,8		2,2	12,6	12,4		20,2	13,7	14,8	
40	25	3.	173	63	21,0	5,7	21,6	20,9		2,8	10,2	9,8		13,9	11,0	8,5	
Ukupna						4,6	16,0	15,3	67,7	2,1	18,1	17,9	41,2	26,1	34,5	33,1	42,4

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*); **AMH** – anti-Müllerov hormon; **CV_A** – analitička varijacija; **CV_T** – ukupna varijabilnost; **CV_I** – intraindividualna biološka varijabilnost; **CV_G** – interindividualna biološka varijabilnost

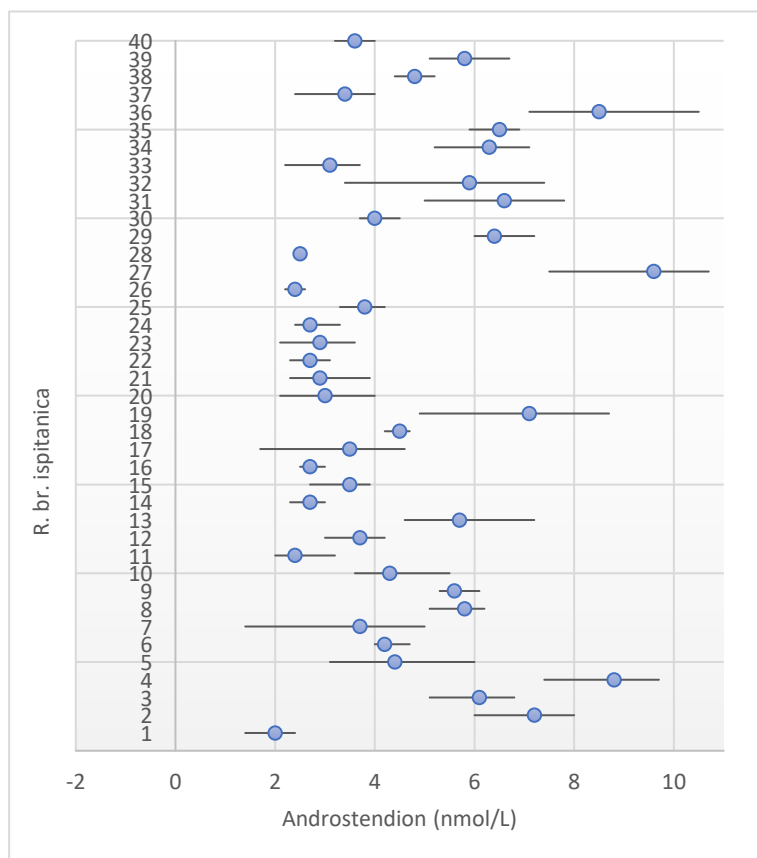
Na **Slici 5** su za svaku ispitanicu prikazane individualne srednje vrijednosti koncentracija AMH uz apsolutni raspon vrijednosti koncentracija od najnižih do najviših. Iz grafičkog prikaza vidimo da što je veća srednja vrijednost koncentracije, to je veći apsolutni raspon koncentracija AMH.



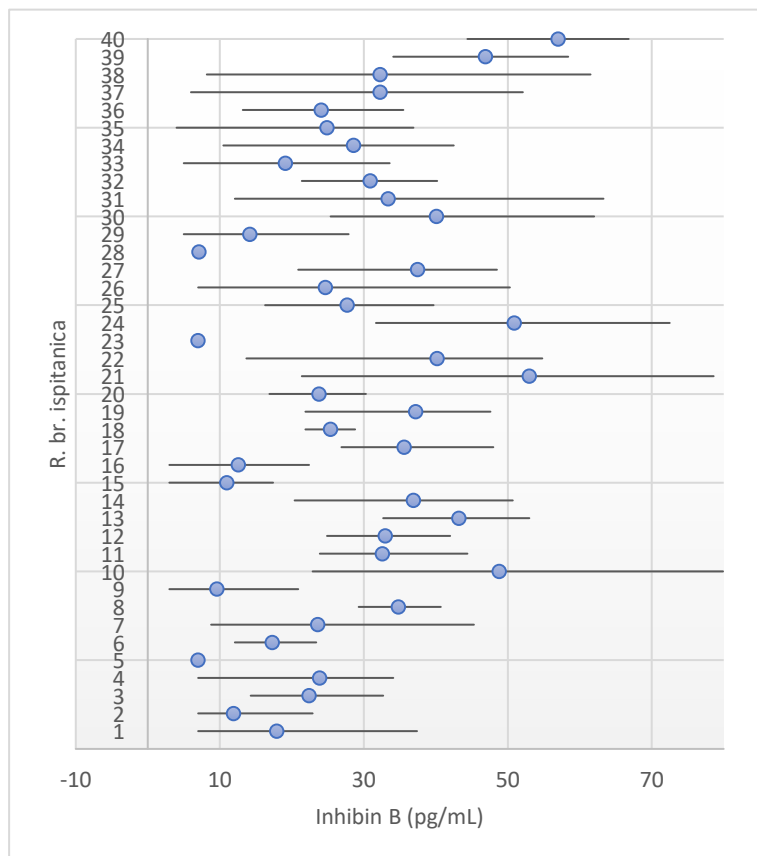
Slika 5. Prikaz apsolutnog raspona koncentracije AMH s istaknutom srednjom vrijednošću za svaku ispitanicu.

Na **Slici 6** prikazane su individualne srednje vrijednosti koncentracija androstendiona uz apsolutni raspon vrijednosti koncentracija androstendiona za svaku ispitanicu.

Na **Slici 7** prikazane su individualne srednje vrijednosti inhibina B za svaku ispitanicu uz raspon apsolutnih vrijednosti koncentracija inhibina B. Uočljivo je da su apsolutni rasponi za inhibin B veći od onih za druge dvije ispitivane pretrage.



Slika 6. Prikaz apsolutnog raspona koncentracije androstendiona uz istaknutu srednju vrijednost za svaku ispitanicu.



Slika 7. Prikaz apsolutnog raspona koncentracije inhibina B s istaknutom srednjom vrijednošću za svaku ispitanicu.

U **Tablici 2** prikazani su rezultati povezanosti dobiveni Spearmanovom korelacijom između sastavnica biološke varijabilnosti te antropometrijskih pokazatelja (BMI) te sastavnica biološke varijabilnosti i dobi. Za pretragu androstendion dobivena je slaba negativna povezanost CV_T ($r = -0,364$, $P = 0,021$) i CV_I ($r = -0,365$, $P = 0,021$) s indeksom tjelesne mase. Dakle, ispitanice koje imaju veći indeks tjelesne mase, imaju manju intraindividualnu biološku varijabilnost kod određivanja androstendiona. Za ostale sastavnice biološke varijabilnosti ispitivanih pretraga nije utvrđena povezanost s indeksom tjelesne mase niti s dobi.

Tablica 2. Povezanost sastavnica biološke varijabilnosti i antropometrijskih pokazatelja (BMI) te sastavnica biološke varijabilnosti i dobi.

Analit	BMI		Dob	
	r	P	r	P
AMH				
CV_A	-0,210	0,193	-0,040	0,806
CV_T	-0,255	0,112	0,092	0,574
CV_I	-0,259	0,107	0,083	0,612
Androstendion				
CV_A	0,109	0,502	0,182	0,262
CV_T	-0,364	0,021*	0,092	0,574
CV_I	-0,365	0,021*	0,083	0,612
Inhibin B				
CV_A	0,216	0,181	-0,045	0,782
CV_T	0,182	0,260	0,126	0,439
CV_I	0,245	0,128	0,017	0,916

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*); **r** – koeficijent korelacije; * - statistički značajno; **AMH** – anti-Müllerov hormon; **CV_A** – analitička varijacija; **CV_T** – ukupna varijabilnost; **CV_I** – intraindividualna biološka varijabilnost

Ovim istraživanjem kvantificirali smo varijaciju AMH, androstendiona te inhibina B uključujući analitičku, intraindividualnu i ukupnu varijabilnost te interindividualne varijabilnosti određivanjem hormona kroz 3 uzastopna menstruacijska ciklusa kod žena reproduktivne dobi.

Za AMH, kako je prethodno navedeno ukupna varijabilnost je iznosila 16 %, te je biološka varijabilnost nadilazila analitičku varijaciju. Poželjna specifikacija kvalitete za nepreciznost u

laboratorijskoj praksi definirana je formulom $CV_A < 0,5 CV_I$ te primjenjujući rezultate ovog istraživanja možemo zaključiti kako je ona zadovoljena za korištenu analitičku metodu. Kod pretrage AMH analitička varijacija daje manji doprinos ukupnoj varijabilnosti od biološke varijabilnosti. Dakle, intraindividualna sastavnica biološke varijabilnosti više doprinosi promjenjivosti rezultata kod iste ispitanice u uzastopnim mjerenjima, stoga je važno osvijestiti ovaj utjecaj pri longitudinalnom praćenju i kliničkom tumačenju koncentracija AMH. Zaključak se podudara s prethodnim istraživanjem biološke varijabilnosti AMH u menstrualnom ciklusu. U istraživanju Hadlow i sur. (2016), ukupna varijabilnost je iznosila 20 % te je također utvrđeno da analitička varijacija manje doprinosi promjeni rezultata u odnosu na intraindividualnu varijabilnost kod iste ispitanice. Sukladno tom istraživanju, i ovom istraživanju utvrđeno je da su najveće kvantitativne razlike koncentracija AMH pronađene kod žena s visokim koncentracijskim razinama AMH. Suprotno gledajući, žene koje su imale niže koncentracije AMH imale su i užu apsolutni raspon koncentracija, iako je postotak varijacije i dalje mogao biti visok. Ovim istraživanjem također je utvrđena interindividualna varijabilnost AMH koja iznosi 67,7 %. Omjer intraindividualne i interindividualne varijabilnosti daje nam indeks individualnosti koji za AMH iznosi od 0,2. Pretrage koje imaju indeks individualnosti niži od 0,6 su pretrage visoke individualnosti, stoga dobiveni pokazatelj treba uzeti u obzir kod interpretacija rezultata pretrage AMH. Klinički značajne promjene mogu se dogoditi kod uzastopnih određivanja AMH, iako se one uvijek provode u istom laboratoriju s istom korištenom analitičkom metodom, stoga se zasebna određivanja AMH trebaju interpretirati s oprezom. Naposljetku, važno je istaknuti kako su dobivene vrijednosti intraindividualne te interindividualne biološke varijabilnosti serološki odraz fiziologije lučenja AMH između različitih menstrualnih ciklusa. Izrazito visoka interindividualna varijacija ne začuđuje s obzirom da žene iste dobi mogu imati značajno različitu ovarijsku rezervu.

Za androstendion, utvrđena je totalna varijabilnost od 18,1 %. Analizirajući rezultate dobivene ovim istraživanjem, možemo zaključiti da pretraga ispunjava uvjet optimalne specifikacije kvalitete za nepreciznost koji je definiran formulom $CV_A < 0,25 CV_I$. Također je utvrđeno da analitička varijacija manje doprinosi ukupnoj varijabilnosti od interindividualne varijabilnosti. Zaključno kao i za AMH, intraindividualna sastavnica više doprinosi promjenjivosti rezultata kod iste ispitanice tijekom uzastopnih mjerenja. Za razliku od AMH, androstendion ne pokazuje veći raspon koncentracija uslijed veće srednje vrijednosti koncentracija androstendiona. Utvrđena interindividualna varijabilnost androstendiona iznosi 41,2 %. Postavivši u omjer intraindividualnu i interindividualnu varijabilnost, dobijemo

indeks individualnosti od 0,4 što čini pretragu androstendiona analitom visoke individualnosti. Klinički značajne promjene za pretrage visoke individualnosti mogu se dogoditi unutar referentnog intervala što treba uzeti u obzir kod interpretacije i kliničkog tumačenja nalaza. Za ovakve pretrage preporučeno je upotrebljavati klinički značajne promjene (RCV) u koncentracijama ispitivanih analita. Na mrežnoj stranici Baze podataka o biološkim varijabilnostima Europske federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Biological Variation Database*) nema objavljeno niti jedno istraživanje koje je ispitivalo sastavnice biološke varijabilnosti androstendiona iz čega možemo zaključiti kako je nemoguće komentirati u kakvom odnosu su rezultati ovog istraživanja u odnosu na rezultate drugih sličnih istraživanja(<https://biologicalvariation.eu/>). Dakle, ovo je prvo važno istraživanje koje definira i kvantificira sastavnice biološke varijabilnosti pretrage androstendion određivane tijekom uzastopnih menstrualnih ciklusa kod žena reproduktivne dobi čime je zaokružena dodana vrijednost dobivenih rezultata i pripadajućih opažanja o kliničkoj rutinskoj primjeni istih.

Za inhibin B, utvrđena je ukupna varijabilnosti od 34,5 %. Kod pretrage inhibina B također je ustanovljeno kako je ukupna analitička varijacija manja od ukupne intraindividualne varijabilnosti. No, kod nekih ispitanica analitička varijacija je veća od interindividualne. Ova pretraga ne zadovoljava ni minimalne specifikacije kvalitete za nepreciznost definirane izrazom $CV_A < 0,75 CV_1$. Dobiveni podatak ne iznenađuje obzirom da se radi o ELISA metodi na čiju analitičku varijaciju utječe spektar znanih čimbenika što je inače dokazano višim analitičkim koeficijentom varijacije dobivenim provedbom inicijalne verifikacije te unutarnje kontrole kvalitete u odnosu na znatno robusnije imunokemijske metode koje smo koristili za određivanje AMH te androstendiona. Nadalje, apsolutni rasponi koncentracija zabilježeni kod ispitanica su širi za pretragu inhibina B, nego za pretrage AMH te androstendiona. Zaključno tome, u budućnosti je potrebno uložiti tehnološke napore (automatizacija cjelokupnog radnog procesa) kako bi se značajnije smanjila analitička varijacija ove pretrage. Indeks individualnosti za inhibin B iznosi 0,8 ne svrstavajući ovu pretragu niti u kategoriju visoke niti niske individualnosti. Kao i za androstendion, prethodno nije publicirano niti jedno istraživanje koje je ispitivalo sastavnice biološke varijabilnosti i njihove fluktuacije kroz uzastopne menstruacijske cikluse u žena reproduktivne dobi, stoga posebno naglašavamo korisnost ovog istraživanja i kliničku primjenjivost dobivenih podataka.

5. ZAKLJUČCI

Određene su sastavnice biološke varijabilnosti za pretragu AMH: CVT od 16,0 %, CVA od 4,6 %, CVI od 15,3 % te CVG od 67,7 %.

Za pretragu AMH intraindividualna sastavnica biološke varijabilnosti više utječe na promjenjivosti rezultata od analitičke varijacije što treba uzeti u obzir pri longitudinalnom praćenju i kliničkom tumačenju koncentracija AMH.

Određene su sastavnice biološke varijabilnosti za pretragu androstendion: CVT od 18,1 %, CVA od 2,1 %, CVI od 17,9 % te CVG od 41,2 %.

Za pretragu androstendion intraindividualna sastavnica biološke varijabilnosti više doprinosi promjenjivosti rezultata od analitičke varijacije. Androstendion je analit visoke individualnosti što treba uzeti u obzir pri kliničkom tumačenju koncentracija androstendiona.

Određene su sastavnice biološke varijabilnost za pretragu inhibin B: CVT od 34,5 % , CVA od 26,1 %, CVI od 33,1 % te CVG od 42,4 %.

Kod pretrage inhibina B je ustanovljeno kako je ukupna analitička varijacija manja od ukupne intraindividualne varijabilnosti, no kod nekih ispitanica analitička varijacija je nadilazila intraindividualnu sastavnicu.

Pretraga inhibina B nije zadovoljila minimalne specifikacije kvalitete za nepreciznost te bi stoga u budućnosti bilo potrebno uložiti tehnološke napore kako bi se značajnije smanjila analitička varijacija ove pretrage.

6. POPIS KRATICA

AFC – broj antralnih folikula

AMH – anti-Müllerov hormon

AMH_{N,C} – 25 kDa C-terminalna zrela regija; 110 kDa N-terminalna proregija

AMHR2 – receptor anti-Müllerovog hormona tip 2

AR – nuklearni androgeni receptor

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*)

BSA – goveđi serumski albumin

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CV_A – analitička varijacija

CV_G – interindividualna biološka varijabilnost

CV_I – intraindividualna biološka varijabilnost

CV_T – ukupna varijabilnost

DHEA – dehidroepiandrosteron

E2 – estradiol

ECLIA – elektrokemiluminiscentna imunokemijska metoda (eng. *Electrochemiluminescence Immunoassay*)

EFLM – Europska federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. *The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

ELISA – enzimimunoanaliza

FSH – folikulostimulirajući hormon

FSHR – receptor folikulostimulirajućeg hormona

HRP – preoksidaza iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*)

LC-MS/MS – sustav tekućinske kromatografije s tandemskom masenom spektrometrijom

LH – luteinizirajući hormon

LHR – receptor luteinizirajućeg hormona

P450_{scc} – enzim cijepanja bočnog lanca kolesterola

PCOS – sindrom policističnih jajnika

SMAD – kratica se odnosi na homologiju *Caenorhabditis elegans* SMA (geni male veličine tijela) i MAD (majke protiv dekapentaplegičar) obitelji gena u *Drosophili*

Star – steroidogeni akutni regulatorni protein (eng. *steroidogenic acute regulatory protein*)

TGF-β – transformirajući čimbenik rasta β

TMB – tetrametilbenzidin

7. LITERATURA

- Arsand AA, Røraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Diaz-Garzon J, Jonker N, Perich C, Gonzalez-Lao E, Carobene A, Minchinela J, Coskun A, Simon M, Alvarez V, Bratlett WA, Fernandez-Fernandez P, Boned B, Braga F, Corte Z, Aslan B, Sandberg S. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clinical Chemistry*, 2018, 64(3), 501-514.
- Burger HG. Androgen production in women. *Fertility and Sterility*, 2002, 77(4), 3-5.
- Colton T. A model for selecting one of two medical treatments. *JASA*, 1963, 58, 388-400.
- Davison SL, Bell R. Androgen Physiology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2006, 24(2), 71-77.
- Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lamblak C, Mason H, Nelson SM, Visser JA, Hamish WW, Anderson RA. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 2014, 20(3), 370-385.
- di Clemente N, Racine C, Pierre A, Taieb J. Anti-Müllerian Hormone in Female Reproduction. *Endocrine Reviews*, 2021, 42(6), 753-782.
- Dukić L. Biološka varijabilnost. U: *Upravljanje kvaliteto laboratorijskog rada*. A. Šimundić, Zagreb, Medicinska Naklada, 2013, str. 41-49.
- Hadlow N, Brown SJ, Habib A, Wardrop R, Joseph J, Gillett M, Maguire R, Conradie J. Quantifying the intraindividual variation of antimüllerian hormone in the ovarian cycle. *Reproductive Endocrinology*, 2016, 106(5), 1230-1237.
- Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P. Premature Adrenarche—Normal Variant or Forerunner of Adult Disease?. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(6), 671-696.
- Iwase A, Osuka S, Goto M, Murase T, Nakamura T, Takikawa S, Kikkawa F. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2018, 44(6), 998-1006.
- La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?. *Clinical Endocrinology*, 2006, 64(6), 603-610.
- Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, 2005, 11(2), 123-135.

McNeilly AS. Diagnostic applications for inhibin and activins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 359(1-2), 121-125.

Michael Miller KK, Al-Rayyan N, Ivanova MM, Mattingly KA, Ripp SL, Klinge CM, Prough RA. DHEA metabolites activate estrogen receptors alpha and beta. *Steroids*, 2013, 78(1), 15-25.

Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 2011, 32(1), pp. 81-151.

Moolhuijsen LM, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020, 105(11), 3361-3373.

Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, St. Louis, Elsevier, 2018, str. 157-169, str. 626-638.

Roraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals, 2012, 58(9), 1306-1313.

The EFLM Biological Variation Database, 2018., <https://biologicalvariation.eu/>, pristupljeno 10.9.2022.

Tsigkou A, Luisi S, De Leo V, Patton L, Gambineri A, Reis FM, Pasquoli R, Petraglia F. High serum concentration of total inhibin in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 2008, 90(5), 1859-1863.

van Helden J, Weiskirchen R. Cross-method comparison of serum androstenedione measurement with respect to the validation of a new fully automated chemiluminescence immunoassay. *Clinical Biochemistry*, 2018, 62, 32-38.

Visser JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 234(1-2), 81-86.

Wen J, Haung K, Du X, Zhang H, Ding T, Zhang C, Ma W, Zhong Y, Qu W, Liu Y, Li Z, Deng S, Luo A, Jin Y, Zhang J, Wang S. Can Inhibin B Reflect Ovarian Reserve of Healthy Reproductive Age Women Effectively?. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12, 1-10.

Yding Andersen C. Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 2017, 23(1), 16-24.

Yucel K, Abusoglu S, Unlu A. Comparison of Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods in the Measurement of Serum Androstenedione Levels. *Clinical Laboratory*, 2018, 64(1), 69-75.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Biološka varijabilnost je prirodna fluktuacija analita oko homeostatske točke koja pridonosi nesigurnosti kod interpretacije dobivenih rezultata. Varijacije analita u određenog pojedinca oko homeostatske točke nazivamo intraindividualna biološka varijabilnosti, a variranje homeostatskih točaka pojedinaca u grupi referentnih osoba oko prosječne vrijednosti istog analita nazivamo interindividualna biološka varijabilnost. Specifikacije sastavnica biološke varijabilnosti pridonose definiranju analitičkih ciljeva kvalitete, odabiru odgovarajućeg uzorka, odgovarajućih jedinica za izražavanje rezultata te najprikladnijeg načina interpretacije nalaza.

Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti sastavnice biološke varijabilnosti za pretrage AMH, inhibin B i androstendion.

U istraživanju je sudjelovalo 40 žena reproduktivne dobi, u rasponu od 19 do 42 godine.

Uzorci su uzeti u tri uzastopna menstrualna ciklusa, na 2. ili 3. dan ciklusa. Utvrđene su vrijednosti ukupne varijabilnosti (CVT), analitičke varijacije (CVA), intraindividualne varijabilnosti (CVI) te interindividualne varijabilnosti (CVG) za svaku pretragu.

Za AMH su dobiveni sljedeći rezultati: CVT od 16,0 %, CVA od 4,6 %, CVI od 15,3 % te CVG od 67,7 %. Za androstendion je dobiven CVT od 18,1 %, CVA od 2,1 %, CVI od 17,9 % te CVG od 41,2 %. Za inhibin B dobiven je CVT od 34,5 %, CVA od 26,1 %, CVI od 33,1 % te CVG od 42,4 %.

Za pretrage AMH i androstendion utvrđeno je da biološka varijabilnost više doprinosi promjenjivosti rezultata od analitičke varijacije što treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata. Za pretragu inhibina B ukupna analitička varijacija manja je od ukupne intraindividualne varijabilnosti, no kod nekih ispitanica analitička varijacija je nadilazila intraindividualnu sastavnicu, stoga pretraga nije zadovoljila minimalne specifikacije kvalitete za nepreciznost.

8.2. SUMMARY

Biological variability is the natural fluctuation of the analyte around the homeostatic point which contributes to uncertainty in the interpretation of the obtained results. Variations of an analyte in a certain individual around the homeostatic point is called intraindividual biological variability, and variation of homeostatic points of individuals in a group of reference population around the average value of the same analyte is called interindividual biological variability. The specifications of the components of biological variability contribute to the definition of analytical quality goals, the selection of the appropriate sample, the appropriate units for expressing the results, and the most appropriate way of interpreting the findings. The aim of this research was to determine the components of biological variability for AMH, inhibin B and androstenedione tests.

Forty women of reproductive age, ranging from 19 to 42 years, participated in the research. Samples were taken in three consecutive menstrual cycles, on the 2nd or 3rd day of the cycle. The values of total variability (CV_T), analytical variation (CV_A), intraindividual variability (CV_I) and interindividual variability (CV_G) were determined for each analyte.

The following results were obtained for AMH: CV_T of 16.0%, CV_A of 4.6%, CV_I of 15.3% and CV_G of 67.7%. CV_T of 18.1%, CV_A of 2.1%, CV_I of 17.9% and CV_G of 41.2% were obtained for androstenedione. CV_T of 34.5%, CV_A of 26.1%, CV_I of 33.1% and CV_G of 42.4% were obtained for inhibin B.

For AMH and androstenedione tests, it was determined that biological variability contributes more to the variability of results than analytical variation, which should be taken into account when interpreting results. For inhibin B test, the total analytical variation is less than the total intraindividual variability, but in some subjects the analytical variation exceeded the intraindividual component, therefore the test did not meet the minimum quality specifications for imprecision.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

BIOLOŠKA VARIJABILNOST ANTI-MÜLLEROVOG HORMONA, INHIBINA B I ANDROSTENDIONA U ŽENA REPRODUKTIVNE DOBI

Kristina Kuhtić

SAŽETAK

Biološka varijabilnost je prirodna fluktuacija analita oko homeostatske točke koja pridonosi nesigurnosti kod interpretacije dobivenih rezultata. Varijacije analita u određenog pojedinca oko homeostatske točke nazivamo intraindividualna biološka varijabilnost, a variranje homeostatskih točaka pojedinaca u grupi referentnih osoba oko prosječne vrijednosti istog analita nazivamo interindividualna biološka varijabilnost. Specifikacije sastavnica biološke varijabilnosti pridonose definiranju analitičkih ciljeva kvalitete, odabiru odgovarajućeg uzorka, odgovarajućih jedinica za izražavanje rezultata te najprikladnijeg načina interpretacije nalaza. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti sastavnice biološke varijabilnosti za pretrage AMH, inhibin B i androstendion. U istraživanju je sudjelovalo 40 žena reproduktivne dobi, u rasponu od 19 do 42 godine. Uzorci su uzeti u tri uzastopna menstrualna ciklusa, na 2. ili 3. dan ciklusa. Utvrđene su vrijednosti ukupne varijabilnosti (CVT), analitičke varijacije (CVA), intraindividualne varijabilnosti (CVI) te interindividualne varijabilnosti (CVG) za svaku pretragu. Za AMH su dobiveni sljedeći rezultati: CVT od 16,0 %, CVA od 4,6 %, CVI od 15,3 % te CVG od 67,7 %. Za androstendion je dobiven CVT od 18,1 %, CVA od 2,1 %, CVI od 17,9 % te CVG od 41,2 %. Za inhibin B dobiven je CVT od 34,5 %, CVA od 26,1 %, CVI od 33,1 % te CVG od 42,4 %. Za pretrage AMH i androstendion utvrđeno je da biološka varijabilnost više doprinosi promjenjivosti rezultata od analitičke varijacije što treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata. Za pretragu inhibina B ukupna analitička varijacija manja je od ukupne intraindividualne varijabilnosti, no kod nekih ispitanica analitička varijacija je nadilazila intraindividualnu sastavnicu, stoga pretraga nije zadovoljila minimalne specifikacije kvalitete za nepreciznost.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 7 grafičkih prikaza, 2 tablice i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: biološka varijabilnost, anti – müllerov hormon, androstendion, inhibin b

Mentori: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokemije i lab. medicine, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice; naslovni docent Hrvatskog katoličkog sveučilišta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokemije i lab. medicine, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice; naslovni docent Hrvatskog katoličkog sveučilišta.*

Rad prihvaćen: rujan 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIOLOGICAL VARIABILITY OF ANTI-MÜLLERIAN HORMONE, INHIBIN B AND ANDROSTENDION IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE

Kristina Kuhtić

SUMMARY

Biological variability is the natural fluctuation of the analyte around the homeostatic point which contributes to uncertainty in the interpretation of the obtained results. Variations of an analyte in a certain individual around the homeostatic point is called intraindividual biological variability, and variation of homeostatic points of individuals in a group of reference population around the average value of the same analyte is called interindividual biological variability. The specifications of the components of biological variability contribute to the definition of analytical quality goals, the selection of the appropriate sample, the appropriate units for expressing the results, and the most appropriate way of interpreting the findings. The aim of this research was to determine the components of biological variability for AMH, inhibin B and androstenedione tests. Forty women of reproductive age, ranging from 19 to 42 years, participated in the research. Samples were taken in three consecutive menstrual cycles, on the 2nd or 3rd day of the cycle. The values of total variability (CV_T), analytical variation (CV_A), intraindividual variability (CV_I) and interindividual variability (CV_G) were determined for each analyte. The following results were obtained for AMH: CV_T of 16.0%, CV_A of 4.6%, CV_I of 15.3% and CV_G of 67.7%. CV_T of 18.1%, CV_A of 2.1%, CV_I of 17.9% and CV_G of 41.2% were obtained for androstenedione. CV_T of 34.5%, CV_A of 26.1%, CV_I of 33.1% and CV_G of 42.4% were obtained for inhibin B. For AMH and androstenedione tests, it was determined that biological variability contributes more to the variability of results than analytical variation, which should be taken into account when interpreting results. For inhibin B test, the total analytical variation is less than the total intraindividual variability, but in some subjects the analytical variation exceeded the intraindividual component, therefore the test did not meet the minimum quality specifications for imprecision.

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

Thesis includes: 33 pages, 7 figures, 2 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: biological variability, anti-müllerian hormone, androstenedione, inhibin b

Mentors: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center; Assistant Professor, Catholic University of Croatia

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center; Assistant Professor, Catholic University of Croatia

The thesis was accepted: September 2022.