



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Možnosti stanovení anti-Müllerova hormonu u žen

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Kateřina Voborská

Vedoucí práce: RNDr. Jana Švarcová, Ph.D.

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Možnosti stanovení anti-Müllerova hormonu u žen* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14.8.2017

Kateřina Voborská

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat především RNDr. Janě Švarcové, Ph.D. za její trpělivost, odborné vedení, cenné rady a věcné připomínky při zpracování této bakalářské práce. A dále patří poděkování celému kolektivu Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol.

Dále patří velké poděkování také mé rodině a přátelům za jejich podporu během celého studia.

Možnosti stanovení anti-Müllerova hormonu u žen

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá anti-Müllerovým hormonem (AMH), jeho stanovením a využitím v klinické praxi. U mužů je AMH tvořen v Sertoliho buňkách varlat. U žen granulózovými buňkami, které ve vaječniku obklopují vajíčko. V prenatálním vývoji má velmi významnou roli při správné sexuální diferenciaci plodu mužského pohlaví, u žen jeho hladiny přímo odráží ovariální rezervu. Díky tomu je možné využití AMH jako markeru fertility.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit pomocí enzymoimunoanalytické (ELISA) metody sérové koncentrace AMH onkologicky nemocných pacientek. Všechny výsledky byly následně porovnány se skupinami zdravých žen v různých věkových kategoriích.

Klíčová slova

anti-Müllerův hormon, diferenciacie plodu, ovariální rezerva, ELISA metoda

Possibilities of measurement anti-Müllerian hormone in women

Abstract

This thesis focuses on the anti-Müllerian's hormone (AMH), its determination and using in clinical practice. In males it is synthesized in Sertoli cells of the testes since in early stage of embryonal development and then during the whole life. It is also formed in females in ovaries. AMH expression is critical to sex differentiation at a specific time during fetal development. AMH can also serve as a molecular biomarker for relative size of the ovarian reserve in females. Comparison of an individual's AMH level with respect to average levels is useful like marker in fertility assessment.

The aim of this bachelor thesis was to determine AMH in serum levels AMH by using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in cancer malignancies. Furthermore, all results were compared with groups of healthy females in dependence on age.

Key words

anti-Müllerian hormone, differentiation of the fetus, ovarian reserve, ELISA method

Obsah

Úvod	10
1 Teoretická část	12
1.1 Anti-Müllerův hormon	12
1.1.2 Tvorba anti-Müllerova hormonu	12
1.2 Funkce anti-Müllerova hormonu	13
1.2.1 Funkce anti-Müllerova hormonu v prenatálním období	14
1.2.2 Funkce anti-Müllerova hormonu v postnatálním období	14
1.2.2.1 Ovariální cyklus	14
1.2.2.2 Gonadotropiny	17
1.2.2.3 Inhibiční funkce AMH	17
1.3 Stanovení AMH	18
1.3.1 ELISA	19
1.3.1.1 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza	19
1.3.1.2 Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza	19
1.3.1.3 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza	19
1.3.2 Chemiluminiscence	20
1.3.2.1 Elektrochemiluminiscence	20
1.4 Hladiny AMH v krvi	21
1.5 Diagnostické využití AMH	22
1.5.1 Stanovení ovariální rezervy	22
1.5.1.1 Stanovení ovariální rezervy u onkologicky nemocných	22
1.5.1.2 Metody ochrany ovariální funkce	23
1.5.1.2.1 Kryokonzervace embryí (KET)	23
1.5.1.2.2 Kryokonzervace ovariální tkáně (KOT)	23
1.5.2 Diagnostika a léčba ovariálních nádorů	24
1.5.3 Diagnostika a sledování syndromu polycystických ovarií	24
1.5.4 Diagnostika ovariálního hyperstimulačního syndromu	24
2 Cíle práce	26

3 Metodika	27
3.1 Přístroje a pomůcky	27
3.2 Reagencie, kalibrátory a kontroly	27
3.3 Měření AMH	29
3.3.1 Preanalytická fáze	29
3.3.2 Pracovní postup	30
3.3.3 Vyhodnocení výsledků	30
4 Výsledky	32
4.1 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (20-29 let)	32
4.2 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (30-42 let)	34
4.3 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (43 a více let)	35
4.4 Porovnání výsledků zdravé populace (20-29 let) a zdravé populace (30-42 let)	36
4.5 Porovnání výsledků všech testovaných skupin pacientek	37
5 Diskuze	39
6 Závěr	42
7 Seznam použité literatury	43

Seznam použitých zkratk

ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AMH	anti-Müllerův hormon
AML	akutní myeloidní leukémie
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CNS	centrální nervová soustava
COS	řízená ovariální stimulace (Controlled Ovarian Stimulation)
DAX 1	gen důležitý pro vývoj ženského pohlaví
E2	estradiol
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (Electro-ChemiLuminiscence ImmunoAssay)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymoimunochemické stanovení (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FSH	folikulostimulační hormon
GDF-9	růstový faktor (Growth Differentiation Factor 9)
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon (Gonadotropin-releasing hormone)
hCG	lidský chorinový gonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin)
HRP	křenová peroxidáza (Horseradish peroxidase)
IVF	in vitro fertilizace (In Vitro Fertilization)
IgG	imunoglobulin třídy G
KET	kryokonzervace embryí (KryoEmbryoTransfer)
KOT	kryokonzervace ovariální tkáně
LF	lékařská fakulta
LH	luteinizační hormon
LIA	chemiluminiscenční stanovení (Luminiscent ImmunoAssay)
LIS	laboratorní informační systém
MAX	maximální
MIF	Müllerův inhibiční faktor (Müllerian-inhibiting factor)
MIH	Müllerův inhibiční hormon (Müllerian-inhibiting hormone)
MIN	minimální

MISRI	Müllerova inhibiční látka receptoru typu I (Müllerian Inhibiting Substance Type I Receptor)
MISRII	Müllerova inhibiční látka receptoru typu II (Müllerian Inhibiting Substance Type II Receptor)
OHSS	ovariální hyperstimulační syndrom (ovarian hyperstimulation syndrome)
PCOS	syndrom polycystických ovaríí
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SEM	standardní chyba mediánu (Standard Error of Mean)
SF 1	steroidogenní faktor 1
SRY	sex-determinující faktor Y (sex-determining region Y)
TGF- β	transformující růstový faktor β
TMB	3,3',5,5 – tetramethylbenzidin
ÚLCHKB	Ústav lékařské chemie a klinické biochemie
ZN	zhoubný novotvar

Úvod

V dnešní moderní a uspěchané době se stále častěji setkáváme s jedním z velkých problémů, kterým je odkládání těhotenství a mateřství do stále vyššího věku. Důvodem může být jak kariéra, tak i pocit svobody, které se některé ženy nechtějí vzdát. U žen má věk zásadní vliv na jejich plodnost. Průměrný věk prvorodiček v ČR se stále zvyšuje a v roce 2016 už přesáhl věkovou hranici 30 let. Dlouhodobé odkládání rodičovství však může způsobit, že otěhotnění už nebude tak jednoduché a u starších žen se také častěji vyskytují komplikace spojené s těhotenstvím. Potíže s otěhotněním mohou být způsobeny poklesem počtu vajíček a zhoršováním jejich kvality během života ženy. Ženy se rodí s určitým počtem vajíček a ten postupně klesá se zvyšujícím se věkem ženy. Během jednoho cyklu dochází k zániku 30 až 100 vajíček. U některých žen může nastat i stav, kdy se vajíčka vypotřebují a dochází tak k předčasné menopauze.

Ženy, které plánují odklad mateřství, mají v současné době možnost nechat si změřit hladiny anti-Müllerova hormonu v krvi. Tento hormon je tvořen granulózovými buňkami, které obklopují vajíčko ve vaječniku. Hladina hormonu tedy odráží počet vajíček ve vaječniku, která jsou k dispozici. Anti-Müllerův hormon je významným ukazatelem fertility a je díky němu možné zjistit, zda se žena nachází v optimálním období fertility, nebo zda schopnost otěhotnět klesá. Stanovení anti-Müllerova hormonu se zvláště využívá ke stanovení ovariální rezervy u žen, které podstupují onkologickou léčbu a plánují těhotenství do budoucna. Následkem chemoterapie a radioterapie dochází k poškození funkce vaječníků. Díky zjištění ovariální rezervy u onkologicky nemocných pacientek může být provedena jedna z metod ochrany ovariální funkce a to buď kryokonzervace embryí, nebo kryokonzervace ovariální tkáně. Výběr vhodné metody závisí vždy na stádiu nádorového onemocnění. V případě kryokonzervace embryí je také třeba existence a souhlas partnera pacientky.

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi stanovení anti-Müllerova hormonu a je rozdělena do dvou částí – teoretické a praktické.

Teoretická část zahrnuje všeobecné informace o anti-Müllerově hormonu. Popisuje jeho tvorbu a funkce během prenatálního a postnatálního období života, dále popisuje diagnostické využití v klinické praxi a metody, které se používají ke stanovení jeho hladin v krvi.

Praktická část je zaměřena především na metodiku stanovení hladin anti-Müllerova hormonu v krvi pomocí metody ELISA. Vzorke séra byly získány a měřeny na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol. Hladiny hormonu byly měřeny u onkologicky nemocných pacientek a u zdravé populace různých věkových kategorií. Všechny výsledky byly následně rozděleny do několika skupin a byly mezi sebou porovnávány.

1 Teoretická část

1.1 Anti-Müllerův hormon

Anti-Müllerův hormon (AMH) je homodimerický glykoprotein patřící do skupiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β). TGF- β je skupina růstových a diferenciačních faktorů. Tato skupina zahrnuje kromě TGF- β i další inhibinové a aktivinové glykoproteiny. Všichni členové této skupiny regulují řadu biologických procesů. Regulují růst tkání a jejich diferenciaci, indukují apoptózu (Mardešić, 2013).

Molekula AMH se skládá z 560 aminokyselin. Před sekrecí prochází glykosylací na pozici 64 a 329 a poté vytváří dimery. Vzniká prekurzor dvou identických disulfidických monomerů o molekulové hmotnosti přibližně 140 kDa. Každý monomer obsahuje velkou N-koncovou doménu (pro-oblast) a menší zralou C-koncovou doménu. U AMH se předpokládá, že na rozdíl od ostatních členů skupiny TGF- β , vyžaduje k dosažení plné bioaktivity N-koncovou doménu, pro umocnění aktivity C-koncové domény.

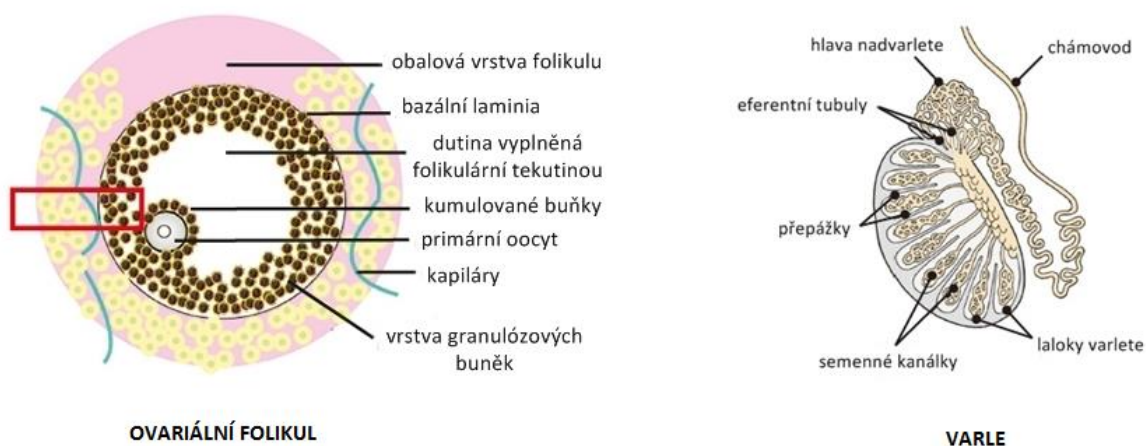
Během cytoplazmatického přenosu dochází ke štěpení části molekuly AMH na specifickém místě mezi pro-oblastí a zbylou částí za vzniku biologicky aktivních N- a C-koncových homodimerů. Homodimery zůstávají v nekovalentním komplexu. Při účinku na buňky využívá AMH dva typy receptorů: MIS receptor typu I (MISRI) a MIS receptor typu II (MISRII). Tyto receptory jsou přítomny na cílových buňkách (Kučera et al., 2013).

1.1.2 Tvorba anti-Müllerova hormonu

Tvorba AMH probíhá u mužů i žen. U mužů se AMH tvoří v Sertoliho buňkách varlat. Sekrece AMH u mužů začíná již v období embryogeneze a pokračuje v průběhu celého života. Až do puberty se AMH neustále vytváří a jeho hladiny se udržují na vysoké úrovni. Poté klesá k postpubertálním hodnotám. Snížení sekrece AMH Sertoliho buňkami závisí více na stádiu puberty než na věku (Vacek, 2006).

U žen tvorba AMH začíná v ováriích okolo 32. týdne těhotenství granulózovými buňkami preantrálních a antrálních folikulů. Hladina AMH reflektuje velikost folikulů, které nejsou citlivé na stimulační působení FSH. Po narození je hladina AMH u dívek velmi nízká. První menší vzestup je zaznamenán ve dvou letech života. Další nárůst nastává během osmého roku života a do dvanáctého roku hladina AMH klesá (Vacek, 2006; Roztočil et al., 2011).

K postupnému zvyšování hladin AMH dochází od dvanáctého roku života a vrcholu dosahuje v období kolem dvaceti pěti až dvaceti sedmi let. V této fázi života je ovariální rezerva i hladina AMH na maximu. S narůstajícím věkem ženy pak hladina AMH postupně klesá. Tím se snižuje i ovariální rezerva, neboť se zmenšuje množství folikulů. Značný pokles AMH nastává po menopauze, kdy je zásoba folikulů zcela vyčerpána. Nízké hladiny AMH mohou být ovlivněny genetickými předpoklady či dalšími rizikovými faktory, např. infekce, prodělané operace, ale také kouření a vlivy životního prostředí (Vacek, 2006; Visser, 2006; Roztočil et al., 2011).



Obrázek 1 Tvorba AMH

Zdroj: http://www.bc-amh.com/AMH_Introduction/ (převzato a upraveno)

1.2 Funkce anti-Müllerova hormonu

První zmínka o AMH byla okolo roku 1940 francouzským endokrinologem A. Jostem. Poukázal na látky bílkovinné povahy, které byly vytvořené ve varlatech savců, včetně člověka. Tyto látky se značně lišily od testosteronu a byly zodpovědné za regresi Müllerových vývodů v prenatálním vývoji (SangLab, 2012).

Pojmenován byl podle německého fyziologa J. P. Müllera a byl nazýván Müllerovým inhibičním faktorem (MIF, *Müllerian-inhibiting factor*) nebo Müllerovým inhibičním hormonem (MIH, *Müllerian-inhibiting hormone*). Současný název AMH je používán podle Dr. Nathalie Josso od roku 1986 (SangLab, 2012).

U mužů je AMH zodpovědný zejména za normální vývoj mužského pohlavního systému. U žen má AMH významnou roli v ovariální folikulogenezi a hlavní úlohu hraje při dozrávání folikulů (Vacek, 2006; Kittnar, 2011).

1.2.1 Funkce anti-Müllerova hormonu v prenatálním období

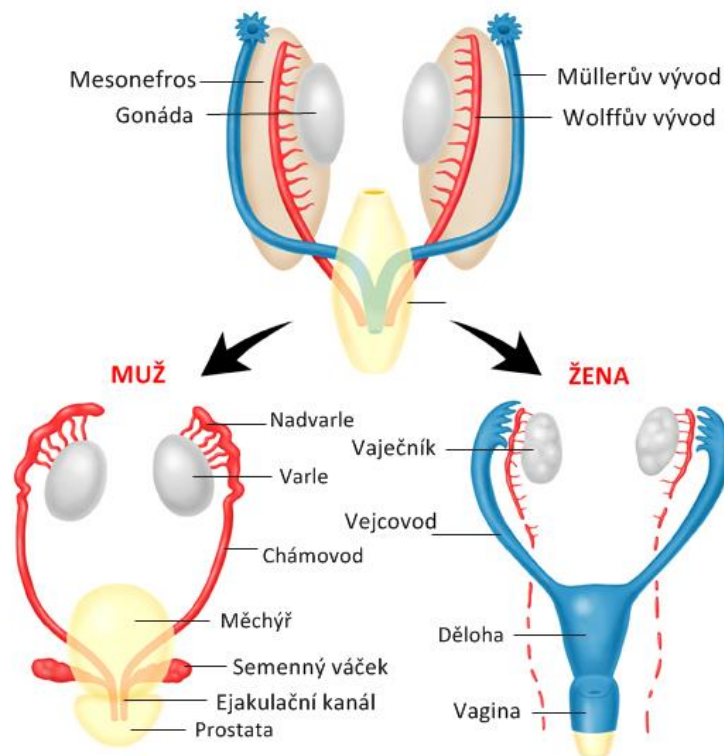
Pohlaví člověka je dané již v okamžiku oplození, ale samotná diferenciací pohlaví plodu začíná až kolem 6. týdne těhotenství. Během časných stadií prenatálního vývoje mají plody obou pohlaví dva páry vývodů: Wolffovy (*ductus mesonephricus*) a Müllerovy (*ductus paramesonephricus*). Tyto vývody tvoří základ pro další vývoj pohlavních orgánů mužů i žen (Vacek, 2006).

Během embryonálního vývoje dochází k expresi genu SRY, který se uplatňuje při produkci steroidogenního faktoru 1 (SF1). SF1 indukuje diferenciaci indiferentních buněk provazců v Sertolihovy buňky a dále diferenciaci mezenchymových buněk v Leydigovy buňky (Vacek, 2006).

Sertolihovy buňky varlat produkují AMH, díky kterému dochází k nevrátelné regresii Müllerových vývodů, která je dokončena do konce 9. týdne těhotenství. Na Leydigovy buňky působí lidský choriový gonadotropin (hCG) a stimuluje tak produkci mužských pohlavních hormonů, zejména testosteronu. Testosteron působí na buňky cílových orgánů a stimuluje diferenciaci Wolffova vývodu a jeho přeměnu na vývodové cesty varlete, kanálek nadvarlete a chámovod. Celý tento proces nemůže bez přítomnosti AMH proběhnout. Díky působení testosteronu a AMH je tak dokončena mužská diferenciací gonád (Vacek, 2006; Kittnar, 2011).

Chybí-li SRY geny nedojde k vytvoření varlete a zůstávají zachovány Müllerovy vývody a dávají původ vejcovodům a uteru. Wolffovy vývody zanikají, protože chybí stimulace testosteronem. Nedostatek AMH a testosteronu se projeví na vývoji zevního genitálu, který nabývá ženského charakteru (Vacek, 2006).

Pohlavní diferenciacie plodu ženského pohlaví není závislá na hormonech, ale uplatňují se DAX1 geny, které se nachází v krátkém raménku chromozomu X. Tyto geny inhibují produkci SF1 a tím i diferenciaci Sertoliho a Leydigových buněk, které produkují testosteron. Zabráněním diferenciaci Sertoliho buněk nedochází k produkci AMH a je tak zabráněno regresi Müllerových vývodů. Müllerovy vývody se vlivem ženských pohlavních hormonů rozvíjí v ženské pohlavní orgány (Vacek, 2006).



Obrázek 2 Schéma sexuální diferenciacie plodu v prenatalním období
Zdroj: <http://physiologyplus.com/wp-content/uploads/2017/01/differentiation-of-the-reproductive-tract.png> (převzato a upraveno)

1.2.2 Funkce anti-Müllerova hormonu v postnatálním období

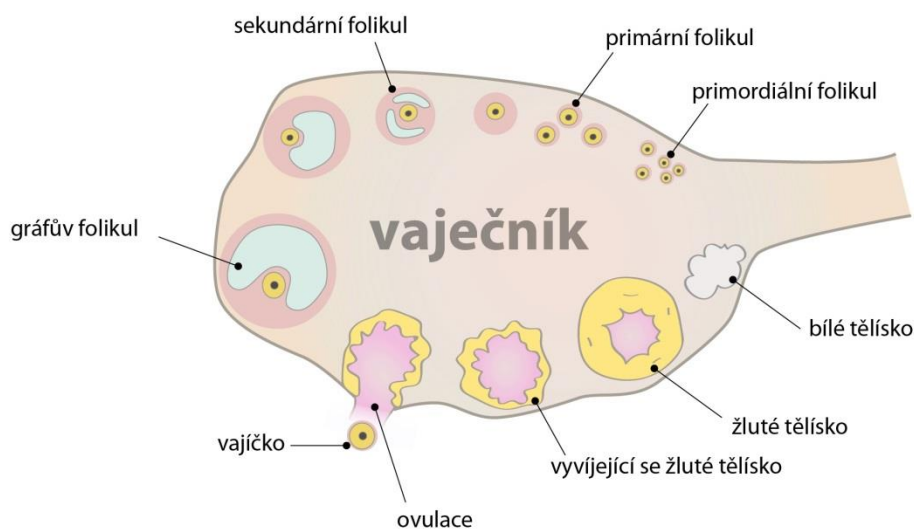
1.2.2.1 Ovariální cyklus

Při narození kolísá počet primordiálních folikulů od 700 000 do 2 milionů. Některé z nich začínají zrát ještě před dosažením puberty díky působení folikulostimulačního hormonu (FSH) a estrogenů. Zrání pokračuje až do vytvoření antrálních (sekundárních) folikulů. K jejich úplnému dozrání nedochází, protože se neuplatňuje působení luteinizačního hormonu (LH) a dochází k atrezii folikulů. Do puberty zaniknou všechny předčasně vyztřelé folikuly. Počet primordiálních folikulů se tak sníží přibližně na počet 300 000 (Vacek, 2006; Visser, 2006; Kittnar, 2011).

S nástupem menstruace začíná u žen období reprodukčního života v souvislosti s vylučováním FSH a LH. Působení těchto hormonů se projevuje cyklickými histologickými změnami v ovariu (ovariální cyklus) a v děložní sliznici (menstruační cyklus) během celého reprodukčního života, který končí po menopauze (Kittnar, 2011; Rokyta, 2015).

Vývoj ovariálních folikulů je zahájen v časně luteální fázi, tzn. po ovulaci předchozího cyklu. Ze zásoby primordiálních folikulů vstupuje do stádia růstu 20 - 25 folikulů. Aktivace folikulů se projeví změnou primordiálního folikulu na primární. Působením FSH prostřednictvím růstového faktoru GDF-9 se folikuly zvětšují na preantrální. Mezi folikulárními buňkami vzniká dutina vyplněná folikulární tekutinou (likvorem), jde o antrální folikul nebo o tzv. Graafův folikul (Vacek, 2006; Kittnar, 2011; Rokyta, 2015).

Rostoucí folikulární buňky jsou zdrojem malého množství estrogenů a inhibinu. Zvýšením tvorby tlumí další tvorbu FSH. Pokles produkce FSH navozuje atrézii rostoucích folikulů, z nichž je následně vybrán jeden dominantní folikul vytvářející velké množství estrogenů a který je určený k ovulaci. Stupňující se tvorba estrogenů stimuluje tvorbu LH. Působením LH dochází k procesu zrání folikulu. Ovulace je závislá na 6 - 10 násobném zvýšení LH před uvolněním vajíčka. LH spolu s FSH navozuje bobtnání vnějších vrstev Graafova folikulu. Vnější vrstva se v jednom místě vyklene ven a působením proteolytických enzymů praskne a vajíčko je vypuzeno do břišní dutiny (Vacek, 2006; Kittnar, 2011; Roztočil et al., 2011).



Obrázek 3 Ovulační cyklus ve vaječniku

Zdroj: <http://fbt.cz/wp-content/uploads/2013/12/Kapitola-08-01-01.jpg>

1.2.2.2 Gonadotropiny

Gonadotropiny jsou hormony produkované už v dětském věku i v období před pubertou, ale jejich hladiny jsou nízké. Produkce gonadotropinů probíhá v adenohipofýze a je podporována pomocí GnRH (gonadotropiny uvolňující hormon). GnRH stimuluje produkci gonadotropinů jen tehdy, pokud jeho sekrece probíhá v pulzech. Kontinuální sekrece GnRH blokuje produkci gonadotropinů v adenohipofýze. Produkce gonadotropinů je tlumena zápornou zpětnou vazbou, která je zprostředkována estradiolem (E2) (Roztočil et al., 2011; Trávník, 2015).

FSH je glykoprotein, který je secernován gonadotropními buňkami předního laloku hypofýzy. Stimuluje růst a dozrávání ovariálních folikulů. Spolu s LH podporují sekreci estrogenů a podílejí se na změně endometria v menstruačním cyklu. V menopauze dochází k poklesu produkce steroidů a postupnému snižování zpětně vazebné inhibici sekrece FSH (Racek, 2006; Průša et al., 2012).

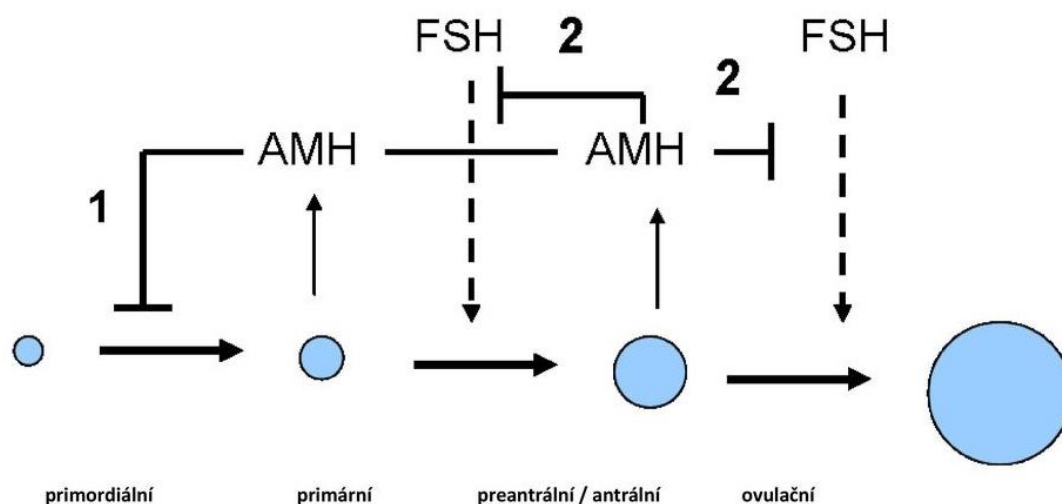
LH je glykoprotein produkovaný gonadotropními buňkami předního laloku hypofýzy. Sekrece LH je regulována centrálně pomocí GnRH, neurotransmitery CNS a periferně působením pohlavních steroidních hormonů. LH působí na buňky ovárií, kde dochází ke stimulaci syntézy steroidů, které jsou následně přeměňovány na E2, za přispění FSH. LH odpovídá za konečné zrání folikulů, vyvolává ovulaci a počáteční vývoj žlutého tělíska se sekrecí progesteronu (Racek, 2006; Průša et al., 2012).

1.2.2.3 Inhibiční funkce AMH

V postnatálním období je hlavní funkcí AMH dozrávání ovariálních folikulů, kdy hraje roli při výběru dominantního folikulu. AMH je produkován v několika stádiích folikulogeneze. AMH se začíná tvořit v granulózových buňkách primárního folikulu, ale největší tvorba probíhá v granulózových buňkách preantrálních a malých antrálních folikulů do průměru 6 mm. Tvorba probíhá do doby, dokud se růst folikulů nestane závislý na FSH. Poté tvorba AMH klesá (Vacek, 2006; Roztočil et al., 2011).

Ve folikulogenezi má inhibiční funkci ve dvou rozdílných stupních. V prvním stupni AMH inhibuje přechod primordiálních folikulů. Tím tak významně reguluje počet folikulů, které zbývají v primordiálním stádiu (Vacek, 2006).

Ve druhém stupni má AMH inhibiční vliv na folikulární citlivost na FSH. Inhibuje stimulaci růstu preantrálních a malých antrálních folikulů hormonem FSH a sehrává tak roli v procesu folikulárního výběru (Visser, 2006).



Obrázek 4 Model působení AMH ve vaječniku

Zdroj: http://docplayer.cz/docs-images/43/996490/images/page_7.jpg (převzato a upraveno)

1.3 Stanovení AMH

V praxi se nejčastěji hladiny hormonů stanovují pomocí imunochemických metod. Tyto metody využívají interakce antigenu se specifickými protilátkami za tvorby imunokomplexu antigen-protilátka-antigen. Antigen je jakákoliv substance, se kterou protilátka specificky interaguje. Protilátkami jsou bílkoviny krevního séra, nejčastěji glykoproteiny, vykazující specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu (Káš et al., 2005).

Možnosti stanovení nebo detekce vzniklého imunokomplexu závisí nejen na charakteru a koncentraci obou reaktantů, ale i na prostředí ve kterém se daná interakce uskutečňuje. Díky vysoké specifitě, citlivosti a relativně snadnému provedení, našly imunochemické metody velké uplatnění v diagnostice humánní a veterinární medicíny (Káš et al., 2005).

1.3.1 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImunnoSorbent Assay) je heterogenní enzymová imunoanalýza. Metoda má několik variant stanovení. Nejčastěji se dělí podle způsobu provedení - kompetitivní a nekompetitivní (tzv. sendvičová) technika. Nebo podle typu použitého antigenu či protilátky - přímá a nepřímá ELISA (Káš et al., 2005).

Koncentrace stanovovaného analytu ve vzorku se zjišťuje vždy z kalibrační křivky sestavené pomocí standardů. Nejčastějším typem pevného nosiče jsou stěny jamek mikrotitračních destiček z polystyrenu. Tyto destičky jsou vhodné pro analýzu většího množství vzorků při screeningu v kontrolních a výzkumných laboratořích. Ke stanovení antigenu jsou nejpoužívanější tři typy uspořádání ELISA (Káš et al., 2005).

1.3.1.1 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza

V analyzovaném vzorku s antigenem reaguje nejprve protilátka, která je zakotvená na pevný nosič. Po ustanovení rovnováhy se celý systém promyje a ve druhé fázi se na antigen, zachycený na protilátce na pevném nosiči, naváže další protilátka značená enzymem. Po dalším promytí se měří enzymová aktivita, která je zprostředkována zachycením na pevnou fázi (Káš et al., 2005).

1.3.1.2 Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

Protilátka na pevném nosiči interaguje s antigenem ve vzorku a současně i se značeným antigenem. Antigeny spolu soutěží o vazebná místa na protilátce. Po ustanovení rovnováhy se systém promyje a měří se enzymová aktivita zachycená na pevné fázi (Káš et al., 2005).

1.3.1.3 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza

Antigen na pevném nosiči soutěží s antigenem ve vzorku o vazebné místo na protilátce přidané v roztoku do systému. Po ustanovení rovnováhy a po promytí se zjišťuje množství zakotvené protilátky v nekompetitivní fázi analýzy. K tomu se používá protilátka proti protilátce, která byla přidána v první fázi (Káš et al., 2005).

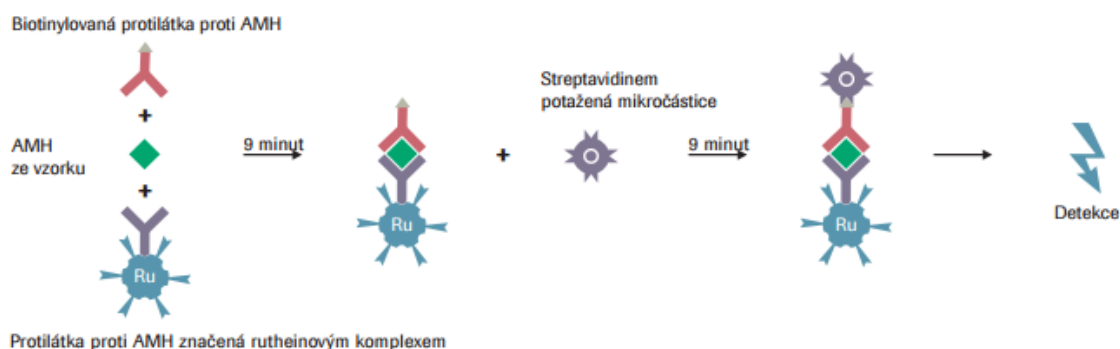
1.3.2 Chemiluminiscence

Patří mezi luminoimunoanalytické metody (LIA) u kterých se pro označení indikátoru používá luminofor. U chemiluminiscence jsou luminofory různé látky. Aby u těchto látek došlo k produkci záření, musí získat podnět na základě chemické reakce. Produkce světla je časově omezena a je tedy nezbytné, aby měření vzorku proběhlo v určitém okamžiku. Chemiluminiscence je přímo úměrná množství analytu tvořícího imunokomplex (Karlíková et al., 2013).

1.3.2.1 Elektrochemiluminiscence

K vyzáření světla indikátoru se využívá elektrický impuls. Reakce probíhá na pevné fázi, která je tvořena magnetickými mikročásticemi s navázaným streptavidinem. Na něj se naváže antigen značený biotinem nebo vychytávací protilátka. Detekční protilátka je značena rutheniovým komplexem. Komplex je převeden do měřicí buňky. Ta obsahuje elektrody, na které je přiveden elektrosignál (Karlíková et al., 2013).

Dochází k oxidaci iontů Ru^{2+} na Ru^{3+} a následně k opětovné redukci na ionty Ru^{2+} . Ionty se přebytečné energie zbavují pomocí luminiscenčního záření. Tato cyklická reakce je podmíněna oxidací a následnou redukcí tripropylaminu (TPA). Jedná se o vratnou reakci a cyklus může být několikrát opakován. Produkce luminiscenčního záření se zvyšuje.



Obrázek 5 Princip stanovení pomocí elektrochemiluminiscence

Zroj: http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Elecsys%20AMH/Elecsys%20AMH%20FactSheet.pdf (převzato a upraveno)

1.4 Hladiny AMH v krvi

Hladina AMH v séru je přímo úměrná počtu antrálních folikulů během časně folikulární fáze a je tak lepším parametrem pro sledování ovariální rezervy než FSH nebo E2 měřené 3. den cyklu. Hladiny AMH se na rozdíl od výše zmíněných ukazatelů nijak významně nemění ani v průběhu menstruačního cyklu, ani mezi následujícími cykly.

Zvýšené hladiny AMH jsou spojovány se syndromem polycystických ovaríí (PCOS), kdy nadbytek folikulů produkuje nadměrné množství AMH. Vysoké hladiny se také objevují u některých typů ovariálních nádorů, nádorů Sertoliho-Leydigových buněk, v některých případech necitlivosti na androgeny a u poruch biosyntézy testosteronu. Snížené hladiny AMH byly pozorovány u některých případů předčasné puberty a předčasné menopauzy.

Hodnoty AMH jsou ukazatelem, zda je počet vajíček u ženy dostatečný a plodnost ženy optimální. Podle typu laboratoře se výsledné hodnoty AMH uvádějí v ng/ml nebo pmol/l. Rovnice pro převod jednotek je: 1 ng/ml = 7,14 pmol/l.

V tabulce č. 1 jsou uvedena referenční hodnoty AMH v séru. Hodnoty < 2,2 ng/ml se u pacientek před IVF považují za slabou odezvu a za velmi nízkou odezvu se v souvislosti s limitem detekce považují hodnoty < 0,3 ng/ml.

	ng/ml	pmol/l
OPTIMÁLNÍ	4,0 – 6,8	28,6 – 48,5
DOSTATEČNÁ	2,2 – 4,0	15,7 – 28,6
NÍZKÁ	0,3 – 2,2	2,2 – 15,7
VELMI NÍZKÁ	< 0,3	< 2,2

Tabulka 1 Referenční hodnoty AMH v séru

1.5 Diagnostické využití AMH

V 70. letech se laboratorní diagnostika AMH prováděla na histologických preparátech a jeho samostatná funkce byla sledována na pokusech *in vivo* na krysích embryích. AMH byl především zkoumán pro svou regulační roli v mužské pohlavní diferenciaci. Náročnost metody neumožnila širší využití v rutinní diagnostice (SangLab, 2012; Mardešić et al., 2013).

Laboratorní diagnostika objevila využití AMH v rutinní diagnostice až v posledním desetiletí. Dnes je stanovení AMH běžně používaná metoda zejména při stanovování individuální ovariální rezervy u žen. S tímto využitím se setkáváme především v IVF centrech, ale v posledních letech roste velký zájem o vyšetření ze strany žen, které plánují těhotenství a mateřství po 30. roku života (SangLab, 2012).

1.5.1 Stanovení ovariální rezervy

Hladiny AMH odrážejí postupný pokles počtu folikulů se zvyšujícím se věkem a tím i stárnutím vaječníků a blížící se menopauzu. Stanovuje se spolu se stanovením FSH, inhibinu B a E2. Pomocí AMH lze rozlišovat ženy s nedostatečnou nebo naopak nadměrnou odpovědí na stimulaci gonadotropiny. Stanovení AMH má v tomto ohledu vyšší senzitivitu a specifitu než hodnoty FSH, inhibinu B a E2 a to z důvodu minimální variability hladin AMH během jednotlivých fází menstruačního cyklu (Mardešić et al., 2013).

AMH se používá jako jeden z nástrojů, které pomáhají odhadnout délku reprodukčního období u žen, odhadnout individuální ovariální stimulaci a posoudit ovariální rezervu u pacientek v souvislosti s již provedeným nebo plánovaným chirurgickým zákrokem na ováriích, u pacientek podstupujících asistovanou reprodukci nebo i u mladých onkologicky nemocných pacientek podstupujících onkologickou léčbu (Mardešić et al., 2013).

1.5.1.1 Stanovení ovariální rezervy u onkologicky nemocných

Chemoterapie a radioterapie redukuje u žen tzv. ovariální rezervu, která je hlavním determinujícím faktorem předčasného ovariálního selhání. Onkologická léčba tak zanechává často trvalé následky mezi které patří nejčastěji právě neplodnost na základě

ireverzibilního poškození gonád. K poškození gonád dochází u 70 - 100 % případů v závislosti na druhu chemoterapie a na počtu podaných cyklů (Huser et al., 2014).

Během onkologické léčby dochází ke zničení poloviny všech primordiálních folikulů. Klinicky se tento stav nijak neprojevuje a u žen dochází k obnovení pravidelného menstruačního cyklu. Po několika letech normální funkce vaječníků však dochází k nástupu předčasné menopauzy. U žen po úspěšné onkologické léčbě proto není vhodné, aby dlouho odkládaly období otěhotnění a mateřství (Huser et al., 2014).

U dospívajících onkologicky nemocných pacientek, které mají dobrou šanci na vyléčení, by měla být zvážena některá z technik reprodukční ochrany. Díky tomu je možné předejít nebo výrazně zmírnit významné poruchy reprodukce způsobené onkologickou léčbou. (Huser et al., 2014)

1.5.1.2 Metody ochrany ovariální funkce

1.5.1.2.1 Kryokonzervace embryí (KET)

KET je metoda, která je technicky dobře zvládnuta a zavedena do praxe. Poškození ovarií bývá většinou nevratné a to v důsledku předem určeného počtu ovariálních folikulů při narození. Destrukce folikulu vede k primární ovariální nedostatečnosti a následné sterilitě. (Huser et al., 2014)

Provedení této metody je limitováno několika podmínkami. Je třeba podstoupit tuto metodu v časném stádiu onkologického procesu, s čímž souvisí i dobrý zdravotní stav pacientky, který dovolí odsunutí zahájení onkologické léčby o 3 - 4 týdny. Pacientky podstupují ovariální stimulaci gonadotropiny s následným odběrem oocytů. Dalším požadavkem je existence partnera pacientky a jeho písemný souhlas s provedením IVF-cyklu a poskytnutí spermií k oplození oocytů pacientky. Pokud pacientka partnera nemá, nelze tuto metodu využít. (Huser et al., 2014)

1.5.1.2.2 Kryokonzervace ovariální tkáně (KOT)

KOT je metoda představující jedinou možnost reprodukční ochrany pacientek kde nelze oddalovat zahájení onkologické léčby, pro riziko progresu onemocnění. Tato metoda spočívá v odběru ovariální tkáně kortexu a v jejím zachování do doby, kdy je onkologické onemocnění pacientky trvale vyléčeno (Huser et al., 2014)

Tkáň ovariálního kortexu obsahuje primordiální folikuly a po rozmrazení může být transplantována zpět do organismu pacientky nebo může být využita ke kultivaci primordiálních folikulů in vitro. Transplantovaná tkáň zajišťuje u žen fertilitu po onkologické léčbě, ale nemůže dlouhodobě zajistit menstruační a ovulační cyklus. (Huser et al., 2014)

1.5.2 Diagnostika a léčba ovariálních nádorů

U nádorů granulózových buněk vaječníků jsou hladiny AMH zvýšeny. AMH lze tedy využít i jako velmi citlivý a specifický nádorový ukazatel u nádorů, které vycházejí z granulózových buněk. Používá se také při sledování pacientek po odstranění ovarii. U žen postižených nádorem jsou hladiny mnohonásobně vyšší než u zdravých žen. (Slezáková, 2007; Mačák et al., 2012)

1.5.3 Diagnostika a sledování syndromu polycystických ovarii

PCOS jsou oboustranně zvětšená ovaria, v jejichž kůře se objevuje řada cystických dutin. V okolí cyst se vyskytuje kortikální fibróza. U PCOS dochází k nízké produkci estrogenů, ale naopak dochází k nadprodukcí androgenů. Klinicky se onemocnění projevuje poruchami menstruačního cyklu (oligomenorea nebo amenorea). Pokud je menstruační cyklus pravidelný je anovulační, tzn., že nedochází k ovulaci. Dalším projevem je sterilita (Mačák et al., 2012; Schneiderová, 2014).

PCOS je diagnostikován u 5 - 10 % žen v reprodukčním věku a bývá spojován zejména s metabolickými poruchami. Ženy s PCOS mají v ovarii až šestkrát vyšší počet folikulů než zdravé ženy. Tím je zvýšena i produkce AMH. Hladiny AMH u žen s PCOS klesají pomaleji než u žen s normálním ovulačním cyklem (Steffen et al., 2010; Mačák et al., 2012).

Po chirurgické léčbě ovarii, kdy se odstraní až polovina jejich objemu, dochází u žen v 80 % k úpravě cyklu a až 50 % žen může po tomto zákroku otěhotnět (Schneiderová, 2014).

1.5.4 Diagnostika ovariálního hyperstimulačního syndromu

Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) je potenciale ohrožující stav projevující se přehnanou odpovědí vaječníků u žen podstupujících hormonální řízenou stimulaci

(COS). Vaječníky se stimulují gonadotropiny a ovulace se provokuje pomocí hCG. Cílem hormonální stimulace je získání více vajíček k oplodnění (Vacek, 2006; Kučera, 2013).

Symptomy se mohou rozvinout už během ovariální stimulace. Na rozvoji se podílí zvětšení vaječníků způsobené velkým počtem folikulů s následným vznikem cyst a edémů stomatu. U většiny žen má OHSS lehký průběh a v ojedinělých případech může vyústit v náhlý stav ohrožující pacientku (Weiss, 2010; Kučera, 2013).

Preventivním opatřením OHSS je sonografické stanovení počtu antrálních folikulů a stanovení hladiny AMH před volbou IVF stimulačního protokolu. Podle koncentrace AMH je možné predikovat ovariální odpověď na stimulaci gonadotropiny a volit jejich dávku (Trávník, 2015).

U pacientek se zvýšeným rizikem OHSS je důležité zvolit místo klasického spouštění dozrávání folikulu pomocí hCG, spouštění analogem GnRH (Trávník, 2015).

2 Cíle práce

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo především shrnutí již existujících poznatků, které byly o AMH a o jeho možném klinickém využití u žen publikovány.

V praktické části této bakalářské práce bylo hlavním cílem zhodnocení naměřených koncentrací AMH v séru pomocí metody ELISA. Všechny vzorky byly měřeny na ÚLCHKB 2. LF UK a FN Motol. Naměřené hodnoty byly poté rozděleny do čtyř skupin. Hodnoceny byly skupiny těchto pacientek: onkologicky nemocné pacientky ve věku 20 - 29 let a zdravá populace ve věku 20 - 29 let, 30 - 42 let a s věkem nad 43 let. Dalším cílem bylo z naměřených a zpracovaných dat poukázat na význam stanovení AMH v klinické praxi. A dále porovnání dvou klinických metod, které se běžně používají pro stanovení AMH.

3 Metodika

3.1 Přístroje a pomůcky

- automatické pipety jedno a vícekanálové (Finnpipette™)
- špičky k pipetám (Finntip)
- třepačka na promíchávání vzorků
- promývačka HydroFlex (TECAN, Švýcarsko)
- destičkový spektrofotometr Sunrise s filtry 340 nm, 450 nm a 620 nm (TECAN, Švýcarsko), pro ovládání spektrofotometru z počítače a vyhodnocení naměřených dat byl použit software Magellan™
- souprava reagensů AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter Inc., USA, kat. č. A79765)
- souprava kalibrátorů a kontrolních roztoků AMH Gen II Calibrators and Controls (Beckman Coulter Inc., USA, kat. č. A79766)
- plastové nebo skleněné zkumavky

3.2 Reagencie, kalibrátory a kontroly

Reagencie obsažené v soupravě AMH Gen II ELISA (Beckman Coulter Inc., USA, kat. č. A79765).

- Anti-AMH Gen II Antibody Coated Microtitration Strips – potahované stripy, individuálně vyjímatelné destičky o formátu 96 jamek (12x8 suchých jamek potažených myší monoklonální protilátkou proti AMH třídy IgG), vše je zabaleno v uzavíratelném sáčku se sušícím přípravkem a připraveno k použití
- AMH Gen II Sample Diluent – roztok na ředění vzorků; tlumivý roztok s hovězím sérovým albuminem (BSA), stabilizačním činidlem a azidem sodným
- AMH Gen II Antibody-Biotin Conjugate – roztok obsahující biotinylovanou protilátku proti AMH v tlumivém roztoku s proteiny, stabilizačním činidlem a azidem sodným

- Streptavidin-Enzyme Conjugate – konjugát streptavidinu kovalentně vázaný s křenovou peroxidázou (HRP) v pufru se směsí myších a hovězích proteinů, stabilizačních činidel a azidu sodného
- AMH Gen II Assay Buffer – tlumivý roztok, pufr s BSA, stabilizačními činidly a azidem sodným
- TMB Chromogen Solution – chromogenní substrátový roztok TMB (3,3',5,5 - tetramethylbenzidin) v citrátovém tlumivém roztoku s peroxidem vodíku a stabilizátory pro detekci peroxidázové aktivity
- Wash Concentrate I – koncentrát promývacího roztoku, obsahuje pufrovaný fyziologický roztok s neionogenním detergentem, před použitím naředit 1 díl Wash Concentrate I s 9 díly deionizované vody. Takto připravený roztok je stabilní při teplotě 25 °C přibližně 1 měsíc
- Stopping Solution A – zastavovací roztok obsahující 0,2 M kyselinu sírovou

Kalibrační a kontrolní roztoky AMH Gen II Calibrators and Controls (Beckman Coulter Inc., USA, kat. č. A79766).



Obrázek 6 Kit AMH Gen II ELISA
 Zdroj: http://www.beckmancoulter-amh.com/en/wp-content/uploads/High_Res_Boxen-1024x436.png

3.3 Měření AMH

V roce 2014 byla na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol zavedena metoda na stanovení AMH, která byla úspěšně validována.

S každou sérií vzorků probíhá i stanovení kontrol kvality na dvou koncentračních hladinách. Hladina 1 s deklarovanou koncentrací 2,5 ng/ml měla průměrnou hodnotu 2,20 ng/ml. Hladina 2 s deklarovanou koncentrací 8,0 měla průměrnou hodnotu 7,34 ng/ml. Ostatní statistické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

ng/ml	HLADINA 1 (n=19)	HLADINA 2 (n=19)
ARITMETICKÝ PRŮMĚR	2,20	7,34
SD	0,12	0,46
VARIAČNÍ KOEFCIENT (%)	5,47	6,24
BIAS (%)	11,85	8,27

Tabulka 2 Hodnoty kontrol kvality

3.3.1 Preanalytická fáze

Ke stanovení AMH se používá sérum odebrané standardní odběrovou soustavou a je třeba odebrat minimálně 2 ml krve. Vzorek krve by měl být odebírán mezi 6 - 8 hodinou ranní. Pro odběr krve na stanovení AMH se používají zkumavky s červeným uzávěrem, které obsahují akcelerátor hemokoagulace. Nesmí se používat zkumavky s EDTA. Po odběru je vzorek dopraven do laboratoře, kde je náležitě označen a zpracován. Vzorky uchované a uzavřené při 5 - 7 °C v lednici s monitorovacím režimem je nutno zpracovat do 48 hodin.

Pro delší skladování se vzorky uchovávají při -20 °C až po dobu 8 týdnů. Již jednou rozmražený vzorek nelze opětovně mrazit. K analýze nelze použít silně lipemické nebo hemolytické vzorky.

3.3.2 Pracovní postup

Souprava, kalibrátory, kontroly a vzorky jsou před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu.

Kontroly, kalibrátory a vzorky jsou před použitím naředěny pufrům potřebným pro analýzu (Assay pufr). Do odpovídajících zkumavek je pipetováno 300 μ l Assay pufru a poté je přidáno 60 μ l kontroly, kalibrátoru nebo vzorku. Vše je dobře promícháno a podle pipetovacího protokolu je připraven příslušný počet stripů, do kterých je napipetováno 120 μ l naředěných kontrol, kalibrátorů a vzorků. Následuje inkubace 1 hodinu za stálého třepání (600 - 800 rpm) při laboratorní teplotě. Po inkubaci je vše promyto. Promývací krok je opakován vždy 5x. Každá jamka je promývána 400 μ l připraveného promývacího roztoku na promývače. V posledním kroku promývacího cyklu je promývací roztok odsán a destička je poté obrácena na buničitou vatu, aby byly odstraněny poslední zbytky promývacího roztoku.

Do každé jamky je pomocí nastavitelné opakovací pipety přidáno 100 μ l roztoku biotinem značené protilátky. Následuje inkubace 1 hodinu za stálého třepání při laboratorní teplotě. Po následném promytí a odstranění zbytků promývacího roztoku je do všech jamek pipetováno 100 μ l konjugátu streptavidinu-HRP. Inkubace probíhá po dobu 30 minut za stálého třepání při laboratorní teplotě.

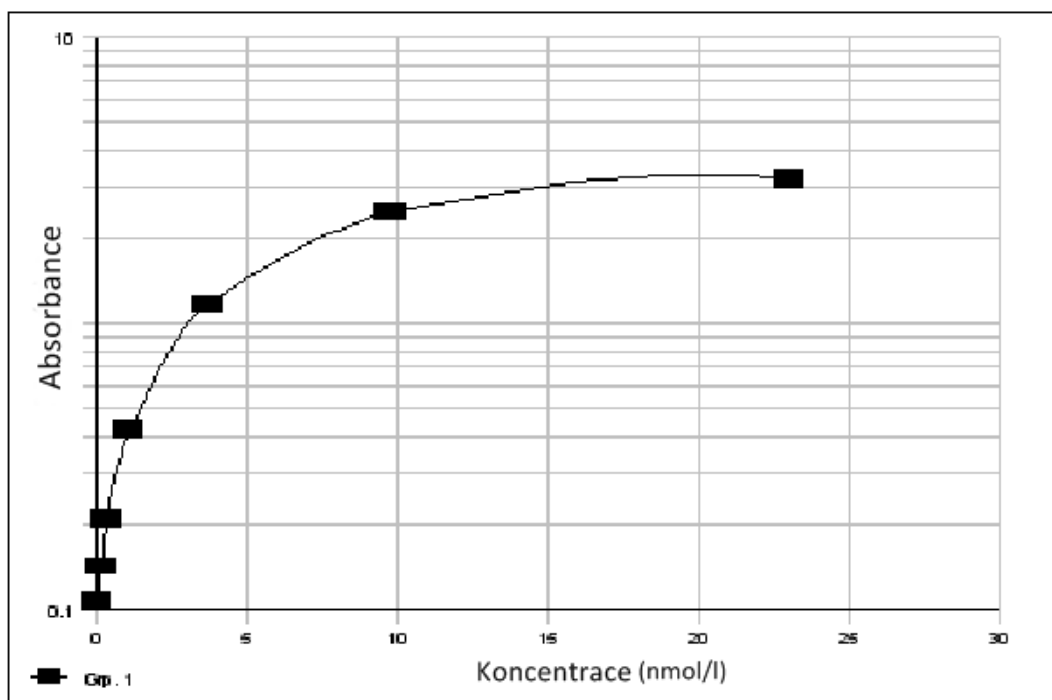
Po inkubaci a následném promytí je do všech jamek pipetováno 100 μ l substrátu TMB. Barevná reakce, která je vyvolána přidáním TMB probíhá zhruba 8 - 12 minut, podle intenzity vznikajícího modrého zbarvení. Inkubace probíhá na třepače při laboratorní teplotě ve tmě. Reakce je zastavena přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku. Měření absorbance při 450 nm je možné provést do 30 minut po přidání zastavovacího činidla.

3.3.3 Vyhodnocení výsledků

Kalibrátory jsou dodávány v 7 koncentračních hladinách o rozsahu kalibrační křivky 0,16 - 22,5 μ g/l. Kalibrátory a kontroly je třeba uchovávat zamražené při -20 °C. Pomocí dodávaných kontrolních vzorků v soupravě AMH Gen II (kat. č. A79766) byla vypočítána reprodukovatelnost metody viz tabulka č. 2. Obě kontroly byly pipetovány do jamek mikrotitrační destičky a byly zpracovány spolu se

vzorky séra pacientek. Výsledky koncentrací AMH byly měřeny spektrofotometricky a vyhodnoceny pomocí softwaru Magellan™. Pomocí kalibrační křivky, která byla softwarem vytvořena, byly vypočítány koncentrace AMH ve vzorcích séra.

Limit detekce metody byl stanoven na 0,17 ng/ml. Hodnoty koncentrace < 0,17 ng/ml byly ve všech tabulkách a grafech zpracovávány jako hodnota limitu detekce.



Obrázek 7 Kalibrační křivka AMH

4 Výsledky

V této bakalářské práci byly pomocí metody ELISA změřeny hladiny AMH ve vzorcích séra onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let a zdravé populace ve třech věkových kategoriích. Vzorky použité v této práci byly přijaty a zpracovány na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol. V této práci byly použity hodnoty, které byly naměřeny od roku 2014 do roku 2016. Na měření vzorků v roce 2016 jsem se sama podílela a data z předchozích let byla převzata z laboratorního informačního systému (LIS) na ÚLCHKB 2. LF UK a FN Motol.

Naměřené hodnoty byly následně rozděleny do čtyř skupin. První skupina byla tvořena onkologicky nemocnými pacientkami ve věku 20 - 29 let s nejčastějším výskytem těchto diagnóz: akutní lymfoblastická leukémie (ALL), akutní myeloidní leukémie (AML), zhoubný novotvar (ZN) – dlouhé kosti dolní končetiny, ZN – ovarií. Další tři skupiny byly tvořeny zdravou populací. Zdravá populace byla podle věku rozdělena na tyto tři skupiny: 20 - 29 let, 30 - 42 let a s věkem nad 43 let. Ve skupině onkologicky nemocných bylo 165 pacientek. Zdravá populace ve věku 20 – 29 let zahrnovala 128 žen, ve věku 30 – 42 let 483 žen a ve věku nad 43 let 38 žen.

Všechny naměřené a převzaté hodnoty AHM byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA) a Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

U všech testovaných skupin byla hodnocena normalita rozložení dat. Všechna data byla rozložena nerovnoměrně. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly posuzovány testem Kruskal-Wallis a následně Mann-Whitneyho testem. Dále byla pro každou skupinu stanovena minimální a maximální hodnota, průměr, medián, střední chyba mediánu (SEM) a směrodatná odchylka (SD).

4.1 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (20 – 29 let)

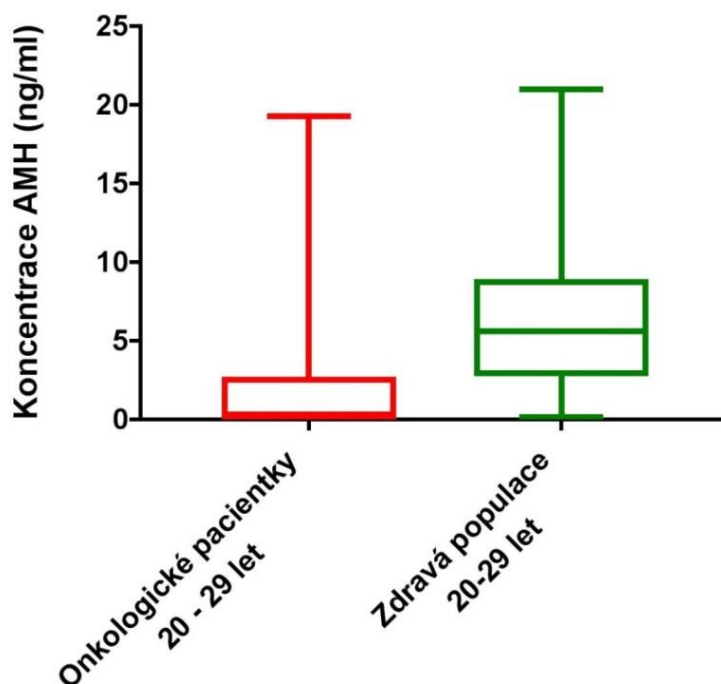
V tabulce č. 3 jsou uvedeny hodnoty onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let a hodnoty zdravé populace ve věku 20 - 29 let. Medián výsledků AMH onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let je 0,35 ng/ml. Medián zdravé populace ve věku 20 - 29 let je 5,64 ng/ml. Pro tyto dvě skupiny byla hodnocena rozdílnost dat. Byl

použit Mann-Whitney test, který dokázal, že výsledky měření jsou statisticky významně rozdílné. Hodnota p-value je $<0,0001$.

ng/ml	ONKOLOGICKÉ PACIENTKY (20 – 29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (20 – 29 let)
MEDIÁN	0,35	5,64
SEM	0,20	0,45
P-HODNOTA	$< 0,0001$	

Tabulka 3 Porovnání hodnot AMH u onkologicky nemocných patientek a zdravé populace (věkové rozmezí 20 – 29 let); (medián, SEM a hodnota významnosti p-value)

Obrázek č. 8 ukazuje porovnání dat mezi skupinou onkologických patientek a zdravou populací ve věku 20 - 29 let. Na grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu a rozsah minimálních a maximálních hodnot u testovaných skupin.



Obrázek 8 Porovnání dat AMH onkologických patientek ve věku 20 – 29 let a zdravé populace ve věku 20 – 29 let (medián, mezikvartilové rozpětí)

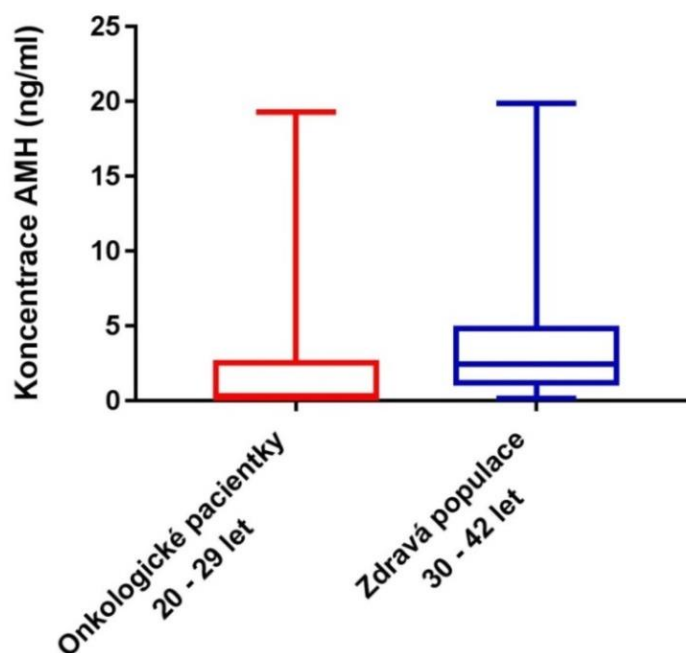
4.2 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (30 - 42 let)

V tabulce č. 4 jsou uvedeny hodnoty onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let a hodnoty zdravé populace ve věku 30 - 42 let. Medián výsledků AMH onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let je 0,35 ng/ml. Medián zdravé populace ve věku 30 - 42 let je 2,46 ng/ml. U těchto dvou testovaných skupin byla hodnocena rozdílnost dat. Byl použit Mann-Whitney test, který dokázal, že výsledky měření jsou statisticky významně rozdílné. Hodnota p-value je <0,0001.

ng/ml	ONKOLOGICKÉ PACIENTKY (20 – 29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (30 – 42 let)
MEDIÁN	0,35	2,46
SEM	0,20	0,16
P-HODNOTA	< 0,0001	

Tabulka 4 Porovnání hodnot AMH u onkologicky nemocných pacientek a zdravé populace (30 – 42 let); (medián, SEM a hodnota významnosti p-value)

Obrázek č. 9 ukazuje porovnání dat mezi skupinou onkologických pacientek ve věku 20 - 29 let a zdravou populací ve věku 30 - 42 let. Na grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu a rozsah minimálních a maximálních hodnot u těchto dvou testovaných skupin.



Obrázek 9 Porovnání dat AMH onkologických pacientek ve věku 20 – 29 let a zdravé populace ve věku 30 – 42 let (medián, mezikvartilové rozpětí)

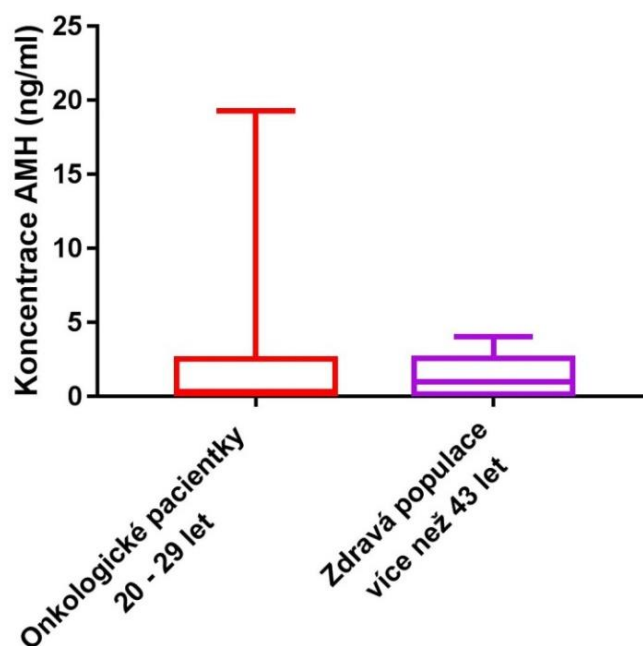
4.3 Porovnání výsledků onkologicky nemocných a zdravé populace (nad 43 let)

V tabulce č. 5 jsou uvedeny hodnoty onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let a hodnoty zdravé populace s věkem nad 43 let. Medián výsledků AMH onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let je 0,35 ng/ml. Medián výsledků u zdravých pacientek s věkem nad 43 let je 0,10 ng/ml. Pro tuto skupinu byla hodnocena rozdílnost dat. Data jsou statisticky významně rozdílná. Byl použit Mann-Whitney test, který dokázal, že výsledky měření nejsou statisticky významně rozdílné. Hodnota p-value je 0,1642.

ng/ml	ONKOLOGICKÉ PACIENTKY (20 – 29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (nad 43 let)
MEDIÁN	0,35	0,10
SEM	0,20	0,20
P-HODNOTA	0,1642	

Tabulka 5 Porovnání hodnot AMH u onkologicky nemocných pacientek a zdravé populace (nad 43 let); (medián, SEM a hodnota významnosti p-value)

Obrázek č. 10 ukazuje porovnání dat mezi skupinou onkologických pacientek ve věku 20 - 29 let a zdravou populací s věkem nad 43 let. Na grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu a rozsah minimálních a maximálních hodnot u testovaných skupin.



Obrázek 10 Porovnání dat AMH onkologických pacientek ve věku 20 – 29 let a zdravé populace ve věku nad 43 let (medián, mezikvartilové rozpětí)

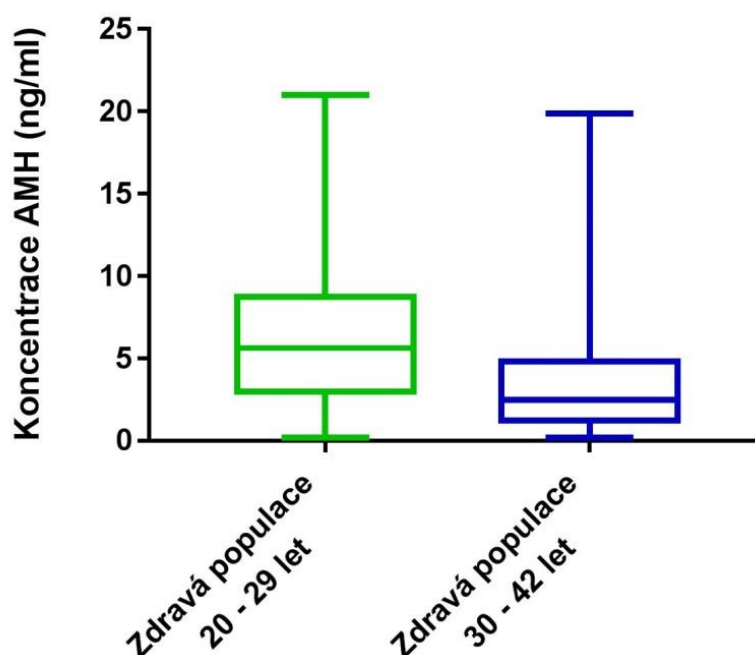
4.4 Porovnání výsledků zdravé populace (20 - 29 let) a zdravé populace (30 - 42 let)

V tabulce č. 6 jsou uvedeny hodnoty AMH zdravé populace ve věku 20 - 29 let a hodnoty zdravé populace ve věku 30 - 42 let. Medián výsledků AMH zdravé populace ve věku 20 - 29 let je 5,64 ng/ml. Medián výsledků zdravé populace ve věku 30 - 42 let je 2,46 ng/ml. Byl použit Mann-Whitney test. Data jsou statisticky významně rozdílná. Hodnota p-value je < 0,0001.

ng/ml	ZDRAVÁ POPULACE (20 – 29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (30 – 42 let)
MEDIÁN	5,64	2,46
SEM	0,45	0,16
P-HODNOTA	< 0,0001	

Tabulka 6 Porovnání hodnot AMH u zdravé populace (20 – 29 let) a zdravé populace (30 – 42 let); (medián, SEM a hodnota významnosti p-value)

Obrázek č. 11 ukazuje porovnání dat mezi skupinou zdravé populace ve věku 20 - 29 let a zdravou populací ve věku 30 - 42 let. Na grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu a rozsah minimálních a maximálních hodnot u testovaných skupin.



Obrázek 11 Porovnání dat AMH zdravé populace ve věku 20 -29 let a zdravé populace ve věku 30 – 42 let (medián, mezikvartilové rozpětí)

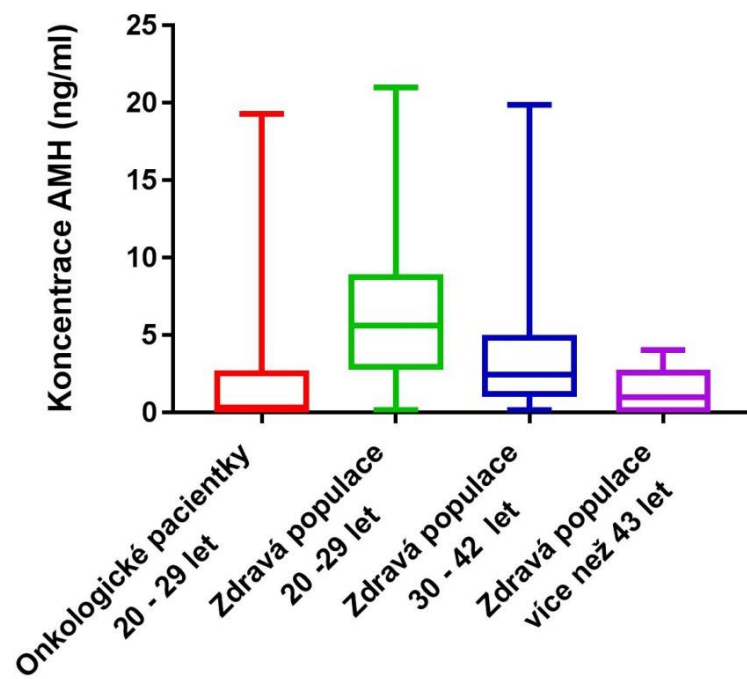
4.5 Porovnání výsledků všech testovaných skupin pacientek

V tabulce č. 7 jsou shrnuty hodnoty AMH naměřené u všech čtyř testovaných skupin. Medián výsledků AMH onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let je 0,35 ng/ml. Medián výsledků u zdravé populace ve věku 20 - 29 let je 5,64 ng/ml. Medián výsledků zdravé populace ve věku 30 - 42 let je 2,46 ng/ml. Medián výsledků zdravé populace s věkem nad 43 let je 0,10 ng/ml. Byl použit Kruskal-Wallis test, který potvrdil statisticky rozdílné hodnoty mediánu. Hodnota p-value je <0,0001.

ng/ml	ONKOLOGICKÉ PACIENTKY (20-29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (20-29 let)	ZDRAVÁ POPULACE (30-42 let)	ZDRAVÁ POPULACE (nad 43 let)
MIN	0,17	0,17	0,17	0,17
MAX	19,31	21,00	19,87	4,04
MEDIÁN	0,35	5,64	2,46	0,10
PRŮMĚR	1,64	6,76	3,58	1,43
SEM	0,20	0,45	0,16	0,20
SD	2,55	5,05	3,47	1,26

Tabulka 7 Porovnání hodnot AMH u všech sledovaných skupin – onkologické pacientky 20 – 29 let, zdravá populace 20 – 29 let, zdravá populace 30 – 42 let a zdravá populace starší 43 let. (Minimální (MIN) a maximální (MAX) hladina, medián, průměr, SEM (standardní chyba mediánu) a směrodatná odchylka (SD)).

Obrázek č. 12 ukazuje porovnání dat u všech čtyř testovaných skupin. Na grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu a rozsah minimálních a maximálních hodnot u jednotlivých skupin. Z obrázku je na první pohled patrné, že nejvyšší hodnota mediánu je u skupiny zdravé populace ve věku 20 – 29 let, kde jsme tento výsledek očekávali. Nejnižší hodnota mediánu byla prokázána u onkologicky nemocných ve věku 20 -29 let, kde se dal tento výsledek očekávat vzhledem k náročnosti léčby dané skupiny.



Obrázek 12 Porovnání dat AMH u všech testovaných skupin (medián, mezikvartilové rozpětí)

5 Diskuze

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zhodnocení výsledků hladin AMH naměřených u onkologicky nemocných pacientek a u zdravé populace. Vzorky byly získány a měřeny na ÚLCHKB 2. LF UK a FN Motol. Na měření vzorků během roku 2016 jsem se sama podílela a data naměřená v předchozích letech byla převzata z LIS na ÚLCHKB. Z celkového počtu naměřených vzorků byla vybrána skupina onkologicky nemocných pacientek ve věku 20 - 29 let, která byla následně porovnávána se třemi věkovými skupinami zdravé populace.

Naměřené hodnoty u zdravé populace potvrzují, že hladiny AMH v krvi postupně klesají se vzrůstajícím věkem ženy. To může být u každé ženy individuální v závislosti na počtu vajíček, se kterými se žena narodí. Nejvyšší hladiny AMH zdravé populace byly prokázány u žen v tzv. reprodukčním věku a to mezi 20 - 27 lety (Kučera et al., 2013).

Ve skupině onkologicky nemocných pacientek byly hodnoty hladin AMH velmi nízké a u některých pacientek byly hodnoty pod detekčním limitem. U některých pacientek s karcinomem granulózových buněk ovarií (GCT), které podstoupily resekci, byly prokázány zvýšené nebo normální sérové koncentrace AMH (Gustafson et al., 1992). Naopak u žen s výskytem metastatického epitelálního karcinomu ovaria jsou hodnoty AMH nedetekovatelné. Pozdější studie ukázaly, že AMH je jako nádorový ukazatel omezen na GCT, u pacientek s jinými gynekologickými nádory byly v 93 % hladiny AMH normální (Rey et al., 1996). Vzhledem k nízkému počtu pacientek s těmito diagnózami nebylo možné tuto studii potvrdit. V této práci se díky naměřeným hladinám AMH potvrdilo, že u onkologicky nemocných pacientek jsou hladiny AMH nejnižší ze všech testovaných skupin, přestože se jednalo o skupinu žen v reprodukčním věku. U těchto onkologicky nemocných pacientek se nepodařilo naměřit hladiny AMH před onkologickou léčbou a po léčbě, pro lepší porovnání jak se hladiny AMH mění v závislosti na léčbě.

Autoři La Marca et al. ve své studii z roku 2013 potvrdili, že u zdravé populace se hladiny AMH se výrazně nemění během menstruačního cyklu. V klinické praxi lze tak hladiny tohoto hormonu měřit nezávisle na cyklické fázi. Dále poukázali i na drobné výkyvy v úbytku AMH v různých podmínkách, např. v těhotenství, kdy dochází k relativnímu klidovému stavu vaječníků. Dochází tak k poklesu populace folikulů

sekretujících AMH. Významný pokles hladin AMH je ve 2. a 3. trimestru (La Marca et. al., 2013).

Lie Fong et. al. hodnotila sérové hladiny AMH u zdravé populace žen od narození do konce reprodukčního období. Hladiny AMH vzrostly do 15 let, poté zůstaly do 20 let stabilní. Od 25 let se hladiny postupně snižovaly s rostoucím věkem. Folikulární dynamika v dětském věku se liší od dynamiky v dospělém věku (Lie Fong et. al., 2012).

U pacientek s hematologickými maligními onemocněními je ovariální rezerva ohrožena ještě před zahájením chemoterapie. Ve studii z roku 2008 autoři uvádějí, že u testované skupiny 37 pacientek s leukémií byly hladiny AMH před zahájením léčby nižší než u kontrolní skupiny přestože byla ve vyšším věku. (Lie Fong et al., 2008)

V další studii z roku 2005, bylo testováno 22 onkologicky nemocných pacientek. Autoři této studie dospěli k výsledku, že u některých onkologicky nemocných pacientek se ještě před zahájením léčby vyskytlo ovariální selhání bez ohledu na věk a koncentrace AMH v séru u těchto pacientek nebyly detekovatelné (Schmidt et al., 2005).

V této práci bylo hodnoceno 165 pacientek s onkologickým onemocněním. Z těchto naměřených a vyhodnocených dat se nám podařilo potvrdit obě tyto studie. Onkologicky nemocné pacientky mají nižší ovariální rezervu než zdravé ženy ve vyšším věku.

Dalším cílem bylo porovnat dvě metody používané ke stanovení hladin AMH v klinické praxi. V současné době se pro stanovení hladin AMH využívají metody ELISA a ECLIA. Metoda ELISA je časově náročná. Doba trvání jednoho stanovení jsou přibližně 3 hodiny a jsou zde kladeny nároky na laboranta a jeho zkušenost, zručnost a pečlivost. Velkou nevýhodou je také to, že se měření neprovádí často a čeká se na shromáždění více vzorků, které se následně připravují a měří najednou po větších sériích.

Princip ECLIA využila firma Roche u svých automatizovaných analyzátorů. Výhodou této metody je její plná automatizace a krátké reakční časy. Celá analýza pomocí tohoto postupu trvá zhruba 18 minut. Díky tomu se hladiny AMH mohou měřit průběžně. Vzhledem k malému množství séra u některých pacientek nebylo možné vzorky séra pacientek změřit pomocí této metody na automatickém analyzátoru, a proto nebylo možné obě metody mezi sebou porovnat.

Dalším cílem práce bylo poukázat na význam stanovení hladin AMH v klinické praxi. V současnosti se stanovení hladin AMH využívá zejména ke stanovení ovariální rezervy u pacientek podstupujících IVF a jedná se o citlivý ukazatel odpovědi na hormonální stimulaci (Huser *et al.*, 2014). Hodnoty AMH přímo korelují s počtem získaných oocytů (Kučera *et al.*, 2013). Chemoterapie i radioterapie ovariální rezervu redukuje a to je hlavním faktorem předčasného ovariálního selhání (Huser *et al.*, 2014).

Stanovení hladin AMH hraje velkou roli i u pacientek s PCOS. U žen s PCOS jsou hladiny AMH až o 75 % vyšší než u zdravé populace (Kučera *et al.*, 2013). Stanovení se provádí jak k diagnostice PCOS, tak i kvůli případné stimulaci gonadotropiny při IVF, kde by mohlo dojít k OHSS.

Některé studie uvádějí i možnosti použití AMH jako chemoterapeutického činidla u epiteliálních karcinomů ovarií. Epiteliální nádory pocházejí ze stejného embryonálního prekursoru na povrchu ovaria, kde se indukuje i regrese Müllerových vývodů (La Marca *et al.*, 2006b). Bylo prokázáno, že AMH vazbou na receptor inhibuje růst nádorových buněk (Ha *et al.*, 2000; Stephen *et al.* 2001).

6 Závěr

Tato práce se zabývá stanovením AMH ve vzorcích onkologických pacientek a zdravé populace. Všechny vzorky byly měřeny na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol. Během roku 2016 jsem se na měření sama podílela a data z předchozích let (2014 – 2015) byla převzata z LISu. Celkem bylo analyzováno 814 patientských vzorků pomocí diagnostické soupravy AMH Gen II od firmy Beckman Coulter.

Zdravá populace byla podle věku rozdělena do tří skupin. Všechny naměřené hodnoty zdravé populace byly následně porovnány s hodnotami onkologických pacientek. Z naměřených dat je patrné, že hladiny AMH se vzrůstajícím věkem ženy klesají. U zdravé populace ve věku 20 – 29 let byly prokázány nejvyšší hodnoty AMH, naopak u zdravé populace s věkem nad 43 let byly hodnoty AMH nižší.

Ze všech čtyř testovaných skupin vykazovaly nejnižší hodnoty AMH onkologické pacientky, přestože se jednalo o ženy v reprodukčním věku.

V současné době se v klinické praxi ke stanovení anti-Müllerova hormonu používají dvě imunoanalytické metody. V praxi je nejčastěji využívána metoda ELISA. Její nevýhodou je však časová náročnost a nutnost zpracování většího počtu vzorků. Druhá, plně automatizovaná, metoda ECLIA není zatím tolik využívána jako metoda ELISA z důvodu finanční náročnosti tohoto stanovení. Mezi její výhody patří především kratší inkubační časy a možnost průběžného analyzování vzorků.

Z technických důvodů nebylo možné vzorky změřit metodou ECLIA a lépe tak obě metody porovnat mezi sebou.

Stanovení AMH se využívá zejména ke stanovení ovariální rezervy u žen před IVF a onkologicky nemocných pacientek. Dále se využívá k diagnostice ovariálních nádorů vycházejících z granulózových buněk a k diagnostice a sledování PCOS a OHSS.

7 Seznam použité literatury

1. AMH Elecsys®, firma Roche [cit. 2017-7-10] Dostupné online: http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Elecsys%20AMH/Elecsys%20AMH%20FactSheet.pdf
2. AMH Gen II ELISA, firma Beckman Coulter [cit. 2017-7-15] Dostupné online: http://static.bioport.cn/data/upload/product/specification/425/1346682446526_425604.pdf
3. Anti-Müllerian hormone, firma Beckman Coulter [cit. 2017-7-15] Dostupné online: <http://www.beckman.cz/Media/Default/Dx/amh/BR-14059C%20Anti-Mullerian%20Hormone%20-%20AMH%20Final%20Red.pdf>
4. Anti-Müllerův hormon. 2016. *CEVA Education*. [cit. 2017-3-10] Dostupné online: <https://www.ceva-edu.cz/mod/book/view.php?id=5386&chapterid=2330>
5. BAJČIOVÁ, V. *Nádory ovarii u dětí a adolescentních dívek*. Onkologie, 2014, roč. 8, č. 2. (s. 54-60) [cit. 2017-3-10] Dostupné online: <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/02/03.pdf>
6. BROEKMANS, F. J., VISSER, J. A., LAVEN, J. S., et. al. *Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction*, Trends in Endocrinology & Metabolism, 2008, roč. 19, č. 9 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: https://www.researchgate.net/profile/Axel_Themmen/publication/23270845_AntiMullerian_hormone_and_ovarian_dysfunction/links/00463518785e4b822000000.pdf

7. FONG LIE, S., LUGTENBURG, P. J., SCHIPPER, I., et al., *Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies*. Human Reproductive, Oxford University Press, 2008, roč. 23, č. 3 (s. 674 – 678) [cit. 2017-7-25]
Dostupné online: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dem392>
8. FONG LIE, S., VISSER, J. A., WELT, C. K., et. al., *Serum Anti-Müllerian hormone levels in healthy females: A nomogram ranging from infancy to adulthood*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012, roč. 97, č. 12 (s. 4650 – 4655), [cit. 2017-7-25] Dostupné online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683801/>
9. HA, T. U., SEGEV D. L., BARBIE, D., et al., *Müllerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism*, The Journal of Biological Chemistry, 2000 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <http://www.jbc.org/content/275/47/37101.full> Ha 2000
10. HAGEN, C. P., AKSGLAEDE, L., MAIN, K. M., et. al. *Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010, roč. 95, č. 11 (s. 5003 – 5010) [cit. 2017-7-25] Dostupné online: https://www.researchgate.net/publication/45707820_Serum_Levels_of_AntiMullerian_Hormone_as_a_Marker_of_Ovarian_Function_in_926_Healthy_Females_from_Birth_to_Adulthood_and_in_172_Turner_Syndrome_Patients
11. HAMPL, R., ŠNAJDEROVÁ, M., MARDEŠIĆ, T., *Anti-Müllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve*, Physiological Research, Praha: Institute of Physiology, 2011, ISSN 1802-9973 [cit. 2017-3-10] Dostupné online: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/60/60_217.pdf

12. HUSER, M., JURÁNKOVÁ, E., VENTRUBA, P., et al. *Možnosti ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících chemoterapii pro hematologickou malignitu*. Praktická gynekologie. Brno: Medica Publishing and Consulting, 2005, roč. 9, č. 1. ISSN 1211-6645 (s. 6-8) [cit. 2017-7-10] Dostupné online: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=pg_05_01_01.pdf
13. HUSER, M., CRHA, I., ŽÁKOVÁ, J. *Reprodukční ochrana u dospívajících dívek s maligním onemocněním*. Onkologie, 2014, roč. 8, č. 2. (s. 12-14) [cit. 2017-3-10] Dostupné online z: <http://www.ivfbrno.cz/2014-huser-reprodukcniochrana-u-dospivajicich-divek.../f1122>
14. KARLÍKOVÁ, M., (ed.) *Využití biomarkerů v gynekologii a reprodukční endokrinologii*, 2012. ISBN 978-80-263-0410-4 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <http://imunokurzy.cz/studijni-materialy-kategorie/monografie.html#>
15. KARLÍKOVÁ, M., TOPOLČAN, O., (ed.) *Principy imunoanalytických metod pro mediky*, Polypress, 2013. [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <http://imunokurzy.cz/studijni-materialy-kategorie/monografie.html#>
16. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-80-7080-586-2 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/01.html
17. KELSEY, T. W., WRIGHT, P., NELSON, S. M. et. al. *A validated model of serum anti-mullerian hormone from conception to menopause*. Public Library of Science, 2011, [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022024>
18. KITTNAR, O., *Lékařská fyziologie*, Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4 [cit. 2017-3-10]

19. KUČERA, R., TOPOLČAN, O., RUMPÍKOVÁ, T. et al. *Stanovení anti-Müllerova hormonu u žen*, Česká gynekologie, 2013, roč. 16, č. 3. (s. 282-288) [cit. 2017-3-10] Dostupné online z: <http://www.prolekare.cz/ceska-gynekologie-clanek/stanoveni-anti-mullerova-hormonu-u-zen-40980>
20. LA MARCA, A., SIGHINOLFI, G., RADI, D., et al. *Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART)*. Human Reproduction, 2010, roč. 16, č. 2 (s. 113 -130) [cit. 2017-7-10] Dostupné online:<https://pdfs.semanticscholar.org/89bf/d30686a61406f3e6381a983ffee3aa3710bb.pdf>
21. LA MARCA, A., GRISEDI, V., GRIESINGER, G. *How much does AMH really vary in normal women?*, International Journal of Endocrinology, 2013 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852815/>
22. LA MARCA, A., VOLPE, A., *The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer*. Human Reproduction, 2007, roč. 13, č. 3 (s. 265 – 273) [cit. 2017-7-10] Online: <https://pdfs.semanticscholar.org/d6bb/2686b740c869b590bfe1a2c955f00488b98b.pdf>
23. LINGNV, Y., WEI, Z., HONG, L., et al., *The role of serum AMH and FF AMH in predicting pregnancy outcome in the fresh cycle of IVF/ICSI: a meta-analysis*. International journal of clinical and experimental medicine. 2015, roč. 8, č. 2 (s. 1755 – 1767) [cit. 2017-2-11] Dostupné online: <http://www.ijcem.com/files/ijcem0003172.pdf>
24. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., DVOŘÁČKOVÁ, J. *Patologie*. 2. dopl. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6 [cit. 2017-3-10]

25. MAREK, D., MACHAČ, Š., *Ovariální hyperstimulační syndrom – soubor interních komplikací u gynekologických pacientek podstupujících in vitro fertilizaci*. Interní medicína pro praxi, 2003, č. 8 [cit. 2017-2-11] Dostupné online: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2003/08/03.pdf>
26. MARDEŠIĆ, T. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4458-2 [cit. 2017-3-10]
27. NELSON, S. M., STEWARD, F., FLEMING, R., et. al. *Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy – relationship with maternal adiposity, insulin and adiponectin*, Fertility and Sterility, 2010, roč. 93, č.4 [cit. 2017-7-10] Dostupné online: [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(09\)03473-6/pdf](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(09)03473-6/pdf)
28. NĚMEC, P., HUSER, M., SOUČEK, M., *Možnosti ochrany reprodukčních funkcí u žen podstupujících léčbu cytotoxickými léky*. Vnitřní lékařství, 2008, roč. 54, č. 3 (s. 245 – 250) [cit. 2017-2-11] Dostupné online: www.ivfbrno.cz/2008-nemec-moznosti-ochrany-reprodukcnich-funkci-u-zen-podstupujicich-lecbu-cytotoxickymi-leky-vnit-lek%20.pdf
29. PRŮŠA, R. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe, 2012. ISBN 978-80-87553-68-8 [cit. 2017-3-10]
30. RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 8072623249. [cit. 2017-3-10]
31. ROKYTA, R. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2 [cit. 2017-3-10]
32. ROSSI, B. V., MISSMER, S., CORREIA, K. F., et al. *Ovarian reserve in women treated for acute lymphocytic leukemia or acute myeloid leukemia with chemotherapy, but not stem cell transplantation*. Oncology, 2012 [cit. 2017-3-10]

33. ROZTOČIL, A., BARTOŠ, P. *Moderní gynekologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-2832-2 [cit. 2017-3-10]
34. SangLab, Laboratorní listy č. 12/2012 [cit. 2017-3-10] Dostupné online z: http://www.sanglab.cz/media/laboratorni-listy/lab.%20listy_1212_AMH.pdf
35. SHMIDT, K. L. T., ANDERSEN YDING, C., LOFT, A., et al. *Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following cryopreservation and transplantation*. Human Reproductive, Oxford University Press, 2005, roč. 20, č. 12 (s. 3539 - 3546) [cit. 2017-7-25] Dostupné online: <https://academic.oup.com/humrep/article/20/12/3539/2913751/Follow-up-of-ovarian-function-post-chemotherapy>
36. SCHNEIDEROVÁ, M. *Perioperační péče*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4414-8 [cit. 2017-7-10]
37. STEPHEN, A. E., MASIAKOS P. T., SEGEV, D. L., et al., *Tissue-engineered cells producing complex recombinant proteins inhibit ovarian cancer in vivo*, PNAS, 2001, roč. 98, č. 6 (s. 3214 – 3219) [cit. 2017-7-10] Dostupné online: <http://www.pnas.org/content/98/6/3214.full.pdf>
38. SLEZÁKOVÁ, L. *Ošetrovatelství pro zdravotnické asistenty*. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-2270-2 [cit. 2017-7-10]
39. SUCHARDA, P., ZLATOHLÁVEK, L. *Základy klinické medicíny*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-3091-5 (s. 94-95) [cit. 2017-7-10]
40. TRÁVNÍK, P. *Moderní tendence ve stimulaci ovarií*. Praktické lékařství, 2015, roč. 11, č. 4 (s. 123-125) [cit. 2017-7-10] Dostupné online z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/02.pdf>

41. VACEK, Z. *Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. Praha:Grada, 2006. ISBN 80-247-1267-9 [cit. 2017-7-10]
42. VISSER, J. A., de JONG, F. H., LAVEN, J. S. E., et al. *Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function*, *Reproduction*, 2006 (s. 1 – 9) [cit. 2017-3-10] Dostupné online: <http://www.reproduction-online.org/content/131/1/1.full.pdf>
43. WEISS, P. *Sexuologie*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2492-8 [cit. 2017-7-10]
44. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika 3.*, dopl. a přeprac. vydání. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2 [cit. 2017-7-10]