

Není AMH jako AMH, *zejména v řízené ovariální stimulaci*

Porovnání metod Elecsys® AMH Plus a Access AMH v rámci spolupráce s několika IVF centry v České republice

Co je to AMH?

Antimüllerianský hormon (AMH) je glykoprotein složený ze dvou identických monomerů, které jsou spojené disulfidovými můstky. Patří do skupiny růstového faktoru β .⁷ Všichni členové této superskupiny se účastní regulace růstu tkání a jejich diferenciace.⁸

AMH je pojmenovaný podle své první popsané funkce v procesu pohlavní diferenciace plodu – regrese Müllerových vývodů během časně diferenciace v mužském embryu. Kromě této funkce hraje AMH rozhodující roli také v postnatálním vývoji u rozvíjejících se i zralých gonád.⁷

Pohlaví člověka je určeno již v okamžiku oplodnění vajíčka spermií, ale fetální diferenciace pohlaví začíná až kolem šestého týdne těhotenství. V počátečních stadiích vývoje savců mají plody obou pohlaví dva páry vývodů: Wolfovy a Müllerovy. U samčího plodu Sertoliho buňky varlat vylučují AMH a androgeny. Androgeny způsobí, že Wolfovy vývody se rozvinou do mužské vnitřní anatomie. AMH do 9. týdne těhotenství způsobí nevratnou regresi Müllerových vývodů. Přítomnost AMH je pro tento proces nezbytná. V nepřítomnosti AMH se Müllerovy vývody vyvinou do dělohy, vaječnicků a horní části vagíny. U ženského plodu

způsobí nepřítomnost AMH další rozvoj Müllerových vývodů, zatímco nedostatek androgenů způsobí regresi Wolfových vývodů, čímž dojde k vytvoření vnitřní ženské anatomie.⁷

Postnatální vývoj u mužů

S výjimkou přechodného poklesu v perinatálním období přetrvává vysoká hladina AMH až do puberty, kdy je pro dozrávání Sertoliho buňek charakteristický pokles hladiny AMH. Tento pokles produkce AMH souvisí spíše s vývojem během puberty než s věkem. Nejvýznamnější pokles hladiny AMH v séru se objeví mezi 2. a 3. vývojovým stadiem puberty současně se zvýšením intratestikulární koncentrace testosteronu (předchází zvýšení hladiny testosteronu v séru).⁷

Postnatální vývoj u žen

U žen se AMH vytváří v granulózních buňkách vaječnicku, jeho produkce začíná v perinatálním období a udržuje se na nízkých hladinách během celého reprodukčního života (s malým vrcholem po pubertě) a po menopauze klesne k extrémně nízkým hodnotám. Hraje významnou roli v ovariální folikulogenezi. Vývoj folikulů v ovariích zahrnuje dva rozdílné stupně: počáteční výběr, při kterém dochází k dospívání primordiálních folikulů, a cyklický výběr, který vede k růstu kohorty malých antrálních folikulů, mezi nimiž je následně vybrán dominantní folikul, určený k ovu-



laci. FSH ovládá cyklický výběr. Tvorba AMH v granulózích buňkách začíná v primárních folikulech a je největší v granulózích buňkách preantrálních a malých antrálních folikulů do průměru cca 6 mm. Až se stane růst folikulů závislý na FSH, tvorba AMH klesá a stává se nedetekovatelnou. Toto schéma tvorby AMH podporuje inhibiční roli AMH ve dvou rozdílných stupních folikulogeneze. V prvním AMH inhibuje přechod folikulů z primordiálního na maturační stupeň, čímž významně reguluje počet folikulů zbývajících v primordiálním poolu. Ve druhém stupni má AMH inhibiční účinek na folikulární citlivost na FSH a tím sehrává roli v procesu folikulárního výběru.⁸

Klinické využití Elecsys® AMH Plus

Bylo zjištěno, že koncentrace AMH v séru je přímo úměrná počtu antrálních folikulů a je lepším indikátorem ovariální rezervy než FSH, inhibin B nebo estradiol, měřené 3. den cyklu. Kromě toho se hladiny AMH v séru na rozdíl od výše zmíněných markerů významně nemění ani v průběhu menstruačního cyklu, ani mezi následnými cykly.⁷ Při asistované reprodukci se z hladin AMH dá odhadnout, jaká bude odezva vaječnicků na řízenou ovariální stimulaci a jaká je šance na úspěšné otěhotnění. Dalším klinickým použitím AMH je diagnostika poruch pohlavního vývoje u dětí a monitorování reziduální nebo rekurentní nemoci při nádorech z buněk granulózy. Podle některých názorů se AMH doporučuje jako náhradní biomarker za AFC (Antral Follicle Count) v diagnostice syndromu polycystických ovarií (PCOS) a k predikci nástupu menopauzy.⁸

Byla rovněž prokázána silná pozitivní

korelace mezi bazální hladinou AMH v séru a počtem oocytů získaných po COS (Controlled Ovarian Stimulation – řízená ovariální stimulace).² Na základě využití AMH jako prediktoru slabé anebo nadměrné reakce na COS by mohly být vytvořeny individuální stimulační protokoly pro jednotlivé pacientky.⁸ Slabá odpověď na COS se vyskytuje u 2–30 % pacientek a ovlivňuje úspěch asistované reprodukce, její předpovězení by mohlo vést pár k přehodnocení situace a upuštění od započetí cyklu.²

Metoda Elecsys® AMH Plus přináší kromě stanovení ovariální rezervy další dvě validovaná indikovaná využití:

1) Predikce odpovědi na řízenou ovariální stimulaci

Ovariální hyperstimulační syndrom (OHSS) je „přehnaná“ reakce vaječnicků na hormonální stimulaci ženy, jež se používá u většiny metod asistované reprodukce. Ve vaječnicích přitom dochází k tvorbě obrovského množství vajíček. Příčina vzniku OHSS není dosud přesně prokázána. Specifickými rizikovými faktory pro OHSS jsou nízký věk, nízký BMI, znaky PCOS, dříve prodělaný OHSS a vysoká hladina estradiolu v den hCG stimulace.¹ Závažný OHSS se vyskytuje u 1–3 % všech případů stimulace vaječnicků, vyžaduje hospitalizaci a intenzivní péči vzhledem k jeho život ohrožujícím komplikacím.^{1,2} Kompletní prevence OHSS není stále možná, ale s včasnou identifikací potenciálních rizikových faktorů a pečlivým klinickým kontrolováním pacientek, které podstupují COS, může být výskyt OHSS významně snížen,³ což vede k lepším výsledkům zdravotní péče a snížení nákladů na ni. Pomocí

ROC analýzy byla navržena cut-off hodnota metody Elecsys® AMH plus pro predikci OHSS na řízenou ovariální stimulaci rovna 15 pmol/l (2,1 ng/ml). Predikce hyperstimulace pro tuto cut-off hodnotu byla významná s AUC 82,1 % (CI 72,5–91,7 %) a následujícími charakteristikami.^{4,5}

	Hodnota	95% interval spolehlivosti (CI)
Senzitivita	81,3 %	54,4–96,0 %
Specifičnost	64,7 %	55,9–72,8 %
PPV	21,7 %	12,1–34,2 %
NPV	96,6 %	90,5–99,3 %

Tab. 1: Charakteristiky stanovení cut-off hodnoty pro predikci OHSS

2) Nastavení optimální individualizované denní dávky folitropinu delta firmy Ferring Pharmaceuticals při řízené ovariální stimulaci (COS) u žen v rámci programů asistované reprodukce⁸

Koncentrace AMH (v pmol/l) zjištěná stanovením Elecsys® AMH Plus v kombinaci s tělesnou hmotností byla validována pro zjištění individuální denní dávky folitropinu delta v kontrolované stimulaci ovarií za účelem vývoje vícero folikulů u žen v programu asistované reprodukce, jakými jsou např. cykly IVF nebo intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI). Stanovení Elecsys® AMH Plus bylo posouzeno výhradně pro zjištění individuální denní dávky folitropinu delta (Ferring). Individualizovaný dávkovací režim folitropinu delta založený na koncentraci AMH byl validovaný ve 3. fázi prospektivní, randomizované, kontrolované, na straně posuzovatelů zaslepené, paralelní, multicentrické, mezinárodní

Metoda	Elecsys® AMH Plus		Access AMH		
	PC AMH Plus 1	PC AMH Plus 2	Access AMH 1	Access AMH 2	Access AMH 3
Šarže	169524	169525	689205	689205	689205
Atest (ng/ml)	1,03	5,07	1,03	5,06	15,30
SD (ng/ml)	0,07	0,25	0,15	0,76	2,30
Počet stanovení	49	49	34	38	28
Průměr (ng/ml)	0,98	5,04	0,95	4,83	14,34
SD (ng/ml)	0,03	0,20	0,12	0,52	1,61
VK	3,4 %	4,0 %	12,2 %	10,7 %	11,2 %
Bias	-5,3 %	-0,6 %	-8,0 %	-4,6 %	-6,3 %
TE	10,9 %	7,2 %	28,1 %	22,3 %	24,8 %

Tab. 2: Srovnání výsledků interní kontroly kvality metod Elecsys® AMH Plus a Access AMH

klinické studie ESTHER-1, porovnávající účinnost a bezpečnost folitropinu delta a folitropinu alfa (randomizovaných v poměru 1 : 1).⁸

Návrh a podmínky porovnání metod

Toto porovnání metod jsme prováděli z důvodu změny používané metodiky v naší laboratoři Imalab s.r.o. K porovnání jsme použili soubor běžných vzorků pacientek, které přicházely do naší laboratoře s požadavkem na stanovení AMH. Porovnání bylo měřeno v období od 23. 3. 2017 do 6. 6. 2017. Vždy se jednalo o čerstvé sérum z aktuálního denního náběru pacientky a vždy bylo změřeno na obou technologiích nejdéle do dvou hodin po odběru. Pokaždé bylo stanovení z důvodu kontaminace vzorkovou jehlou provedeno nejprve na analyzátoru **cobas e 411** metodou Elecsys® AMH Plus a následně na analyzátoru UniCel DxI 800 metodou Access AMH. Jedná se o dvě nejběžnější plně automatizované metody na stanovení AMH na současném trhu.

Bezvýhradně byla respektována pravidla pro interní kontrolu kvality daná výrobcem jednotlivých metod. **V případě metody Elecsys® AMH Plus to znamenalo:**

- Stanovení obou dvou hladin kontroly PreciControl AMH Plus (PC AMH Plus) nejméně jednou za 24 hodin, alespoň 1x na soupravu reagentů a po každé kalibraci.
- Splnění deklarovaných cílových rozmezí.
- Bias v rámci $\pm 12\%$ stanovené cílové hodnoty.
- Variační koeficient (VK) mezilehlé preciznosti $\leq 8\%$.

- Maximální celková chyba (TE) v rámci $\pm 25\%$ ($TE\% = |\text{bias}\%| + 1,65 \text{ VK}$).

Požadavky výrobce na metodu Access AMH jsou:

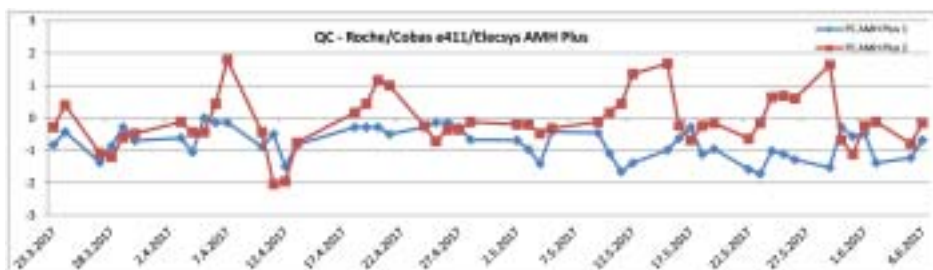
- Stanovení materiálu pro kontrolu Access AMH, které pokrývá nejméně 2 úrovně analytu během každých 24 hodin.
- Splnění deklarovaných cílových rozmezí.

Dosažené výkonnostní charakteristiky jednotlivých kontrol v průběhu měření ukazují tabulka č. 2.

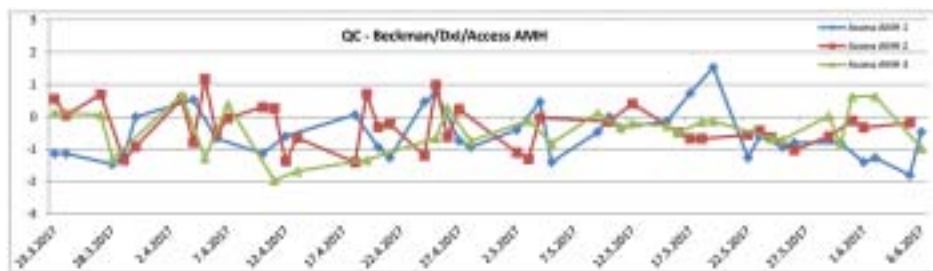
Na následujících obrázcích jsou uvedeny naměřené hodnoty QC pro obě metody. Je nutno zmínit fakt, že v případě kontroly Roche PreciControl AMH Plus tvoří povolené rozmezí $\pm 3 \text{ SD}$ a v případě kontrolního materiálu Access AMH tvoří povolené rozmezí $\pm 2 \text{ SD}$.

Charakteristika souboru použitých vzorků

V průběhu studie byly změřeny vzorky více než 160 pacientek. Po vyloučení hodnot pod mezí detekce nebo naopak s koncentracemi převyšujícími rozsah měření



Obr. 1: Výsledky interní kontroly kvality metody Elecsys® AMH Plus v průběhu celého porovnání



Obr. 2: Výsledky interní kontroly kvality metody Access AMH v průběhu celého porovnání



Obr. 3: Věkové zastoupení pacientek, jejichž vzorky byly použity pro porovnání

Věk pacientky	Počet pacientek	Průměr hodnot AMH Elecsys® AMH Plus (ng/ml)	Rozmezí hodnot AMH Elecsys® AMH Plus (ng/ml)	Průměr hodnot AMH Access AMH (ng/ml)	Rozmezí hodnot AMH Access AMH (ng/ml)	2,5. percentil referenční populace ^a (ng/ml)	Počet pacientek s AMH pod 2,5. perc.
< 20 let	3	4,75	0,87–7,80	4,86	0,95–7,12	-	1
20–25 let	16	4,54	0,94–8,76	5,05	0,95–9,69	1,22	1
25–30 let	47	5,06	0,14–13,54	5,53	0,13–17,32	0,89	3
30–35 let	42	3,19	0,09–9,33	3,41	0,09–10,55	0,576	4
35–40 let	30	2,08	0,07–8,96	2,09	0,07–8,53	0,147	1
40–45 let	18	1,40	0,13–3,82	1,47	0,12–3,79	0,027	0
45–50 let	2	0,16	0,11–0,20	0,16	0,11–0,21	0,01	0

Tab. 3: Srovnání naměřených hodnot pro jednotlivé metody, ve věkových skupinách rozdělených dle referenčních intervalů

bylo pro porovnání použito 158 vzorků. 137 vzorků (86,7 %) bylo odesláno z IVF center, u 18 pacientek (11,4 %) byl žadatelem lékař s odborností gynekolog a 3 pacientky (1,9 %) byly samoplátkyně.

Na následujícím obrázku je znázorněno zastoupení pacientek ve věkových skupinách po 5 letech odpovídajících věkovým rozmezím, u nichž jsou uváděny jednotlivé referenční intervaly.

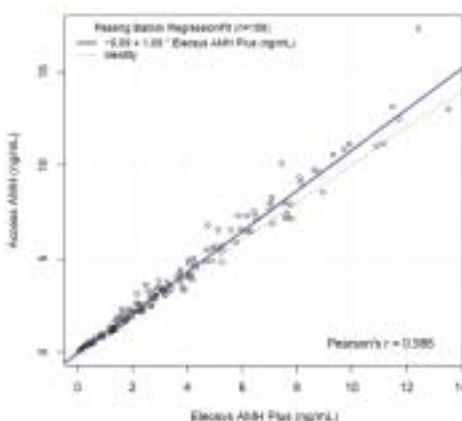
Naměřené hodnoty a jejich interpretace

V tabulce č. 3 je zpracovaný přehled naměřených dat rozdělených dle věku pacientek do skupin podle referenčních rozmezí. V posledním sloupci je uveden i počet pacientek s hladinou AMH v oblasti snížené ovariální rezervy pod hranicí 2,5. percentilu referenčního intervalu metody Elecsys® AMH Plus, odpovídající dané věkové skupině.

Porovnání obou metod bylo vyhodnoceno použitím Passing-Bablokovy regrese a Bland-Altmanova diferenčního grafu. Při vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese v celém intervalu hodnot jsme získali lineární rovnici: Access AMH = -0,09 + 1,09 Elecsys® AMH Plus, při Pearsonově korelačním koeficientu $r = 0,986$.

Iliodormiti et al. v nedávno zveřejněné studii v Human Reproduction porovnávali stejné metody jako my. Vybrali z literatury údaje o 5 studiích, ve kterých bylo měřeno AMH pomocí automatizovaných testů Elecsys a Access v téže kohortě žen.

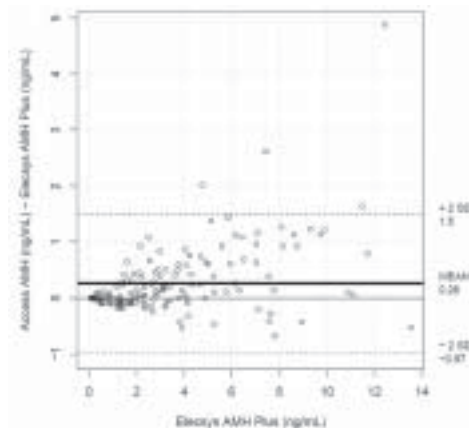
Kontaktovali autory těchto studií a podařilo se jim shromáždit data celkem od 848 žen, které statisticky porovnávali. Na rozdíl od našeho porovnání nebyla měřena čerstvá séra bezprostředně po odběru, ale ve všech 5 studiích byly měřeny vzorky skladované v zamraženém stavu. I přes tento rozdíl získali autoři tohoto porovnání pomocí Passing-Bablokovy regrese lineární rovnici: Access AMH = -0,05 + 1,10 x Elecsys AMH, tedy prakticky stejný výsledek jako my, tzn. že výsledky získané metodou Access AMH jsou syste-



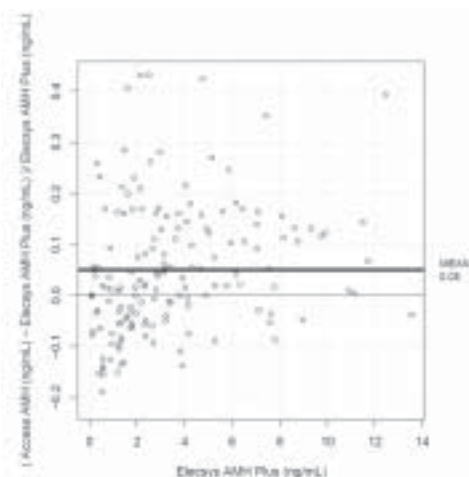
Obr. 4: Porovnání výsledků Passing-Bablokovou regresi

maticky o 10 % vyšší než výsledky naměřené metodou Elecsys® AMH Plus. Autoři vidí příčinu tohoto systematického posunu v rozdílné kalibraci obou metod a zdůrazňují potřebu univerzálního rekombinantního standardu přijatého všemi výrobci metod pro stanovení AMH.⁶

Bland-Altmanovy grafy na následujících obrázcích ukazují porovnání těchto dvou metod na stanovení AMH v celém



Obr. 5: Srovnání výsledků pomocí absolutního Bland-Altmanova grafu



Obr. 6: Srovnání výsledků pomocí relativního Bland-Altmanova grafu

spektu naměřených hodnot. Ukazuje se, že větší rozdíly mezi výsledky měření obou metod jsou pozorovatelné napříč celým rozsahem koncentrací, s hodnotami měření metodou Access AMH v průměru o 0,26 ng/ml vyššími než hodnoty naměřené metodou Elecsys® AMH Plus.

Datum	Věk pacientky	Typ oddělení	Doplňující informace	AMH Elecsys® AMH Plus (ng/ml)	AMH Access AMH (ng/ml)	Relativní chyba k Elecsys® AMH Plus (%)	Anamnéza a medikace
5. 4.	40,9	IVF	pacientka	2,96	3,79	28	anamnéza bezvýznamná
1. 6.	37,7	IVF	pacientka	1,48	1,90	28	anamnéza bezvýznamná
4. 5.	33,3	gynekolog	-	2,50	3,58	43	-
6. 4.	31,5	IVF	dárkyně	1,60	2,25	41	astma bronchiální, medikuje Flutiform, Alerid
13. 4.	31,3	IVF	pacientka	5,85	7,29	25	anamnéza bezvýznamná
13. 4.	29,8	IVF	pacientka	7,44	10,06	35	anamnéza bezvýznamná
27. 3.	28,6	IVF	pacientka	4,76	6,78	42	anamnéza bezvýznamná
17. 5.	26,9	IVF	pacientka	2,56	3,23	26	thyreopatie, medikuje Letrox 25
23. 5.	26,8	IVF	pacientka	12,44	17,32	39	Bechtěrevova choroba, astma bronchiální, porucha glukozové tolerance, před 2 roky lymfická borelióza, medikuje Ventolin, Alvesco
26. 4.	24,9	IVF	dárkyně	5,13	6,51	27	astma bronchiální, neuveden název léku, který medikuje
6. 4.	22,5	IVF	dárkyně	2,16	3,09	43	anamnéza bezvýznamná

Tab. 4: Srovnání výsledků vzorků s opakovaně naměřenou relativní chybou k metodě Elecsys® AMH Plus > ± 25 % včetně klinicky relevantních informací a medikace

AMH Elecsys® AMH Plus (pmol/l)	Denní dávka folitropinu delta	Počet žen ve skupině podle Elecsys® AMH plus (N = 158)	N (%) přehodnocených do vyšší kategorie (nižší dávka) na základě Access AMH	N (%) přehodnocených do nižší kategorie (vyšší dávka) na základě Access AMH
< 15	12 µg	64	3 (4,7)	-
15–16	0,19 µg/kg	7	4 (57,1)	0
17	0,18 µg/kg	4	1 (25,0)	2 (50,0)
18	0,17 µg/kg	2	2 (100,0)	0
19–20	0,16 µg/kg	8	4 (50,0)	2 (25,0)
21–22	0,15 µg/kg	8	7 (87,5)	0
23–24	0,14 µg/kg	6	2 (33,3)	2 (33,3)
25–27	0,13 µg/kg	5	3 (60,0)	1 (20,0)
28–32	0,12 µg/kg	11	4 (36,4)	1 (9,1)
33–39	0,11 µg/kg	11	5 (45,5)	0
≤ 40	0,10 µg/kg	32	-	0

Tab. 5: Srovnání algoritmu dávkování folitropinu delta a vyjádření rizika chybného dávkování

I přes dobrou korelaci prezentovanou předchozími grafy a získanými hodnotami korelačních koeficientů jsme u některých vzorků v našem souboru pozorovali velmi rozdílné hodnoty získané jednotlivými metodami u nemalého počtu probandek. Výsledky AMH u těchto vzorků jsou vzdálené od stanovené lineární rovnice Passing-Bablokovy regrese. Identifikovali jsme 11 vzorků (7,0 %), u kterých jsme pozorovali relativní chybu k metodě Elecsys® AMH Plus $\geq 25\%$, a 18 vzorků (11,4 %) lišících se o více než 20 %. Hodnoty AMH naměřené oběma metodami u těchto vzorků jsme potvrdili opakovaným měřením, čímž jsme vyloučili náhodnou chybu. Požádali jsme zasilající oddělení o doplnění klinicky relevantních informací a případné medikace. Získané informace jsou spolu s naměřenými hodnotami uvedeny v tabulce č. 4. Bohužel se nám nepodařilo najít žádnou závislost ani odlišnost od zbývajících skupiny 11 pacientek, která by opodstatňovala takto veliký rozdíl (průměr 34 %; rozmezí 25–43 %). Vzorky byly měřeny v 9 různých dnech, pacientky jsou ve věkovém rozmezí 22,5–40,9 let, jsou mezi nimi pacientky IVF center i dárkyně vajíček a nemají stejnou medikaci. Přesto hladina AMH naměřená metodou Access AMH je u všech těchto 11 pacientek o více než 25 % vyšší než hladina naměřená metodou Elecsys® AMH Plus, viz tabulka č. 4.

Jak už bylo v úvodu zmíněno, metodu Elecsys® AMH Plus lze v kombinaci s tělesnou hmotností pacientky využít k na-

stavení optimální individuální denní dávky folitropinu delta (přípravek Rekovelle) firmy Ferring Pharmaceuticals při řízené ovariální stimulaci (COS) u žen v rámci asistované reprodukce. Z tohoto důvodu nás zajímaly rozdíly v dávkování folitropinu delta vypočítané na základě hodnoty AMH získané metodou Elecsys® AMH Plus a metodou Access AMH.

V tabulce č. 5 je uvedeno v kolika procentech případů by došlo k chybnému dávkování folitropinu delta, pokud by byla k vypracování individuálního stimulačního protokolu použita hladina AMH naměřená metodou Access AMH namísto metody Elecsys® AMH Plus.

Pokud budeme propočítávat dávku folitropinu delta u všech pacientek pro ženu s hmotností 60 kg, pak ve 43 případech (27,2 %) nebude v případě použité metody Access AMH dávka připravena správně. V celkem 35 případech bude pacientce podána nižší dávka folitropinu delta, která může být příčinou nedostatečné stimulace a vývoje folikulů. Na druhou stranu v 8 případech dostane pacientka dávku vyšší, což může mít za následek nežádoucí hyperstimulaci.

Závěr

Passing-Bablokova regrese (n = 158) potvrzuje 10% proporcionální chybu mezi metodami, nalezenou jinými autory,⁶ přičemž metoda Access AMH poskytuje zhruba o 10 % vyšší hodnoty oproti metodě Elecsys® AMH Plus.

Při standardním provádění interní kontroly kvality vykázala metoda Elecsys® AMH Plus výrazně lepší hodnoty mezi- a vnitřní preciznosti a menší procento celkové chyby než metoda Access AMH, a to na obou hladinách použitých kontrol.

U 11,4 % vzorků jsme opakovaně zaznamenali výraznou odchylku ve stanovení hodnot AMH mezi jednotlivými metodami. Metodou Access AMH jsme naměřili hodnoty až o 43 % vyšší než metodou Elecsys® AMH Plus. Příčinu těchto odchylek se nám nepodařilo uspokojivě vysvětlit.

Ze všech výše uvedených důvodů vyplývá, že je velmi rizikové používat metodu Access AMH pro nastavení optimalizované denní dávky folitropinu delta.

Literatura:

- 1) The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2008. *Fertil Steril* 90 (5 Suppl): 188–93.
- 2) La Marca A. et al. 2010. *Hum Reprod Update* 16 (2): 113–30.
- 3) Humaidan P. et al. 2010. *Fertil Steril* 94 (2): 389–400.
- 4) Nelson S. M. et al. 2007. *Hum Reprod* 22 (9): 2414–21.
- 5) Arce J.-C. et al. 2014. *Fertil Steril* 102 (6): 1633–40.e5.
- 6) Iliodorniti S. et al. 2017. *Hum Reprod* 32 (8): 1710–15.
- 7) Příbalový leták Access AMH.
- 8) Příbalový leták Elecsys® AMH Plus.