

# CAT

## Critically Appraised Topic

### Het klinisch nut van de hormonen inhibine A&B en Anti-Müller-hormoon

Author: Inge Geerts  
Supervisor: Dr. J. Billen  
Date: 20/05/2008  
Expiry date: 20/05/2010

#### CLINICAL BOTTOM LINE

Inhibine A&B en anti-Müller-hormoon (AMH) zijn polypeptide hormonen, die tot de transforming growth factor- $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ) superfamilie behoren. Zowel inhibine als AMH worden gesynthetiseerd en gesecreteerd door de granulosa-cellen van de ovaria bij de vrouw en door de Sertoli-cellen van de testis bij de man. De serumspiegel van beide hormonen variëren sterk met de leeftijd en zijn verschillend tussen de sexen. Serum inhibine A&B variëren sterk tijdens de menstruele cyclus terwijl AMH quasi constant blijft. De primaire endocriene rol van inhibine B is de regulatie van de gametogenese door een negatief feedback-mechanisme op de FSH productie door de hypofyse. AMH induceert bij de man de regressie van de gang van Müller, wat de voorloper is van het vrouwelijk geslachtsorgaan. Bij de vrouw wordt AMH gesecreteerd door de primaire en preantrale follikels en inhibeert dit hormoon de follikelrecrutering van de niet-dominante follikels en de FSH gestimuleerde follikelgroei.

Bij de man zijn de prepuberale inhibine B en AMH concentratie een merker voor het aantal en de integriteit van de Sertoli-cellen. Bepaling van serum AMH en inhibine B kunnen nuttig zijn bij testiculaire pathologie, zoals cryptorchidie en bij seksuele dysgenese of ambiguïteit. In de volwassen man is serum inhibine B een goede endocriene indicator voor de kwaliteit van de spermatogenese. Naast het semen onderzoek en het klinisch onderzoek heeft inhibine B en FSH zeker een plaats bij de evaluatie van de mannelijke (in)fertiliteit. AMH blijkt in deze context ondergeschikt aan inhibine B. Zowel inhibine B als AMH zijn geen geschikte predictors voor de efficiëntie van testiculaire sperma extractie (TESE).

Bij de vrouw hebben deze hormonen eveneens een waaier aan toepassingen. AMH wordt naar voor geschoven als merker voor de ovariële reserve omdat dit hormoon de primordiale follikelpool weerspiegelt. Circulerend AMH weerspiegelt zowel de kwantiteit als de kwaliteit van de nog aanwezige follikels.

In dit opzicht kunnen zowel AMH als inhibine B worden gebruikt voor een gedaalde vruchtbaarheid en/of premature ovarieel falen en/of menopauze vast te stellen. Serum AMH is een veel vroegere merker voor de menopauzale transitie dan inhibine B en FSH en geniet dan ook de voorkeur.

In de literatuur werd de waarde van AMH en inhibine B uitgebreid geëvalueerd en beschreven in het kader van de fertiliteitsgeneeskunde. Basaal serum AMH is een betere merker voor gedaalde ovariële reserve dan inhibine B. AMH correleert goed met het antrale follikelaantal en het aantal gecollecteerde oocyten. Echter, zowel de bepaling van AMH als inhibine B hebben slechts matige predictieve eigenschappen om een zwakke IVF respons te

voorspellen. Deze merkers kunnen wel als screeningstest of in combinatie met andere ovarium reserve testen worden gebruikt om zo de algemene performantie te verbeteren. Inhibine B en AMH kunnen een succesvolle zwangerschap niet voorspellen. AMH bepaling kan echter wel gehanteerd worden om de hormoontherapie voor ‘assisted reproduction treatment’ (ART) aan te passen en de patiënten te informeren over de mogelijke zwakke respons op ART of wijzen op een toegenomen risico op ovariëel hyperstimulatie syndroom.

AMH kan bijdragen tot de diagnose van het polycysteus ovariumsyndroom (PCOS). Echter als individuele merker mist AMH sensitiviteit voor het stellen van de diagnose. Wanneer nauwkeurig ultrasound (US) onderzoek niet mogelijk is, kan AMH gebruikt worden als surrogaat voor de bepaling van het ‘follikel aantal per ovarium’ (FNPO).

AMH en inhibine B zijn gelijkwaardige tumormerkers voor de diagnose en de follow-up van granulosa-cel-tumoren (GCT). Voor epitheliale tumoren is CA-125 nog steeds de serummarker bij uitstek. Een combinatie van CA-125 en inhibine is te verkiezen om de meerderheid (90%) van de ovariumtumoren te diagnosticeren.

De minimale variatie in serum AMH waarde tijdens de menstruele cyclus, maakt het mogelijk om de stalen op om het even welk moment tijdens de cyclus af te nemen. Dankzij de stabiliteit van de AMH concentratie is een éénmalige AMH meting voldoende. Het meten van serum AMH is zeer goed reproduceerbaar van cyclus tot cyclus, een feit dat de robustheid als biologische merker voor ovariële status onderlijnt. Inhibine B varieert wel tijdens de cyclus en wordt meestal op dag 3-5 (samen met de andere hormonen) gemeten. Inhibine B en AMH kunnen geanalyseerd worden door commerciële immunoassays (ELISA's). Een internationale standaard is voorhanden voor inhibine B, echter voor AMH niet. Dit belemmert de kwaliteit van de AMH assays en de resultaten zijn dus niet traceerbaar naar een standaard.

In de literatuur is er evidentie voor het gebruik van inhibine B en AMH voor hogervernoemde topics. Deze parameters kunnen misdiagnose (PCOS, ovariële tumor, sexuele dysgenese,...) indijken, wanneer deze analyses in de differentiaal diagnose worden opgenomen. Tevens kunnen ze bijdragen tot de evaluatie van de mannelijke en vrouwelijke (in)fertiliteit. Alhoewel inhibine B en AMH veelbelovend lijken in de diagnostiek van een aantal gynaecologische aandoeningen, dient dit nog te worden bevestigd door meer studies.

De hoge kostprijs, de lage prevalentie van GCT en sexuele dysgenese en de niet overtuigende predictieve waarde van deze parameter in het domein van de infertiliteitsgeneeskunde pleiten tegen de invoer van deze analyses.

Na deze evaluatie en na een degelijk overleg met de clinici moet er worden nagegaan of deze niche-analyses worden ingevoerd in het LAG-UZ Leuven.

#### **CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

De bepalingen van inhibine B en anti-Müller-hormoon (AMH) worden niet uitgevoerd in het UZ te Leuven. De analyse van deze hormonen wordt uitbesteed aan de VUB te Jette. Vanuit verschillende klinische disciplines bestaat er interesse voor deze endocrinologische parameters en bijgevolg werd de vraag tot invoering van deze testen gesteld aan het laboratorium in UZ Leuven. Vooral de dienst reproductieve endocrinologie en gynecologische oncologie tonen belangstelling voor de analyse van inhibine B. AMH wordt door de gynecologen in het algemeen als een nuttige parameter beschouwd. Uit rondvraag blijkt dat de lange ‘Turn Around Time’ (TAT) door de clinici als hinderlijk wordt ervaren. Een TAT van 1 week tot maximum 2 weken is gewenst om deze parameter(s) bij de diagnosestelling te kunnen gebruiken.

In deze CAT wordt nagegaan wat het toepassingsgebied van deze hormonen is, door literatuuronderzoek volgens de EBM methode. Deze parameters hebben meerdere toepassingen gemeenschappelijk en deze hormonen worden dan ook t.o.v. elkaar vergeleken voor de verschillende domeinen in de andro- en gynaecologie. Door peiling naar de verwachtingen van de medici wordt de haalbaarheid van het invoeren van deze test(en) in het laboratorium nagegaan.

### QUESTION(S)

---

- 1) Wat is de fysiologische rol van inhibine A & B en anti-Müller-hormoon?
- 2) Wat zijn de mogelijke toepassingsgebieden van inhibine A & B en AMH?  
Kunnen deze hormonen een meerwaarde betekenen in de klinische ‘decision making’?
- 3) Welke technieken/kits zijn beschikbaar voor bepaling van deze hormonen?
- 4) Wat is de situatie in UZ Leuven? Welke medische disciplines hebben interesse in de bepaling van deze hormonen?
- 5) Is het nuttig de inhibine B/AMH test in te voeren in LAG-UZ Leuven?

### SEARCH TERMS

---

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Anti-Mullerian Hormone”, “Inhibins”, Combinatie van “Granulosa Cell Tumor and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Infertility, Male and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Infertility, Female and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Polycystic Ovary Syndrome and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Ovarian Hyperstimulation Syndrome and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Spermatogenesis and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”, “Cryptorchidism and Anti-Mullerian Hormone/inhibins”.*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>)*
- 4) *UpToDate Online version 15.3 (2008)*

### RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

#### 1) *Guidelines and Recommendations*

- (1) The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group 2004, revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*; 19: 41-47.
- (2) Rowe PJ *et al.* WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press, 2000.
- (3) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University press 1999.
- (4) Rowe PJ *et al.* WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of het infertile couple. Cambridge University Press 1993.

#### 2) *Systematic Reviews and Meta-analyses*

- (5) Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2008 (in press).
- (6) Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 685-718.

#### 3) *Reviews*

- (7) La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol* 2006; 64: 603-610.
- (8) de Jong FH, Themmen APN, Visser JA. Anti-Müller-hormoon in serum als marker voor testiculaire en ovariële functies. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2007; 32: 47-51.
- (9) Pierik FH, Burdorf A, de Jong FH, Weber R. Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis. *Ann Med* 2003; 35: 12-20.
- (10) Vernaev V, Brugnon F, Tournaye H. Inhibin B, predictive factor for testicular sperm recovery? *Gynecol Obstet Fertil* 2004; 32: 767-770.
- (11) Lee MM, Misra M, Donahoe PK, MacLaughlin DT. MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 91-98.
- (12) Groome NP, Evans LW. Does measurement of inhibin have a clinical role? *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 419-431.
- (13) Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006; 131: 1-9.
- (14) Burger HG, Fuller PJ, Chu S, Mammers P, Drummond A, Susil B, Neva P, Robertson DM. The inhibins and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180: 145-148.
- (15) Robertson DM, Burger HG, Fuller PJ. Inhibin/activin and ovarian cancer. *Endocrine-related cancer* 2004; 11: 35-49.
- (16) Robertson DM, Pruysers E, Jobling T. Inhibin as a diagnostic marker for ovarian cancer. *Cancer letters* 2007; 249: 14-17.
- (17) La Marca A, Volpe A, The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer. *Human Reproduction Update* 2007; 13: 265-273.

#### 4) Original Articles

- (18) Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzman G, Cox ET, Baly DL, Mann E *et al.* Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinol* 1993; 132: 431-443.
- (19) Fujimura H, Ohsawa K, Funaba M, Murata T, Murata E, Takahashi M *et al.* Immunological localization and ontogenetic development of inhibin  $\alpha$ -subunit in rat brain. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 157-63.
- (20) Billiar RB, Leavitt MG, Smith P, Albrecht ED, Pepe GJ. Functional capacity of fetal zone cells of the baboon fetal adrenal gland: a major source of  $\alpha$ -inhibin. *Biol Reprod* 1999; 61: 142-146.
- (21) Bicsak TA, Tucker EM, Chappel S, Vaughan J, Rivier J, Vale W *et al.* Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 1986; 119: 2711-2719.
- (22) Chen C-LC. Inhibin and activin as paracrine/autocrine factors. *Endocrinol* 1993; 132: 4-5.
- (23) Carlsen E, Olsson C, Petersen JH, Andersson AM, Skakkeback NE. Diurnal rhythm in serum levels of inhibin B in normal men: relation to testicular steroids and gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1664-1669.
- (24) Hayes FJ, Hall EJ, Boepple P, Crowley WF. Differential control of gonadotropin secretions in the human: endocrine roles of inhibins. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1835-41.
- (25) Welt CK, Martin KA, Taylor AE, Lambert-Messerlian GM, Crowley WF, Smith JA *et al.* Frequency modulation of follicle stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2645-52.
- (26) Muttukrishna S, Child TJ, Groome NP, Ledger WL. Source of circulating levels of inhibin A, pro- $\alpha$ C containing inhibins and activine-A in early pregnancy. *Hum Reprod* 1997; 12: 1089-93.
- (27) Muttuskrishna S, George L, Fowler PA, Groome NP, Knight PG. Measurement of serum concentrations of inhibin-A during human pregnancy. *Clin Endocrinol* 1995; 42: 391-7.
- (28) Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 15: 21-31.
- (29) Teixeira J, Maheswaran S and Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews* 2001; 22: 657-674.
- (30) Rajperd- De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3836-44.
- (31) Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-Müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2005; 84: 167-73.
- (32) Lee MM, Donahoe PL, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA *et al.* Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 571-6.
- (33) La Marca A, Volpe A Anti-Müllerian serum levels during pregnancy. *Clin Endocrinol* 2006; 64: 715-716.

- (34) La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P *et al.* Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004; 19: 2738-41.
- (35) La Marca A., Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006; 21: 3103-3107.
- (36) Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te velde ER, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4057-4063.
- (37) Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 1837-1840.
- (38) Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of follicular status. *Hum Reprod* 2005; 20: 923-927.
- (39) Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME, Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000; 73: 859-61.
- (40) Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 2007 (in press).
- (41) Streuli I, Fraisse T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P and de Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril* 2007 (in press).
- (42) Andersson A, Skakkebaek NE. Serum inhibin B levels during male childhood and puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180:103-107.
- (43) Raivio T, Saukkonen S, Jasskelainen J, Komulainen J, Dunkel L. Signaling between the pituitary gland and the testes: inverse relationship between serum FSH and inhibin B concentrations in boys in early puberty. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 150-6.
- (44) Rey R. Assessment of seminiferous tubule function (anti-müllerian hormone). *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol* 2000; 142: 150-156.
- (45) Toppari J, Kaleva M. *Maldescendus* thesis. *Horm Res* 1999; 51: 261-269.
- (46) Elder J. Ultrasonography is unnecessary in evaluating boys with non-palpable testis. *Pediatrics* 2002; 110: 748-751.
- (47) Hrebinko R, Bellinger M. The limited role of imaging techniques in managing children with undescended testes. *J Urol* 1993; 150: 458-460.
- (48) Lee P. Appropriate use and interpretation of human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal male patients. *Endocr Pract* 2000; 6: 112-114.
- (49) Christiansen P, Andersson A, Skakkebaek N, Juul A. Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 95-101.
- (50) Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC, MacLaughlin DT. Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with non-palpable gonads. *N Eng J Med* 1997; 336: 1480-1486.
- (51) Misra M, MacLaughlin D, Donahoe P, Lee M. Measurement of Müllerian inhibiting substance facilitates management of boys with micropallus and cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 88: 3598-3602.
- (52) Josso N, Picard JY, Rey R, Clemente N. Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006; 3: 347-358.
- (53) Misra M, MacLaughlin DT, Donahoe P, Lee M. The role of Müllerian inhibiting substance in the evaluation of phenotypic females with mild degrees of virilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 787-792.
- (54) Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, De Jong FH, Weber RFA. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3110-4.
- (55) Jensen TK, Andersson AM, Hjøllund NHI, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A *et al.* Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4059-63.
- (56) Klingmuller D, Haidl G. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2376-8
- (57) Bohring C, Schroeder-Printzen I, Weidner W, Krause W. Serum levels of inhibin B and follicle stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2002; 78: 1195-1198.
- (58) Foresta C, Betella A, Petraglia F, Pistorello M, Luisi S, Rossato M. Inhibin B levels in azoospermic subjects with cytologically characterized testicular pathology. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 695-701.

- (59) Von Eckardstein , Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2496-501.
- (60) Andersson AA, Petersen J, Norgensen N, Jensen TK, Skakkebaek N. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2873-2879.
- (61) Muttukrishna S, Yussoff H, Naidu M, Barua J, Suharjono H. Serum anti-Müllerian hormone and inhibin B in disorders of spermatogenesis. *Fertil Steril* 2007; 88: 516-518.
- (62) Fénelon P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevalier D, Pointis G. Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14:2020-4.
- (63) Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H, Kamidono S. The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum Reprod* 2002; 17: 968-70.
- (64) Isikoglu M, Oygur K, Oehninger S, Ozdem S, Seleker M. Serum anti-Müllerian hormone levels do not predict the efficiency of testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22: 256-260.
- (65) Tournaye H, Camus M, Goossens A, Nagy Z, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Recent concepts in management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10: 115-119.
- (66) Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, Steirteghem AV, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 971-976.
- (67) Ezech UI, Taub NA, Moore HD, Cooke ID. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 1005-12.
- (68) Balleca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, de Osaba MJ *et al.* Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15:1734-8.
- (69) Brugo-Olmedo S, De Vincentis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 76: 1124-9.
- (70) Guthausen B, Bailly M, Bergere M, Wainer R, Ville Y, Selva J. Successful pregnancy and delivery after testicular sperm extraction despite an undetectable concentration of serum inhibin B a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 77: 1077-8.
- (71) Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 65: 1231-1237.
- (72) Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-1346.
- (73) Brambilla DJ, McKinlay SM. A prospective study of factors affecting age at menopause. *Clin Epidemiol* 1989; 42: 1031-1039.
- (74) Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 105-111.
- (75) de Vet A, Loven JS, de Jong FH, Themmen AP en Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357-362.
- (76) Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, Jong FH, Themmen AP. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17: 3065-71.
- (77) Van Rooij IA, den Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jonge FH, Themmen AP, te Velde AR. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004; 11: 601-606.
- (78) Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18: 323-7.
- (79) Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH. Serum anti-müllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005; 83: 979-987.
- (80) Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW *et al.* The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003; 18: 700-706.
- (81) Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationship between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 2003; 18: 35-44.

- (82) Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A and Dennerstein L. Prospective measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4025-4030.
- (83) Larsen EC, Muller J, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Anderson AN. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH < 10 IU/L. *Hum Reprod* 2003; 18: 417-422.
- (84) van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG et al. Anti-Müllerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3869-3874.
- (85) Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C & Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003; 18: 2368-2374.
- (86) Welt CK, Hall JE, Adams JM, Taylor AE. Relationship of estradiol and inhibin to the follicle-stimulating hormone variability in hypergonadotropic hypogonadism or premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 826-830.
- (87) Fong SL, Lugtenburg PJ, Schipper I, Themmen APN, de Jong FH, Sonneveld P, Laven JSE. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum Reprod* 2008; 23: 674-678.
- (88) Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002; 77: 468-71.
- (89) Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum anti-müllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82: 1323-9.
- (90) Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathananda M. Inhibin B and anti-müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004; 111:1248-53.
- (91) Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005; 112: 1384-90.
- (92) Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles-implications for individualization of therapy. *Hum Reprod*. 2007, 22; 2414-2421.
- (93) Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45: 20-4.
- (94) Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008; 1-7.
- (95) Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Sasamitjana R *et al.* Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005; 20: 915-22.
- (96) Ficiocioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular anti-Müllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006; 85: 592-6.
- (97) Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 318-323.
- (98) Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum Anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in Assisted Reproduction Technology (ART). *Clin Chim acta* 2007; 375: 162-164.
- (99) Lekamge DN, Barry M, Kolo M, Lane M, Gilchrist RB, Tremellen KP. Anti-Müllerian hormone as a predictor for IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:602-610.
- (100) Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005; 20: 3178-3183.
- (101) Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008 (in press).
- (102) Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79: 63-68.

- (103) Lee TH, Chen CD, Tsai YY, Chang LJ, Ho HN, Yang YS. Embryo quality is more important for younger women whereas age is more important for older women with regard to in vitro fertilization outcome and multiple pregnancy. *Fertil Steril* 2006; 86: 64-69.
- (104) Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: preventies and treatment. *Fertil Steril* 1992; 58: 249-261.
- (105) Nakhuda GS, Chu MC, Wang JG, Sauer MV, Lobo RA. Elevated serum mullerian-inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006; 85: 1541-1543.
- (106) La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007; 22: 766-771.
- (107) Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih, YT, Ho HN, Yang YS, Lee MS. Serum anti-müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod* 2008; 23: 160-167.
- (108) Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002; 77: 141-146.
- (109) Pigny P, Merlen E, RObert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5957-62.
- (110) Mulders AG, Laven JS, Eijkmans MJ, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BC. Changes in anti-Müllerian hormone serum concentration over time suggest delayed ovarian ageing normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 2036-2042.
- (111) Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carillo A. Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 962-965.
- (112) Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal M, Ben-Chetrit A, Algur N, Zylber Haran E, Brooks B et al. Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. *Hum Reprod* 2005; 20: 1814-1819.
- (113) Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum Anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 941-945.
- (114) Chu MC, Carmina E, Wang J, Lof RA. Müllerian-inhibiting substance reflects ovarian findings in women with polycystic ovary syndrome better than does inhibin B. *Fertil Steril* 2005; 84: 1685-1688.
- (115) La Marca A, Orvieto R, Giulini S, Jasonni VM, Volpe A and De Leo V. Mullerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics. *Fertil Steril* 2004; 82: 970-972.
- (116) Piltonen T, Morin-Papunen L, Koinvunen R, Perheentupa A, Ruokonen A, Tapanainen JS. Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in patients wit polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005; 20: 1820-1826.
- (117) Fanchin. AMH dynamics during COH. *Hum Reprod* 2003; 18: 328.
- (118) Jonard S, Robert Y, Cortet Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod* 2003; 18: 598-603.
- (119) Holschneider C.H., Berek J.S., Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin. Surg. Oncol.* 2000; 19: 3-10.
- (120) Malmstrom H, Hogberg T, Risberg B, Simonsen E. Granulosa cell tumors of the ovary: prognostic factors and outcome. *Gynecol Oncol* 1994; 52: 50-55.
- (121) Stenwig JT, Hazekam JT, Beecham JB: granulosa cell tumors of the ovary; a clinicopathological study of 118 cases with long-term follow-up. *Gynecol Oncol* 1979; 7:136-152.
- (122) Bjorkholm E, Silfersward C: Prognostic factors in granulosa cell tumors. *Gynecol oncol* 1981; 11: 261-274.
- (123) Jeong YY, Outwater EK, Kang HK Imaging evaluation of ovarian masses. *Radigraphics* 2000; 20: 1445-70.
- (124) East N, Alobaid A, Goffin F, Ouallouche K, Gauthier P. Granulosa cell tumour: a recurrence 40 years after initial diagnosis. *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27: 363-4.
- (125) Hines JF, Khalifa MA, Moore JL, Fine KP, Lage JM, Barnes WA. Recurrent granulosa cell tumor of the ovary 37 years after initial diagnosis: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 484-8.
- (126) Fox H., Agrawal K, Langley F.A. Clinicopathologic study of 92 cases of granulosa cell tumor of the ovary with special reference to the factors influencing prognosis. *cancer* 1975; 35: 231-241.



- (127) Crew KD, Cohen MH, Smith DH, Tiersten AD, Feirt NM, Hershman DL. Long natural history of recurrent granulosa cell tumor of the ovary 23 years after initial diagnosis: a case report and review of the literature. *Gynecol oncol* 2005; 96: 235-240.
- (128) Lappohn RE, Burger HG, Bouma J, Bangah M, Krans M, Bruijn HW. Inhibin as a marker for granulosa-cell tumors. *N Eng J Med* 1989; 321: 790-793.
- (129) Healy DL, Burger HG, Mamers P, Jobling T, Bangah M, Quinn M, Grant P, Day AJ, Rome R and Capbell JJ. Elevated serum inhibin concentrations in postmenopausal women with ovarian tumors. *N Eng J Med* 1993; 329: 1539-1542.
- (130) Jobling T, Mamers P, Healy DL, Maclachlan V, Burger HG, Quinn M et al. A prospective study of inhibin in granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol oncol* 1994; 55: 285-289.
- (131) Petraglia F, Luisi S, Pautier P, Sabourin JC, Rey R, Lhommé C, Bidart JM. Inhibin B is the major form of inhibin/activin family secreted by granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1029-1032.
- (132) Boggess JF, Soules MR, Goff BA, Greer BE, Cain JM, Tamimi HK. Serum inhibin and disease status in women with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol oncol* 1997; 64: 64-69.
- (133) Robertson DM, Cahir N, Burger HG, Mamers P, Groome N. Inhibin forms in serum from postmenopausal women with ovarian cancers. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 381-386.
- (134) Robertson DM, Cahir N, Burger HG, Mamers P, McCloud PI, Pettersson K, McGuckin M. Combined inhibin and CA125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 1999; 45: 651-658.
- (135) Mom CH, Engelen MJA, Willemse PHB, Gietema JA, ten Hoor KA, de Vries AGE, van der Zee AGJ. Granulosa cell tumors of the ovary: the clinical value of serum inhibin A and B levels in a large single center cohort. *Gynecol Oncol* 2007; 105:365-372.
- (136) Tsigkou A, Marrelli D, Reis FM, Luisi S, Silva-Filho AL, Roviello F, Triginelli SA, Petraglia F. Total inhibin is a potential serum marker for epithelial ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2526-2531.
- (137) Robertson DM, Stephenson T, Pruyers E, Burger HG, McCloud P, Tsigos A, Groome N, Mamers P, McNeillage J, Jobling T, Healy D. Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 191: 97-103.
- (138) Timmerman *et al.* Inclusion of CA-125 does not improve mathematical models developed to distinguish between benign and malignant adnexal tumors. *Journal of clinical oncology* 2007; 25: 4194 .
- (139) Gustafson ML, Lee MM, Scully RE, Moncure AC, Hirakawa T, Goodman A, Muntz HG. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovarian sex-cord tumor. *N Eng J Med* 1992; 13; 326: 466-471.
- (140) Rey RA, Lhommé C, Marcillac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N. et al. Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with  $\alpha$ -inhibin and estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 958-965.
- (141) Lane AH, Lee MM, Fuller AF, Kehas DJ, Donahoe PK, MacLaughlin DT. Diagnostic utility of Müllerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecol oncol* 1999; 73: 51-55.
- (142) Long W, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H *et al.* Detection of minimal levels of serum anti-müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 540-544.
- (143) Vigier B, Tran D, du Mesnil du Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *J Reprod Fertil* 1983; 69: 207-214.
- (144) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS Baird, DT and Mc Neilly AS. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 717-723.
- (145) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Priddle J, Weaver K and Mc Neilly AS. Quantification of inhibin Pro- $\alpha$ C containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme linked immunosorbent assay, *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2926-2932.
- (146) Streuli I, Fraisse T, Chapron C, Bijaoui G, Bischof P, de Ziegler D. Clinical uses of Anti-Müllerian hormone assays: pitfalls and promises. *Fertil Steril* 2008.
- (147) La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Gianella, Volpe A. Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *Journal of the society for gynaecologic investigation* 2005; 12: 545-548.
- (148) Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfel C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain or maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 247-57.
- (149) Vigier B, Legeai L, Picard JY, Josso N. A sensitive radioimmunoassay for bovine anti-Müllerian hormone, allowing its detection in male and female fetal serum. *Endocrinology* 1982; 111: 1409-11.
- (150) Al-Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johns J, Cranfield M, Vsser JA, Themmen AP and Groome NP. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Müllerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol* 2005; 63: 267-273.

(151) Bersinger NA, Wunder D, Birkhäuser MH, Grubowdencke J. Measurement of anti-mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA in assisted reproduction: differences between serum and follicular fluid. Clin Chim Acta 2007; 384: 174-175.

5) “grey literature”

(152) Bijsluiter: Inhibin-B assay ELISA kit MCA1312KZZ, Oxford Bio-Innovation Ltd., Oxford UK.

(153) Bijsluiter: Active® Inhibin B ELISA DSL-10-84100, Texas USA.

(154) Bijsluiter: EIA AMH/MIS Immunotech/Beckman Coulter, Marseille Frankrijk.

(155) Bijsluiter: Active® Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone (MIS/AMH): DSL-10-1400, Texas USA.

**APPRAISAL****1. FYSIOLOGISCHE ROL VAN INHIBINE A&B EN AMH****1.1. Inhibine****1.1.1. Structuur en verschillende moleculaire vormen**

Inhibines en activines zijn polypeptide hormonen die behoren tot de 'transforming growth factor- $\beta$ ' (TGF- $\beta$ ) superfamilie van de cytokines. Na synthese van de preprohormonen worden deze gekliefd en ontstaan de verschillende subunits waaruit inhibine/activine opgebouwd is. Inhibines zijn heterodimeren bestaande uit een  $\alpha$ -subunit gebonden aan ofwel een  $\beta_A$  subunit (inhibine A) ofwel aan een  $\beta_B$  subunit (inhibine B) door middel van disulfidebruggen. Activines zijn homo- of heterodimeren van de  $\beta_A$  of  $\beta_B$  subunits waaruit activine A, B en AB kunnen worden gevormd. De subunits van inhibine en activine worden apart aangemaakt en geven aanleiding tot verschillende moleculaire vormen. De monomerische  $\alpha$ -subunit wordt in vrije vorm teruggevonden in de circulatie, in hogere molaire concentratie dan de dimerische vormen. Enkel de dimerische vormen zijn biologisch actief. Activines en inhibines kunnen allebei reversibel binden aan  $\alpha_2$ -macroglobuline, dat een lage affiniteit voor inhibine heeft, maar aanwezig is in grote hoeveelheden in het plasma (18) (Figuur 1).

**1.1.2. Endocrinologische rol**

De dimerische vormen van inhibine worden vooral gesynthetiseerd en gesecreteerd in het reproductieve systeem (ovaria en testis), maar ook door niet-gonadale weefsels zoals de placenta, de foeto-placentale unit en de hypofyse. De secretie van inhibine gebeurt meer specifiek door de granulosa-cellen van de ovaria in de vrouw en door de Sertoli-cellen van de testis in de man. De monomerische  $\alpha$ -subunit wordt ook door andere weefsels aangemaakt zoals door de hersenen en de bijnier (19, 20). De biosynthese van de inhibines wordt geregeld door het follikel stimulerend hormoon (FSH), luteïniserend hormoon (LH) en somatomedine C (21). De effecten van zowel inhibine A als B op de ovaria worden gemedieerd door de hypofyse met een klassiek feedback mechanisme.

Bij de vrouw worden zowel inhibine A als inhibine B geproduceerd, maar bij de man is inhibine B het belangrijkste circulerend inhibine. De primaire endocriene rol van inhibine B is de regulatie van de gametogenese door een negatief feedback-mechanisme op de FSH productie door de hypofyse (Figuur 2). Zowel bij vrouwen als mannen zijn inhibine B concentraties omgekeerd gecorreleerd met FSH concentraties. De inhibines blijken ook een lokale paracriene rol te hebben in de gonaden zoals bijvoorbeeld de stimulatie van de androgeensynthese in de theca cellen onder invloed van inhibine A (22). In figuur 3 wordt het serum inhibine B bij de man weergegeven in relatie tot de leeftijd. De concentratie van inhibine B bij de volwassen man volgt een diurnaal ritme, met hogere concentraties 's morgens dan in de late namiddag en avond (23).

**1.1.3. Profiel bij de vrouw - variatie tijdens menstuele cyclus?**

Bij de vruchtbare vrouwen blijken inhibine A & B een verschillend periodisch verloop te hebben tijdens de menstuele cyclus (Figuur 4). Inhibine A stijgt in de late folliculaire fase en bereikt een maximum in de luteale fase met een intermediaire piek bij de ovulatie. De functie van inhibine A tijdens de luteale fase is nog niet duidelijk.

Inhibine B daarentegen begint vroeg folliculair te stijgen en bereikt zijn maximum midden in de folliculaire fase en stijgt tot een tweede piek bij de ovulatie. In de luteale fase daalt het terug naar zijn basale waarde. Het stijgen van FSH bij het begin van de cyclus is de belangrijkste stimulus voor inhibine B secretie (24, 25). Inhibine A wordt grotendeels

geproduceerd door de dominante follikel en het corpus luteum, terwijl inhibine B gesecreëerd wordt door de kleinere antrale follikels tijdens hun ontwikkeling. Tijdens de zwangerschap wordt inhibine A door de foeto-placentale unit geproduceerd en het serum inhibine A bereikt op het einde van de zwangerschap zeer hoge waarden (26, 27). Bij postmenopauzale vrouwen zijn de inhibine spiegels zeer laag of ondetecteerbaar, wat de afwezigheid van folliculaire activiteit weerspiegelt.

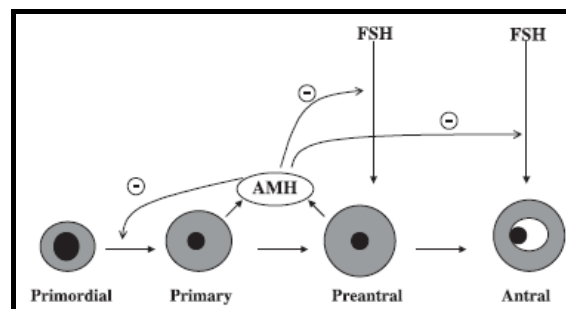
## 1.2. Anti-Müller-hormoon

### 1.2.1. Structuur

Anti-Müller-hormoon, ook wel Müllerian duct inhibiting substance (MIS) genoemd, is een homodimerisch glycoproteïne en is net zoals de inhibines/activines lid van de ‘transforming growth factor- $\beta$ ’ (TGF- $\beta$ ) superfamilie. AMH wordt gesynthetiseerd als een groot precursormolecuule met een korte signaalsequentie, gevolgd door het preprohormoon dat de homodimeren vormt. Voor de secretie, ondergaat het hormoon glycosylatie en dimerisatie. Tijdens de cytoplasmatische transit wordt AMH gekleefd in een N-terminaal fragment en een bio-actief C-fragment. Deze twee fragmenten worden door een niet-covalente binding samengehouden.

### 1.2.2. Endocrinologische rol

AMH wordt enkel gesynthetiseerd door de reproductieve organen (29). AMH komt sterk tot expressie in de Sertoli-cellen vanaf de foetale testiculaire differentiatie (vanaf 7<sup>de</sup> week) tot de puberteit. Wanneer de testosteronproductie in de testis begint te stijgen, vermindert de expressie van AMH (28, 29) (Figuur 3). AMH induceert bij de man de regressie van de Müllerse gang, wat de voorloper van het vrouwelijk geslachtsapparaat is. AMH wordt door de granulosa-cellen bij de vrouw geproduceerd ten vroegste vanaf de 36<sup>ste</sup> week van de zwangerschap, ruim na de periode van de geslachtsdifferentiatie, tot de menopauze (30). AMH wordt reeds geproduceerd door de primaire follikels. De expressie is het sterkst in de pre-antrale en kleine antrale follikels (< 4 mm). AMH expressie verdwijnt in de grotere follikels en valt weg in de follikels groter dan 8-10 mm. AMH komt niet langer tot expressie in de FSH afhankelijke eindstadia van de follikelgroei. Fanchin *et al.* rapporteerde dat de mediane folliculaire AMH concentratie ongeveer driemaal hoger is in kleine follikels (< 8 mm) dan in de grote follikels (16-20 mm) (31). Dit expressie patroon suggereert dat AMH een rol speelt bij de initiële recruterings en selectie van de dominante follikel. AMH dat door de groeiende follikels wordt geproduceerd werkt als een negatief paracrien feedback signaal. AMH verhindert namelijk recruterings van de niet-dominante follikels en vermindert de gevoeligheid van de granulosa-cellen voor de stimulerende werking van FSH. De mechanismen die de ovariële expressie van AMH regelen zijn tot nu toe nog ongekend (Figuur 5).



Figuur 5: AMH wordt gesecreëerd door de primaire en preantrale follikels en inhibeert de follikelrecruterings en de FSH gestimuleerde follikelgroei.

### 1.2.3. Profiel bij de vrouw - variatie tijdens menstruele cyclus?

Tijdens heel hun leven zijn de AMH waarden lager bij vrouwen dan bij mannen (Figuur 6). AMH stijgt bij de vrouw vanaf de geboorte tot 2-4 jaar en blijft hierna stabiel tot de puberteit. Vervolgens daalt AMH als teken van uitputting van de folliculaire reserve (32). Tijdens de zwangerschap en na de bevalling blijft AMH volgens recente gegevens constant (33). Concentraties van ovariële hormonen variëren meestal sterk tijdens de menstruele cyclus. AMH daarentegen zou constant blijven tijdens de menstruele cyclus en AMH spiegels, die op verschillende tijdstippen tijdens de menstruele cyclus worden gemeten, zouden minimaal fluctueren. Deze minimale veranderingen in serum AMH komen overeen met de continue niet cyclische groei van de kleine follikels. AMH spiegels lijken dus onafhankelijk van gonadotrofines die tussenkomen in het hypothalamo-ovariële feedback systeem. Deze bevindingen bleken uit verschillende studies. La Marca *et al.* (2004) onderzocht AMH in de folliculaire fase bij 24 vrouwen en vond geen variaties in AMH tijdens deze fase (34). Twee longitudinale studies waarin AMH en andere hormonen, die tot de hypofysaire gonadale as behoren, werden gemeten, vonden eveneens geen variaties in AMH tijdens de cyclus (35, 36). In 2007 bevestigde Tsepelidis *et al.* eveneens deze bevinding (37) (Figuur 7). Fanchin *et al.* wees in 2005 ook al op de goede reproduceerbaarheid van herhaalde serum AMH metingen (38). In tegenstelling hiermee vond Cook *et al.* in een studie van 20 vrouwen met normale menstruele cyclus dat AMH steeg in het midden van de cyclus. Echter in deze studie werden geen andere hormonen bepaald (39). Zeer recent verschenen data, die zoals de studie van Cook *et al.* een mogelijke diurnale variatie van AMH suggereren (40). Deze studie werd uitgevoerd op 36 jonge, gezonde vrouwen met normaal gewicht en regelmatige menstruele cyclus. Er werd gerapporteerd dat de mediane AMH concentratie statistisch significant hoger is tijdens de late folliculaire fase wanneer vergeleken werd met de ovulatie of de vroege luteale fase. Deze contradictie tussen verschillende studies kan te maken hebben met verschillen in de samenstelling of grootte van de studiepopulatie. Zo is de onderzochte populatie van La Marca *et al.* (2006) veel kleiner (N = 12) dan de andere studies (35). In de studie van Hehenkamp *et al.* worden 44 oudere vrouwen (einde vruchtbare leeftijd, gemiddelde 38,3 jaar) bestudeerd, terwijl in de studie van Wunder *et al.* 36 jonge vrouwen (gemiddelde 25,5 jaar) werden onderzocht (36, 40).

Bestaat er nu toch een wederzijdse beïnvloeding tussen AMH en circulerende gonadotrofines of steroidhormonen? Een recente studie toont aan dat de AMH waarden niet beïnvloed worden door exogene toediening van geslachtshormonen, gebruikt voor contraceptie (41). Deze studie bestudeerde 24 jonge vrouwen met een regelmatige menstruele cyclus, waarvan 14 vrouwen orale of vaginale contraceptie (oestrogenen/progestagen) kregen en 10 vrouwen zonder contraceptie werden gevolgd. De AMH waarden, op verschillende tijdstippen tijdens de cyclus gemeten, blijven binnen de intercyclus variabiliteit van de controlegroep. De correlatiegegevens tussen AMH en FSH en AMH en vrij testosteron, gevonden in de studie van Wunder *et al.* suggereren daarentegen wel een mogelijke beïnvloeding van AMH op circulerend gonadotrofine en steroidhormonen concentraties (40).

## 2. MOGELIJKE TOEPASSINGSGBIEDEN: hebben deze hormonen een meerwaarde in de klinische praktijk?

### 2.1. Man

#### 2.1.1. Prepuberale man

Zowel inhibine B als AMH hebben een rol in de pediatrische klinische praktijk. De prepuberale inhibine B concentratie is een merker voor het aantal en de integriteit van de Sertoli-cellen (42, 43). Zeer hoge prepuberale AMH concentraties worden gevonden bij de man, omdat AMH wordt geproduceerd door de onrijpe Sertoli-cellen. AMH is eveneens een uitstekende merker voor het aantal en de functie van de Sertoli-cellen tot de puberteit (44). Na de puberteit worden zeer lage AMH waarden teruggevonden (Figuur 6). Door meting van beide hormonen kan de testisfunctie worden geëvalueerd. Bepaling van serum AMH en inhibine B kunnen nuttig zijn bij jongens met testiculaire pathologie, zoals cryptorchidie en dysgenese.

#### A. CRYPTORCHIDIE

##### ➤ *Inleiding*

De incidentie van cryptorchidie of niet ingedaalde testes is 3-6% van de voldragen mannelijke baby's en 30% bij premature kinderen. Dit percentage daalt tot 1-2% op de leeftijd van 3 maanden omdat frequent spontane indaling plaatsvindt (45). In eerste instantie wordt dus best een afwachende houding aangenomen. Wanneer na 6 maanden de testes nog niet zijn ingedaald, wordt chirurgische orchidopexie of een hormonale behandeling overwogen omdat cryptorchidie geassocieerd is met een 10-voudig hoger risico op maligniteit en infertiliteit. Beeldvormingstechnieken voor het aantonen van niet ingedaalde testes missen 10-20% van intra-abdominale gonaden (46, 47). Ook basale serumwaarden van gonadotrofines en testosteron zijn tijdens de kinderjaren vaak laag en niet diagnostisch. Een hormonale beoordeling vereist human choriongonadotrofine (hCG) stimulatie (48). Inhibine B blijkt een mogelijke merker voor testiculair weefsel, maar is slechts in een beperkt aantal kinderen getest (49). AMH blijkt wel een gevoelige merker voor de identificatie van testisweefsel in jongens met cryptorchidie. Normale of detecteerbare waarden voor AMH hebben een hoge predictieve waarde voor de aanwezigheid van testes (32, 50, 51). Terwijl ondetecteerbare waarden anorchie suggereren. Bepaalde jongens met het zeldzame 'persistent Mullerian duct syndrome (PMDS)', te wijten aan een MIS genmutatie, geeft ook ondetecteerbare waarden. Om de diagnose van PMDS uit te sluiten, dient de Leydig-cel functie worden getest door hCG stimulatie. De Leydigcel functie blijft bewaard in deze patiënten.

##### ➤ *Diagnostische performantie*

Twee studies onderzochten de predictieve waarde van AMH voor het onderscheid te maken tussen niet ingedaalde testes en anorchie (50, 51). De data van deze 2 studies werden gecombineerd en gelimiteerd tot 116 jongens met cryptorchidie en normale externe genitaliën. Door chirurgisch onderzoek en/of bioptiename werd de aanwezigheid van testisweefsel aangetoond. AMH werd gecategoriseerd als ondetecteerbaar, laag (waarde - 2 SD voor de leeftijd) en normale waarde voor de leeftijd (Tabel 19). AMH heeft een sensitiviteit van 98% en specificiteit van 91% voor de identificatie van testiculair weefsel. Een AMH concentratie in de normale range is 100% voorspellend voor de aanwezigheid van testes, terwijl een meetbaar maar lage AMH waarde 86% predictief is voor testisweefsel. Een niet meetbare AMH waarde heeft een NPV van 94% voor anorchie (50, 51).

**SAMENVATTING**

Zowel inhibine B als AMH zijn indicators van het Sertoli-cel aantal en functie. Serum AMH is de meest performante merker voor het aantonen van testisweefsel. Een meetbare serum AMH concentratie wijst op de aanwezigheid van testes. Een ondetecteerbare AMH waarde is sterk suggestief voor anorchie. Voordat een chirurgische interventie bij jongens met niet-scrotale testikels wordt uitgevoerd, is een AMH bepaling als screeningstest voor de aanwezigheid van testisweefsel aangeraden.

**B. DYSGENESE/ INTERSEX CONDITIE**

AMH is ook bruikbaar bij de evaluatie en het categoriseren van de etiologie van intersex condities (52). Bij deze problematiek is zowel testosteron als AMH bepaling van belang, want testosteron reflecteert de Leydig-cel functie, terwijl AMH de Sertoli-cel functie weerspiegelt. In 46, XY patiënten met vrouwelijke of ambiguë externe genitaliën is de androgeenpathway verstoord. Androgeenongevoeligheid of testosteron biosynthese defecten zijn defecten van Leydig-cel functie en zijn geassocieerd met normale of verhoogde AMH waarden. In normale omstandigheden wordt AMH gedownreguleerd door intratesticulair testosteron. Bij androgeenongevoeligheid is deze inhibitie afwezig, wat tot de hoge AMH waarden leidt. Bij patiënten met een 5 $\alpha$ -reductase deficiëntie gebeurt deze downregulatie van AMH door testosteron wel normaal. In de meerderheid van de patiënten (71%) met histologisch abnormale testes is de serum AMH concentratie abnormaal laag voor de leeftijd (11). Bij dysgenese komen dus verlaagde waarden van zowel AMH als testosteron voor. Het zijn eerder gecombineerde defecten van zowel de Leydig-cellen als Sertoli-cellen. Bij mutaties van de LH receptor of in steroidproteïnen worden dan weer zeer hoge AMH waarden gevonden.

AMH bepaling helpt ook om te differentiëren tussen gonadale of niet-gonadale oorzaken van milde virilisatie in fenotypische meisjes (53). In 46, XX prepuberale geviriliseerde meisjes met ovaria is het serum AMH doorgaans ondetecteerbaar. Kinderen met afwijkingen in de testosteronsecretie of bij androgeenongevoeligheid hebben AMH waarden binnen de normale range voor mannen of hoger, terwijl bij diegenen met dysgenetische testes of ovotestes de AMH waarden in de lage mannelijke of hoge vrouwelijke range liggen.

AMH werd tevens vergeleken met cytogenetische analyse voor het voorspellen van de aanwezigheid van testiculair weefsel in een groep van 25 geviriliseerde meisjes met histologisch bewezen testiculair weefsel. Een AMH waarde boven de normale range voor vrouwen detecteerde 92% (23/25 cases), terwijl karyotypering slechts 60% (15/25 cases) van de meisjes identificeerde. Dus in 10 van de 25 meisjes met een 46, XX karyotype, was testiculair weefsel aanwezig (11). In [tabel 1](#) wordt de interpretatie van serum AMH waarden in jongens met cryptorchidie en kinderen met intersex condities weergegeven.

**SAMENVATTING**

AMH helpt bij de differentiële diagnose van afwijkingen van de gonadale oorsprong én afwijkingen geassocieerd met testiculaire enzymdefecten/androgeenongevoeligheid. Bij geviriliseerde meisjes kan serum AMH bepaling nuttig zijn om de al dan niet gonadale pathologie op te helderen.

**2.1.2. Volwassen man**

Stijgende inhibine B concentraties zijn het teken van een naderende puberteit en kunnen worden gebruikt om de puberale ontwikkeling te bestuderen, wanneer de negatieve FSH versus inhibine B relatie onwikkeld wordt.

## A. SPERMATOGENESE

### ➤ *Klassieke merkers: inleiding*

Klassieke merkers voor de spermatogenese zijn testiculaire histologie, semen kwaliteit, testiculair volume en serum concentraties van FSH, LH en testosteron.

*Testiculaire histologie* maakt het mogelijk om het spermatogene epitheel te beoordelen. De biopsie score (Johnson) is gebaseerd op het aantal spermatozoa waargenomen in het lumen van de tubuli seminiferi en is de gouden standaard voor de classificatie van de spermatogenese.

*Semen analyse* is meestal het eerste onderzoek voor de mannelijke partner bij een fertiliteitsonderzoek. De WHO heeft guidelines opgesteld voor de uitvoering van de analyse en classificatie van de semen kwaliteit (3). Semen analyse is essentieel in de evaluatie van de subfertiliteit omdat een normale testiculaire histologie een niet-testiculaire oorzaak van abnormaal semen niet uitsluit.

*Testiculair volume* wordt meestal gemeten met een Prader orchidometer. Volgens de WHO guidelines is de normale grootte van de testis  $\geq 15$  ml (2, 4).

*Serum FSH en LH* reflecteren indirect de activiteiten van de twee testiculaire compartimenten (Figuur 2). FSH is een nuttige parameter voor de beoordeling van de spermatogenese. Een subnormale FSH concentratie kan wijzen op een hypofysaire oorzaak van subfertiliteit, terwijl gestegen FSH waarden een testiculaire verstoring kunnen suggereren.

### ➤ *Inhibine B als nieuwe merker en zijn diagnostische performantie*

Afwijkende serum inhibine B waarden werden opgemerkt bij mannen met testiculaire dysfunctie (cryptorchidie, subnormaal sperma-aantal, azospermie en Klinefelter syndroom). Serum inhibine B is positief gecorreleerd met de spermacentratie, het testiculair volume en de Johnsonscore (54, 55, 56). Wanneer inhibine B en de testiculaire histologie werden vergeleken in een kleine studie ( $n = 22$ ) bleek inhibine B een sensitiviteit en specificiteit van 83 en 90% te hebben voor de differentiatie tussen normale en verstoorde spermatogenese (cut-off  $< 139$  pg/ml). FSH had een sensitiviteit en specificiteit van 75 en 80% (cut-off  $> 4,9$  IU/L) (54). Bohring *et al.* rapporteerde gelijkaardige gegevens in 52 patiënten met het histologisch bewijs van aanwezigheid van spermatozoa. Een sensitiviteit en specificiteit van inhibine B van 78 en 80% (cut-off  $< 79$  pg/ml) werden bepaald. FSH heeft een sensitiviteit en specificiteit van 82 en 80% (cut-off  $> 10$  IU/ml) (57). De prognostische waarde verbetert als beide parameters worden gecombineerd. (sens. 88% en spec. 83%) (59). In enkele studies wordt een positieve correlatie tussen serum inhibine B en het aantal intratesticulaire spermatiden aangetoond én een negatieve correlatie met het percentage 'Sertoli cell only' tubuli (58, 59). Inhibine B is sterker gecorreleerd met het sperma-aantal dan FSH. Jensen *et al.* rapporteerde zelfs dat de combinatie van een lage inhibine B concentratie ( $< 80$  ng/L) en gestegen FSH ( $> 10$  IU/L) 100% voorspellend is voor een sperma-aantal onder de 20 miljoen/ml (55). In het algemeen zijn inhibine B concentraties lager in patiënten met een ernstigere kwalitatieve verstoring van de spermatogenese. De laagste inhibine B concentratie wordt bij een compleet 'Sertoli cell only syndroom' gemeten. In 2004 rapporteerde Andersson *et al.* teleurstellende predictieve waarden voor inhibine B en FSH alleen of de combinatie van beide merkers voor infertiliteit in populaties met verschillende prevalentie van infertiliteit (Tabel 2) (60). Hieruit kon worden besloten dat de diagnose van mannelijke infertiliteit niet kan worden gebaseerd op deze hormonen alleen. Deze hormonen zijn complementair aan de semen analyse en het klinisch onderzoek. Deze hormonen zijn vooral van belang wanneer ze niet correleren met het resultaat van het semen onderzoek. Een hoge inhibine B concentratie is samen met azoospermie suggestief voor een obstructieve vorm van azoospermie, hoewel een spermatogene stop in een laat spermatocytenstadium ook een mogelijke verklaring is.



Na een interventie kunnen inhibine B concentraties worden gevolgd om de veranderingen in de spermatogenese te detecteren. Een stijging van inhibine B wordt gemeten na een GnRH behandeling van hypogonadotrofische mannen, FSH behandeling en varicocoele chirurgie. Een daling wordt gemeten na exogene toediening van testosteron, chemotherapie of testiculaire bestraling.

➤ *AMH als merker?*

Inhibine B heeft een hogere voorspellende waarde dan AMH voor het aantal spermatozoa in het ejaculaat of microscopische beoordeling van testisbiopsieën (8). Zowel serum AMH als serum inhibine B blijken significant lager te zijn in mannen met niet-obstructieve azoöspermie (NOA) in vergelijking met mannen met obstructieve azoöspermie. Er wordt gesuggereerd dat deze hormonen merker voor NOA kunnen zijn (61). AMH wordt bij de man zowel naar de circulatie als naar de tubuli seminiferi gesecreteerd. De concentratie in seminaal plasma is hoger dan in serum (62, 63). Een studie toonde aan dat de seminale concentratie van AMH in mannen met oligozoospermie significant lager is dan in normale mannen (63). Ook werd gerapporteerd dat seminaal AMH ondetecteerbaar is in mannen met NOA (62). Dit suggereert dat seminaal AMH de spermaproductie reflecteert. Fénichel *et al.* concludeerde dat de PPV van seminaal AMH voor sperma identificatie 70% is en zijn NPV 83%. Nochtans lijkt het bestuderen en meten van serum AMH interessanter dan het meten van AMH in seminaal plasma omdat hierin meerdere seminale proteases aanwezig zijn, die AMH kunnen afbreken (64).

## B. PREDICTIE VAN TESTICULAIRE SPERMA EXTRACTIE

Bij mannen met NOA worden voor ‘assisted reproduction treatment (ART)’ spermaticiden geïsoleerd via testiculaire sperma extractie (TESE). De slaagkans van een sperma isolatie is slechts 50% (65). De procedure kan bovendien gepaard gaan met complicaties zoals infecties, devascularisatie en fibrose. Succesvolle TESE kan meerdere biopsies vereisen en is dus niet gebaseerd op een gestandaardiseerde hoeveelheid weefsel. Succesvolle TESE is dus een niet-kwantitatieve beschrijving van de spermatogenese (66). Ezech *et al.* wees op het combineren van 2 histologische criteria om het slagen van TESE te voorspellen namelijk de aanwezigheid van spermaticiden in het testisweefsel en de Johnson’s score. Deze combinatie geeft een sensitiviteit van 93% en specificiteit van 75% (67). De niet-kwantitatieve uitkomst van TESE, het gebrek aan standaardisatie, de verschillende studiepopulaties (aantal en selectiecriteria) en de heterogeniteit van de spermatogenese over het testisweefsel verklaart de controverse rond de predictieve waarde van inhibine B voor succesvolle TESE (10, 59, 66, 68, 69, 70). In [tabel 3](#) worden de performantiekarakteristieken van verschillende hormonen voor verschillende studies gegroepeerd. De predictieve waarde is over het algemeen teleurstellend en de meeste studies concluderen dat enkel histologische parameters een predictieve waarde voor de uitkomst van TESE hebben.

AMH lijkt ook geen goede predictor voor de efficiëntie van sperma verwijdering bij mannen met niet-obstructieve azoospermia (64).

### **SAMENVATTING**

Serum inhibine B is een goede endocriene indicator voor de kwaliteit van de spermatogenese én is geassocieerd met de klassieke merkers van de spermatogenese. Het semen onderzoek en het klinisch onderzoek blijven de hoeksteen van de evaluatie van de mannelijke (in)fertiliteit. FSH en inhibine B kunnen aanvullende informatie geven en dienen steeds samen te worden geïnterpreteerd. AMH blijkt in deze context ondergeschikt aan inhibine B. Zowel inhibine B als AMH zijn geen geschikte predictors voor de efficiëntie van sperma verwijdering (TESE).

**Tabel 4:** Overzicht van de toepassingen van serum inhibine B en AMH in de prepuberale en volwassen man (9).

	Hormonen en andere bevindingen	Indicatief voor:
<b>Prepuberaal</b>		
	Ondetecteerbaar AMH en inhibine B	Afwezigheid van testisweefsel (anorchie)
	Geen voelbare testes, AMH en inhibine B detecteerbaar	Cryptorchidie
	Leeftijds-gestandaardiseerd inhibine B en AMH concentraties	Aantal en integriteit van de Sertolicellen: puberale ontwikkeling
	Hoog testosteron en laag AMH voor de puberteit	Vroegtijdige puberteit
<b>Volwassen man</b>		
	Laag inhibine B, hoog FSH	Verstoorde spermatogenese
	Laag inhibine B, (hoog FSH), azoöspermie	Idiopathische azoöspermie*
	Laag inhibine B, laag FSH	Hypogonadotrofisch hypogonadisme

\* geen biopsie nodig om onderscheid te maken met obstructieve azoöspermie

## 2.2. Vrouw

### 2.2.1. Ovariële reserve

AMH wordt naar voor geschoven als merker voor de ovariële reserve omdat dit hormoon de primordiale follikelpool zowel kwantitatief als kwalitatief weerspiegelt (31).

#### A. MENOPAUZE/ OVARIELE VEROUDERING

##### ➤ Inleiding

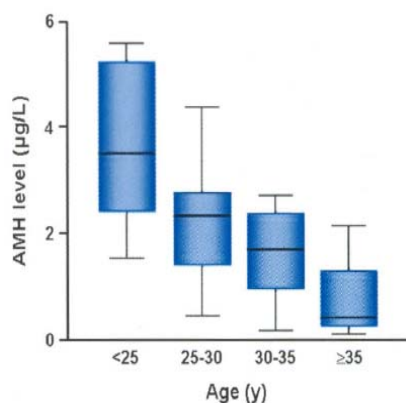
Ovariële veroudering wordt omschreven als daling van de primordiale follikelpool. Directe meting is onmogelijk. Het aantal primordiale follikels wordt immers wel indirect weerspiegeld door het aantal groeiende follikels. Wanneer het follikelaantal onder een kritische drempel komt van een duizendtal follikels, wordt de menstruele cyclus bij de vrouw onregelmatig (71, 72). Deze periode, die de menopauze vooraf gaat, wordt menopauzale transitie genoemd. De gemiddelde leeftijd, waarbij menopauze optreedt, is 51 jaar, maar varieert van 40-60 jaar (73). Omwille van deze grote variatie is leeftijd een relatief slechte indicator van ovariële veroudering. Tijdens de menopauzale transitie verhoogt het serum FSH. Naast FSH zijn er andere testen om de ovariële reserve in te schatten. Inhibine B daalt vroeger dan FSH stijgt en zou een goede vroege merker zijn (74). Het is evident dat het aantal antrale follikels (AFC), geteld met endovaginale echografie, tevens een goede maat voor de primordiale follikelpool is. AMH is voor dit toepassingsgebied ook een mogelijke merker, vermits het gesecreteerd wordt door de groeiende follikels en zo indirect informatie over de hoeveelheid primordiale follikels geeft (75, 76, 77).

##### ➤ AMH/Inhibine B en aging

Seriële metingen van AMH bij normaal ovulerende vrouwen tonen een daling aan van AMH met de leeftijd (Figuur 8). Serum AMH correleert met de leeftijd, FSH en het aantal antrale follikels. In de studie van de Vet *et al.* werd een groep van normo-ovulatoire vrouwen (N = 41) tweemaal onderzocht met een interval variërend van 1,1 tot 7,3 jaar. Gemiddeld werd een reductie van 38% in serum AMH waargenomen, terwijl het serum FSH, serum inhibine B, serum oestradiol en het aantal antrale follikels niet veranderde tijdens deze tijdspanne. Dus de daling van AMH met toenemende leeftijd gebeurt voordat er veranderingen van andere leeftijdsafhankelijke hormonen merkbaar zijn. Zowel AMH en AFC zijn gecorreleerd met de leeftijd én er bestaat een sterke correlatie tussen AMH en AFC (75) (Figuur 9). Deze

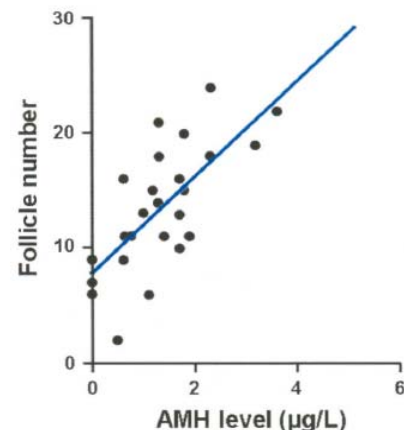
correlatie werd later ook door Fanchin *et al.* bevestigd, die ook een sterkere correlatie tussen AMH en AFC vond op cyclusdag 3 dan tussen AFC en de andere hormonen, die de ovariële functie evalueren (78). AMH blijkt dus momenteel de vroegste merker voor ovariële veroudering en menopauzale transitie te zijn (13, 75, 79). De studie van Van Rooij *et al.* bestudeerde 81 vrouwen tussen de 25-46 jaar met regelmatige menstruele cyclus op twee tijdstippen met een gemiddeld interval van 4 jaar. 14 vrouwen kregen in deze tijdspanne een onregelmatige cyclus. Deze vrouwen waren significant ouder en de serum FSH, AMH en inhibine B waarden en AFC verschilden significant tussen beide tijdstippen. AMH, AFC en leeftijd hadden de hoogste predictieve accuraatheid (ROC = 0.87, 0.80 en 0.82). Na correctie voor de leeftijd, waren enkel AMH en inhibine B significant geassocieerd met het onregelmatig worden van de cyclus (79). Lage inhibine B waarden zijn inderdaad ook indicatief voor afname van het aantal gerecruteerde antrale follikels, net zoals AMH (74). De beperkte correlatie tussen inhibine B met AMH en met AFC reflecteert misschien dat inhibine B niet enkel het aantal antrale follikels weerspiegelt, maar meer gerelateerd is met de veranderingen in de functionaliteit van de follikels met ouder worden (80, 81). AMH is nuttig als predictor van menopauzale transitie binnen 4 jaar. Wanneer AMH, in een 'multivariabelen model' gecombineerd wordt met inhibine B en leeftijd wordt een betere predictieve accuraatheid bekomen (ROC<sub>AUC</sub> = 0,92). Ook in deze studie vertoont AMH, in vergelijking met de andere merkers, als enige een gemiddelde longitudinale daling met de tijd (77).

Fig. 8)



Figuur 8: AMH spiegels bij vrouwen dalen met de leeftijd (75).

Fig. 9)

Figuur 9: AMH spiegels correleren met AFC bij cyclische vrouwen ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.001$ ) (75).

### **SAMENVATTING**

FSH, in veel laboratoria gemeten om gedaalde vruchtbaarheid/menopauze vast te stellen, is minder geschikt om menopauzale transitie te voorspellen, vermits het vaak pas begint te stijgen wanneer het cycluspatroon zeer onregelmatig is (82). Inhibine B kan ook dienst doen als menopauze merker. AMH is echter te verkiezen omdat AMH reeds daalt bij intrede van een onregelmatige cyclus en dus een veel vroegere merker is dan inhibine en FSH is. Zo kunnen vrouwen met reeds een gedaalde vruchtbaarheid sneller én beter worden geïdentificeerd.

### **B. NA THERAPIE BIJ KANKERPROBLEMATIEK**

Serum AMH is ook nuttig voor het identificeren van vrouwen met verminderde vruchtbaarheid na behandeling voor kanker tijdens hun kinder/jeugdijaren. Chemo- en radiotherapie (vooral protocols met cyclofosfamide, mechlorethamine en procarbazine bv.

MOPP of COPP) hebben gonadotoxische nevenwerkingen op de ovaria met als resultaat een partieel verlies van de primordiale follikels. Momenteel wordt de gonadale functie tijdens de follow-up van deze patiënten gemeten aan de hand van de analyse van LH en FSH. Nochtans reflecteert noch LH, noch FSH de ovariële reserve correct (83, 84). Bij deze patiënten wordt naast een gestegen FSH en een gedaald ovariumvolume, ook een gedaald serum AMH waargenomen t.o.v. een controlegroep. De inhibine concentraties daarentegen zijn vergelijkbaar in beide groepen. Het aantal antrale follikels blijkt ook vergelijkbaar in beide groepen, dit in tegenstelling tot het ovariumvolume en AMH (85). Dit gegeven ondersteunt ook nog eens de lage accurateheid van AFC metingen, die tevens sterk onderhevig zijn aan de inter-individuele variabiliteit van de uitvoerders. Bij jonge adolescenten is een endovaginale ultrasonografie tevens niet altijd mogelijk (86). In een recente studie van Van Beek *et al.* werden 32 vrouwen, die in hun kinder/jeugd jaren een Hodgkin lymfoom doormaakten, gevolgd gedurende gemiddeld 14 jaar. In deze studie wordt ook een gedaald inhibine gevonden bij de vroegere kankerpatiënten. Het AMH blijkt ook gedaald in patiënten met een normaal FSH, waardoor gesuggereerd wordt dat AMH een gevoeliger en vroegere merker is om gonadale schade te detecteren. Ook werden 2 groepen kankerpatiënten vergeleken o.b.v. het gekregen behandelingsprotocol, namelijk een al dan niet gecombineerde MOPP (mustargen-oncovin-procarbazine-prednisone) chemotherapie. De AMH concentraties in de MOPP-groep waren lager en het serum AMH daalde ook significant met een gestegen aantal MOPP cyclussen. Met inhibine werd er geen significant verschil gezien. (84). In een recente studie werden de AMH concentraties gemeten bij 25 vrouwen met een hematologische maligniteit voor en na de behandeling. Eén groep kreeg multi-drug chemotherapie en de andere groep onderging een stamceltransplantatie (SCT) na 'total body irradiation (TBI)'. Alle overlevenden met SCT ontwikkelden prematuur ovariëel falen (POF) en hadden ondetecteerbare AMH waarden. Het conditioneringsregime (TBI) voor SCT is dus een hoge risicofactor voor POF. Ook in de chemotherapie groep werden lagere AMH waarden teruggevonden. Deze patiënten, vooral diegenen die een SCT ondergaan, zijn kandidaten voor bepaalde fertiliteitsbewaringstechnieken zoals ovariële cryopreservatie en vitrificatie van gecollecteerde oocyten (87).

### **SAMENVATTING**

Bij patiënten die tijdens hun kinder/jeugd jaren behandeld werden met chemotherapeutische agentia vindt men een depletie van de ovariële 'pool'. Serum AMH blijkt superieur t.o.v. FSH, inhibine en AFC te zijn voor deze daling in ovariële reserve te detecteren, zowel in vrouwen met regelmatige cyclus als bij diegenen die orale anticonceptie nemen. De leeftijd, het behandelingsregime en het aantal cyclussen van gonadotoxische therapie zijn belangrijke factoren die de ovariële reserve beïnvloeden. AMH blijkt dus een waardevolle parameter voor deze patiënten met betrekking tot fertiliteitsadvies en toekomstige familieplanning.

## **C. (IN)FERTILITEIT- GECONTROLEERDE OVARIELE STIMULATIE**

### ➤ *Predictie van een zwakke ovariële respons*

Omdat serum AMH het aantal recruteerbare follikels reflecteert, zou AMH dus ook de ovariële respons kunnen voorspellen op gecontroleerde ovariële hyperstimulatie (COH). Tijdens COH correleert AMH positief met het aantal kleine antrale follikels en met inhibine B serum levels (78). In vrouwen met een zwakke ovariële respons zijn de AMH concentraties significant lager dan bij vrouwen met een normale respons op ART (88). Uit bepaalde studies komt naar voor dat de basale serum AMH waarde de beste individuele merker is van de ovariële respons tijdens ART te voorspellen. De AMH concentratie is gecorreleerd met de AFC voor de behandeling en het aantal aangeprikte oocyten tijdens ovariële stimulatie (76,

78, 89, 90, 91, 92). Verder heeft serum AMH op dag 3 een grotere prognostische waarde voor zwakke respons dan leeftijd, serum FSH, inhibine B en oestradiol. In een retrospectieve studie op 109 vrouwen die IVF ondergingen, was een basaal serum AMH van  $< 1,1$  ng/ml geassocieerd met IVF falen (89). Deze bevinding werd bevestigd door een grote prospectieve studie (93). Door gebruik te maken van een drempelwaarde van  $1,13$  ng/ml ( $8,1$  pmol/l), voorspelde AMH een zwakke ovariële reserve ( $\leq 4$  oocyten) met een gevoeligheid van 80% en een specificiteit van 85% (93). Uit de recente validatiestudie van AMH als screeningsmarker voor ovariële reserve van Gnoth *et al.* blijkt dat met een cut-off van  $1,26$  ng/ml 97% van de vrouwen met gereduceerde ( $\leq 4$  oocyten) ovariële reserve correct worden geïdentificeerd. Wanneer de AMH concentraties boven deze cut-off waren, voorspelde dit in 98% van de gevallen een normale respons op COH. Wanneer de AMH concentratie  $\geq 0,5$  ng/ml en  $\leq 1,26$  ng/ml is, wordt een AFC als additionele test aangeraden om vals positieve resultaten uit te sluiten en dus de specificiteit te verhogen (94). Een overzichtstabel van 12 studies geeft de performatiekarakteristieken van AMH voor predictie van zwakke ovariële respons weer (Tabel 5) (5). De meerderheid van de studies zijn prospectieve cohort studies, waarin data worden weergegeven van 1 cyclus per koppel. De definities van de zwakke respons zijn vrij uniform over de studies en worden uitgedrukt in termen van cyclusonderbreking, aantal dominante follikels bij US, aantal aangepriekte oocyten onder een bepaalde drempel (meestal  $< 4-6$  oocyten) of een combinatie van voorgaande criteria. Uit de tabel blijkt dat de sensitiviteit varieert tussen 40-91% en de specificiteit tussen de 64-100%. Naast de positieve likelihood ratio werd ook de pre-AMH test probabiliteit voor zwakke respons omgezet in een post-AMH test probabiliteit. Bij een maximum LR van 8, is de post-AMH test probabiliteit van zwakke respons bij benadering 65%, met een pre-AMH test probabiliteit van 20%. Dus de probabiliteit van een testresultaat van AMH met een LR van ongeveer 8 is hoog genoeg om AMH als een klinisch nuttige test te beschouwen voor zwakke respons predictie (5). De performatiekarakteristieken van serum AMH voor het identificeren van een zwakke ART respons is vergelijkbaar met die van AFC, wat niet verwonderlijk is gezien AMH hiervan een reflectie is. AMH en AFC hebben dezelfde klinische waarde voor de voorspelling van zwakke respons.

In de review van Broekmans *et al.* werden verschillende endocriene, stimulerende en ultrasound testen, die de ovariële reserve inschatten, systematisch geëvalueerd (6). Naast de analyse van AMH werd ook inhibine B geanalyseerd voordat COH werd gestart. Naast de potentiële oocytenopbrengst, werd ook de kans op zwangerschap nagegaan (Zie infra). Het uiteindelijke doel van deze ovarium reserve testen (FSH, oestradiol, AMH, inhibine B, ovariumvolume, AFC,...) is het identificeren van vrouwen met gedaalde ovariële reserve voor hun leeftijd. Dus in eerste instantie moet rekening worden gehouden met de leeftijd van de vrouw. In jonge vrouwen kunnen deze testen patiënten in klassen indelen naargelang hun ovariële reserve (zie infra). Bij oudere vrouwen kunnen deze testen bepaalde vrouwen identificeren, die ondanks hun leeftijd, toch nog een aanvaardbare kans hebben op zwangerschap na IVF. In de tabellen worden enkele prospectieve cohort studies (zonder exclusie van patiënten met verminderde ovariële reserve) weergegeven (Tabellen 6-9) (6). Voor de predictie van een zwakke respons is een sensitiviteit van 75% en specificiteit van 85% gewenst. De bepaling van AMH geeft maar een matig resultaat en schiet vooral op het vlak van sensitiviteit tekort. Inhibine B vertoont ook bescheiden performatiekarakteristieken. Bij een LR van 4, is de post-inhibine B test probabiliteit van een zwakke respons niet hoger dan 55%, terwijl de kans op zulk testresultaat ook al heel klein is. AMH en inhibine B kunnen niet als diagnostische test, maar wel als screeningstest worden gebruikt. Confirmatie door een andere test is dan nog noodzakelijk. Bijvoorbeeld, de andere test kan een nieuwe IVF poging zijn. Ook wordt aangegeven dat combinatie van predictieve testen of het herhalen van de initiële test de diagnostische performantie kan verbeteren (76). Zo wordt de predictie van de

ovariële respons verbeterd door combinatie van AFC/AMH, inhibine B en FSH en werden er verschillende logistische multivariabelen modellen opgesteld. (76, 90).

### **SAMENVATTING**

Basaal serum AMH, bepaald voor stimulatie (meestal cyclusdag 3) is een betere merker voor gedaalde ovariële reserve in vergelijking met de klassieke parameters zoals gestegen FSH en gedaald inhibine B. AMH correleert zeer goed met het antrale follikelaantal en het aantal gecollecteerde oocyten. Echter, zowel de bepaling van AMH als inhibine B hebben slechts matig predictieve eigenschappen om een zwakke IVF respons voorspellen. Er zijn onvoldoende argumenten om AMH en inhibine B als individuele predictors van IVF respons te hanteren. Deze merkers kunnen wel als screeningstest of in combinatie met andere ovarium reserve testen worden gebruikt om zo de algemene performantie te verbeteren.

#### ➤ *Classificatie voor ART/ICSI*

Bovenstaande testen beogen vooral het accurater inschatten van het potentiële zwangerschapssucces van de patiënten voordat men met de therapie start. Misschien nog belangrijker is het vergemakkelijken en individualiseren van een geschikte therapie voordat met de eerste ART cyclus wordt gestart. In de studie van Nelson *et al.* werden 340 niet geselecteerde patiënten, voor hun eerste 'ART cyclus' ingedeeld in vier groepen: normale responders, non-responders (geen follikels na 12 dagen stimulatie), 'poor' responders ( $\leq 2$  oocyten) en 'excessive' responders ( $\geq 21$  oocyten) op basis van de oocytenopbrengst na FSH stimulatie (92). AMH is een betere discriminator dan FSH voor de 4 groepen, echter bij de lage serum AMH waarden is er een significante overlap tussen normaal, non- en poor responders. AMH is dus geen absolute predictor voor een 'non-responder' status en daarvoor is het niet mogelijk om vrouwen uit te sluiten voor ART louter en alleen op basis van een lage AMH waarde. AMH moet in combinatie met FSH worden bekeken. In de non- en poor responder groep is FSH een betere predictor, namelijk wanneer FSH zeer hoog is, is de kans op cyclusonderbreking reëel. AMH blijkt vooral nuttig om vrouwen met een risico op excessieve respons tijdens ART te identificeren (AUC = 0,90). Voorgestelde cut-off-waarden voor serum AMH worden weergegeven in [tabel 10](#).

### **SAMENVATTING**

Serum AMH, bepaald voor de start van ART, kan behulpzaam zijn om de ovariële respons op ART in te schatten en zo de therapie (type van stimulatie protocol) te richten. Een meer geïndividualiseerd en geoptimaliseerd 'behandelingsmanagement' wordt mogelijk. AMH kan en mag zeker niet worden gebruikt om vrouwen uit te sluiten voor behandeling.

#### ➤ *Predictie van de kans op een succesvolle zwangerschap*

Uit de literatuur blijkt dat de meningen over de voorspellende kracht van serum AMH en inhibine B voor een succesvolle zwangerschap verdeeld zijn. Verschillende onderzoekers konden geen correlatie vinden tussen AMH en de predictie van een klinische zwangerschap (95, 96, 97, 98, 99). Fréour *et al.* kon ook geen duidelijk verschil aantonen tussen de zwangere en niet zwangere groep. Hij toonde echter wel aan dat alle zwangere vrouwen een serum AMH boven 1,4 ng/ml hadden, wat in overeenstemming is met hogervermelde drempelwaarden. Dus AMH heeft wel een goede negatieve predictieve waarde (98). Eldar-Geva *et al.* daarentegen rapporteerde een verhoogde zwangerschapskans bij hoge AMH waarden, wat consistent is met de correlatie tussen het aantal rijpe oocyten en uiteindelijk het aantal embryo's beschikbaar voor transfer (100). Ook de groep van Wunder *et al.* rapporteerde dat de concentraties van AMH en inhibine B zowel in serum als follikelvocht

significant hoger zijn in de groep vrouwen, die zwanger werden tijdens ART. Zowel AMH en inhibine B in serum en follikelvocht zijn positief gecorreleerd met het oocytenaantal, en een inverse correlatie bestaat er met FSH op dag 3 en de totaal toegediende gonadotrofine dosis (101). In de systematische review van Broer *et al.* werden 6 studies opgenomen die AMH als predictieve merker voor 'niet-zwangerschap' bestudeerden (5). In tabel 11 werden de performantiekarakteristieken op een rijtje gezet. De sensitiviteit varieert tussen 19-66% en de specificiteit varieert tussen 55-89%.

In de review van Broekmans *et al.* werden de studies gegroepeerd waar de kracht van inhibine B wordt nagegaan om de kans op zwangerschap te voorspellen (6). Ook 1 studie voor AMH wordt weergegeven. In deze studie wordt aangehaald dat voor predictie van 'niet-zwangerschap' een sensitiviteit van 40% en een specificiteit van 95% gewenst is. Aan de hand van deze vereisten blijkt dat AMH in deze context weinig waarde heeft als analytische test. Wanneer zeer lage cut-offs worden gekozen, is de performantie beter, maar dit zou dan weer leiden tot een gering aantal abnormale resultaten. Ook inhibine B schiet tekort. Enkel extreme cut-off waarden geven een LR van 4 à 5 met een post-test probabiliteit niet hoger dan 5%. Voor een succesvolle zwangerschap als gevolg van IVF zijn er een aantal additionele parameters van belang zoals onder andere sperma gerelateerde factoren, embryo ontwikkeling, toestand van endometrium. Vooral de leeftijd blijkt een goede predictor te zijn (102, 103). AMH is nuttig om kwantitatief de ovariële respons in te schatten, maar AMH is geen performante individuele merker voor predictie van een succesvolle zwangerschap (Tabellen 12 en 13).

#### **SAMENVATTING**

AMH en inhibine B hebben een ondermaatse performantie in het voorspellen van een succesvolle zwangerschap. Zwangerschap wordt echter door meer factoren beïnvloed dan louter het ovariële/folliculair functioneren. Dus het is logisch dat AMH/inhibine B metingen alleen de uitkomst niet kunnen voorspellen in termen van zwangerschap. Daarom wordt het bepalen van deze hormonen in deze context niet aangemoedigd.

#### ➤ *Ovarieel hyperstimulatie syndroom*

Ovarieel hyperstimulatie syndroom (OHSS) is één van de ernstigste complicaties tijdens COH. OHSS kan zelfs levensbedreigend zijn. De risicofactoren voor het ontwikkelen van OHSS zijn: een jonge leeftijd (< 35 jaar), een mager gestalte (BMI < 20 kg/m<sup>2</sup>), vrouwen met het polycysteus ovariumsyndroom (PCOS), aanwezigheid van veel (> 35) kleine en intermediaire follikels en een zeer hoge concentratie van serum oestradiol (> 4000 pg/ml) op de dag van HCG toediening (104). Momenteel wordt vooral gebruik gemaakt van de leeftijd, BMI en monitoring van oestradiol voor de predictie van OHSS. Nauwkeurige predictie van OHSS is echter moeilijk. Een recente kleine (N=16) retrospectieve studie rapporteerde dat OHSS geassocieerd is met hoge serum AMH spiegels voor COH. In patiënten met OHSS was het serum AMH voor de behandeling zesmaal hoger dan in normale controles (105). In lijn hiermee werd door Nelson *et al.* aangetoond dat een AMH waarde hoger dan 15 ng/ml een excessieve respons op ART kan voorspellen én zo dus patiënten, die een risico lopen op OHSS te identificeren (zie supra) (92). Ook in de studie van La Marca *et al.* werden vooral cyclussen onderbroken bij patiënten met zeer lage respons of bij diegenen met een hoge AMH waarde (> 7 ng/ml), omdat zij een risico op OHSS ontwikkelden (106). In een recente grotere (N= 262) prospectieve studie werden bovenstaande bevindingen bevestigd. Serum AMH voorspelt OHSS beter dan BMI en leeftijd met een sensitiviteit van 90,5% en specificiteit van 81,3%. Door logistische regressie analyse werd tevens aangetoond dat serum AMH en serum oestradiol op de dag van HCG toediening significante predictors zijn van OHSS met odds ratio's van 1,7856 en 1,0005 respectievelijk. Door gebruik te maken van logistische regressie

van meerdere parameters kan de specificiteit stijgen t.o.v. AMH bepaling alleen (93,5% in tegenstelling tot 81,3%). Een combinatie van oestradiol en AMH wordt aangeraden om OHSS te voorspellen om zo het aantal vals positieve resultaten proberen te verminderen (107).

### ***SAMENVATTING***

OHSS zou kunnen worden voorkomen door een serum AMH bepaling uit te voeren, voordat er gestart wordt met gonadotrofine toediening of een bepaling uit te voeren tijdens de therapie. In patiënten met een hoge basale AMH spiegel kan bij voorkeur een milder stimulatie protocol (lagere dosissen gonadotrofines) worden gehanteerd. Een toegenomen vigilantie voor tekens van OHSS is bij hoge AMH waarde aangewezen.

### ***ALGEMENE CONCLUSIE***

**Serum AMH, serum FSH en leeftijd van de vrouwen dienen altijd samen te worden geïnterpreteerd in het kader van ART. AMH is een goede merker voor de kwantitatieve aspecten van de ovariële reserve en om de respons op ART in te schatten, maar is geen goede predictor voor succesvolle zwangerschap. AMH bepaling kan gehanteerd worden om de hormoontherapie voor ART aan te passen en de patiënten te informeren over de mogelijke zwakke respons op ART of te wijzen op een toegenomen risico op OHSS.**

## **2.2.2. Polycysteus ovariumsyndroom**

### **➤ *Inleiding***

Polycysteus ovariumsyndroom (PCOS) is één van de meest voorkomende endocriene afwijkingen bij vrouwen in hun vruchtbare periode. Deze aandoening wordt gekarakteriseerd door anovulatie (oligo- of amenorree), gestegen circulerende androgenen (en bijhorende klinische symptomen zoals hirsutisme, acne,...) en op echografisch onderzoek worden polycystische ovaria waargenomen. De US-criteria worden als de meest specifieke parameters voor PCOS beschouwd, namelijk een gestegen ovariumvolume (> 10 ml) en/of de aanwezigheid van 12 of meer follikels (2-9 mm groot) in elk ovarium. Wanneer minstens aan twee van deze hogervernoemde voorwaarden is voldaan, kan de diagnose van PCOS worden gesteld, zoals gedefinieerd door de Rotterdam Consensus (1). Een groot deel van de vrouwen met dit syndroom zijn obees ( $\pm$  40%) en vertonen insulineresistentie en compensatoire hyperinsulinemie. Echter niet bij alle gevallen zijn deze kenmerken even opvallend. De diagnose van PCOS wordt gesteld na het uitsluiten van andere aandoeningen met endocriene verstoringen én op basis van de Rotterdam definitie.

### **➤ *AMH en PCOS***

Door een defect selectiemechanisme ontstaat er een accumulatie van de kleine antrale follikels. De twee- tot drievoudige toename in het aantal groeiende follikels wordt gereflecteerd in een twee- tot drievoudige stijging van serum AMH. Dus zoals bij vrouwen met normale cyclus blijkt bij vrouwen met PCOS het serum AMH ook gecorreleerd met het aantal antrale follikels (2-5 mm groot) (13, 97, 108, 109). Wanneer bij anovulatoire vrouwen het serum AMH wordt gemeten, blijkt de AMH concentratie significant hoger te zijn in de PCO groep dan de niet-PCO groep. (Figuur 10).

Bij vrouwen met regelmatige cyclus neemt AMH af met de leeftijd, deze daling wordt ook gezien bij vrouwen met PCOS. De daling bij vrouwen met PCOS is echter veel minder duidelijk zodat de AMH concentraties langer hoog blijven, met hypothetisch een vertraagde primordiale follikelrecruterende en dus een uitgestelde menopauze tot gevolg (97, 110).

### **➤ *Rol van AMH in de pathogenese van PCOS***



De rol van AMH in de pathogenese van dit syndroom is nog wat onduidelijk. De hypothese is momenteel dat AMH een gedaalde gevoeligheid van de follikels voor FSH veroorzaakt, zodat een stagnatie optreedt van het proces van selectie van de dominante follikel, wat de anovulatie verklaart. De FSH-geïnduceerde expressie van het enzyme aromatase wordt ook geremd met een stijging van de androgenen en een daling van de oestrogenen tot gevolg (108). Dit zou ook aanleiding geven tot een geringe negatieve terugkoppeling van de hypofysaire afgifte van LH, dat op zijn beurt de androgeenproductie in de theca-cellen stimuleert.

AMH spiegels zijn ook verhoogd in het folliculair vocht bij vrouwen met PCOS, wat suggereert dat de stijging in serum AMH te wijten is aan zowel de toename van het aantal groeiende follikels als aan de gestegen AMH productie per follikel (111).

➤ *Correlaties tussen AMH-follikelaantal en androgenen, LH en menstruele status*

Naast de positieve correlatie tussen AMH en het follikelaantal (en ovarieel volume) wordt in vele studies een positieve correlatie tussen de concentratie van AMH, de androgenen concentratie (testosteron, androsteendion, vrije androgeen index) en LH gevonden (97, 109, 112, 114). De AMH spiegels bij vrouwen met PCOS met hyperandrogenisme zijn significant hoger dan vrouwen met het syndroom zonder excessief gestegen androgenen. Dus hyperandrogenisme is geassocieerd met een additionele toename van AMH (112, 113). Ook blijkt AMH zwak positief gecorreleerd met de cyclusduur (97). In de meeste grote studies werden geen verschillen gezien in inhibine A en B concentraties bij vrouwen met of zonder PCOS. Echter, Chu *et al.* vond wel significant hogere inhibine concentraties bij patiënten met PCOS en de inhibine en AMH concentraties waren zwak gecorreleerd ( $r = 0,351$ ) (114).

De AMH concentratie en het aantal follikels per ovarium (FNPO) zijn significant gecorreleerd met de menstruele status van de PCO patiënten. Patiënten met amenorree hebben de hoogste AMH waarde en FNPO en patiënten met een normale cyclus de laagste AMH waarde (113, 115).

➤ *Diagnostische performantie*

Omdat US onderzoek voor het bepalen van het FNPO niet altijd gemakkelijk is en niet door elke onderzoeker even betrouwbaar wordt uitgevoerd, wordt gesuggereerd dat AMH als surrogaatparameter voor de AFC kan worden gebruikt in de consensusdefinitie van Rotterdam om de diagnosestelling te vergemakkelijken.

Slechts 2 studies gingen de diagnostische performantie van AMH na (113, 114). In de studie van Pigny *et al.* werd a.d.h.v. ROC curven de performantie nagegaan en een AUC van serum AMH van 0,851 werd gevonden. Met een cut-off van 8,4 ng/ml (60 pmol/L) werd een goede specificiteit (92%) bekomen maar zwakke sensitiviteit (67%). Dus 1 op 3 patiënten met PCOS zou verkeerd worden gediagnosticeerd, wanneer enkel AMH als criterium wordt gebruikt. Chu *et al.* vond slechts een sensitiviteit van 20% voor AMH en 13% voor inhibine B.

De AFC via US onderzoek is de beste methode om tot een correcte diagnose te komen. Een ROC curve met AUC van 0,937 werd bekomen. Bij een cut-off waarde van 12 FNPO, zoals opgenomen in de Rotterdam consensus, werd een gevoeligheid van 75% en specificiteit van 99% gevonden (Tabel 13) (118).

Echter de patiëntengroepen, geselecteerd o.b.v. andere inclusiecriteria, zijn verschillend tussen de verschillende studies waardoor een correcte vergelijking van de performatiekenmerken moeilijk wordt. Uit bovenstaande studies blijkt dat AMH gevoeligheid mist om te kunnen worden gebruikt als individuele merker voor PCOS. Echter, AMH kan wel worden gebruikt als surrogaat voor FNPO in medische centra waar US niet voorhanden of onbetrouwbaar is. AMH en FNPO zijn sowieso niet voldoende om de diagnose te stellen én moeten geïncorporeerd worden in de Rotterdam definitie. Voor diagnosestelling

van PCOS blijft het klinisch onderzoek essentieel voor uitsluiting van andere endocriene aandoeningen.

➤ *Therapie*

PCOS patiënten met een zwangerschapswens kunnen worden behandeld met insuline sensitiserende medicatie, wat de kans op regelmatige cycli, ovulatie en conceptie sterk verhoogt. Vooral metformine wordt bij deze vrouwen als insulineverlagend product gebruikt. Metformine beïnvloedt indirect ook de androgeenproductie en het menstrueel patroon. Wanneer deze vrouwen worden behandeld met metformine blijkt het serum AMH net zoals de AFC en ovariële volume licht, maar significant te dalen. De AMH spiegels blijven in vergelijking met de controlepopulatie sterk verhoogd (116). Dit suggereert dat AMH meting kan worden gebruikt om de efficaciteit van de behandeling te beoordelen. Voor het gebruik bij therapieopvolging zijn grotere aanvullende studies nodig om dit te confirmeren. Ook clomifeencitraat kan worden gebruikt om ovulaties te induceren, maar is echter minder geschikt omwille van het verhoogd risico op OHSS. Ten slotte kunnen ook exogene gonadotrofines worden toegediend. AMH spiegels dalen na COH met FSH (117). Wanneer bij deze patiënten AMH wordt gemeten blijkt dat bij hyperandrogenisme de AMH waarden nog sterk verhoogd blijven (112). Serum AMH is ook niet significant gecorreleerd met de uitkomstparameters (FSH responsdosis, stimulatieuur, aantal ampullen exogeen FSH) van de ovulatie inductie. Ook zwangerschapskans en miskraamaantallen zijn vergelijkbaar in patiënten met matig tot hoog gestegen AMH (97).

### **CONCLUSIE**

Vermits serum AMH significant hoger is bij PCO-patiënten en gecorreleerd is met klinische, endocriene en US parameters, die indicatief zijn voor een ovariële disfunctie, kan AMH bijdragen tot de diagnose van PCOS en gebruikt worden om de ernst van ovariële disfunctie in te schatten. Echter als individuele merker mist AMH sensitiviteit voor het stellen van de diagnose. Wanneer nauwkeurig US onderzoek niet mogelijk is, kan AMH gebruikt worden als surrogaat voor FNPO. Het verschil in AMH concentratie in subgroepen (hyperandrogenisme, menstrueel patroon) van PCOS vrouwen suggereert dat AMH bepaling een subclassificatie van de patiënten met dit heterogene syndroom kan toelaten.

Bepaling van inhibine heeft geen plaats bij de diagnose van PCOS.

### **2.2.3. Granulosaceltumoren/epitheliale ovariumtumoren**

➤ *Inleiding*

Ovariumkanker is de meest dodelijke gynaecologische maligniteit en de 5<sup>de</sup> meest voorkomende oorzaak van kankermortaliteit (119). De meeste ovariumtumoren (90%) zijn van epitheliale oorsprong. De overige 10% wordt vertegenwoordigd door 'sex-cord' stromale (2-5%) en kiemcel- ('germ cell') tumoren. De meerderheid van de 'sex-cord' stromale tumoren zijn granulosaceltumoren (GCT). Dit type tumor wordt histologisch onderverdeeld in 2 subtypes, de meest voorkomende volwassen GCT en de juveniele GCT. De geschatte incidentie van GCT varieert tussen 0,4 - 1,7 per 100 000 (120, 121, 122).

Veel vrouwen met GCT zijn asymptomatisch op het moment van diagnose. Vooral de aanwezigheid van een grote adnexale massa is suggestief. Beeldvorming heeft een hoge negatieve predictieve waarde en is niet invasief (123). Voor definitieve bepaling van de maligniteit van een tumor is chirurgie en bijgevolg histologisch onderzoek vereist. Histopathologisch onderzoek is momenteel de gouden standaard voor diagnosestelling. Op basis van dit anatoompathologisch onderzoek wordt 'staging' van de tumor (FIGO classificatie) en keuze van behandeling bepaald. Deze tumoren secreteren naast steroiden

(oestrogenen) soms ook proteïnen, zoals inhibine, AMH en anderen. De histologische diagnose wordt momenteel vergemakkelijkt door immunohistochemische kleuring gebruikmakend van antistoffen tegen deze merkerproteïnen van GCT.

In tegenstelling tot andere gynaecologische kankers is er weinig verbetering geweest over de laatste decades met betrekking tot de levensverwachting van vrouwen met ovariumkanker. Omwille van de vage symptomen wordt de meerderheid van de vrouwen met ovariumca (60-65%) pas gediagnosticeerd in een laat stadium, wanneer verspreiding buiten de ovaria reeds is opgetreden. Hun 5 jaarsoverleving is slechts 20-40%. Wanneer de kanker echter tijdig wordt gedetecteerd dan bedraagt de levensverwachting > 85% (119). De prognose wordt dus vooral bepaald door het ziektestadium en door de aanwezigheid van residuele ziekte na chirurgie. Histologische karakteristieken hebben eveneens prognostische waarde. Typisch groeien deze tumoren traag en hervall is meestal laat, gemiddeld 4-6 jaar na initiële diagnose (120). Sommige case reports rapporteren zelfs hervall na 30-40 jaar (124, 125). Bij benadering zal 50% van de patiënten hervallen en 80% van deze patiënten zal uiteindelijk ook sterven van hun ziekte (126). De therapie bestaat in hoofdzaak uit chirurgie. Soms wordt ook chemo- en/of radiotherapie als adjuvante therapie gebruikt. Daling van mortaliteit door adjuvante chemo- en/of radiotherapie is echter nog niet aangetoond (127).

De vage klinische symptomen en het arbeidsintensieve histopathologisch onderzoek, met de nodige kleuringen, doen de nood aan serum tumor merkers groeien. Inhibine en AMH komen hiervoor in aanmerking.

### **SAMENVATTING**

Granulosaceltumoren (GCT) worden gekarakteriseerd door trage groei, lokale verspreiding en late relapse. Het gebrek aan diagnostische tools om vroegtijdige diagnose mogelijk te maken en de slechte prognose die hiermee gepaard gaat, benadrukken de nood aan tumormerkers die ovariumca in een vroeg stadium kunnen detecteren. Echter beeldvorming blijft belangrijk. Het invasief histopathologisch onderzoek is momenteel de gouden standaard. Het frequent terugkomen van GCT na een lange ziektevrije periode, benadrukt eveneens de nood aan een follow-up gedurende voldoende lange tijd. De eerstelijnsbehandeling van GCT bestaat uit chirurgie. Het nut van adjuvante chemo-en/of radiotherapie is nog onduidelijk.

### **A. INHIBINE**

Lappohn *et al.* vond in 1989 als eerste verhoogde inhibine spiegels in serum van 6/6 patiënten met GCT en suggereerde dat inhibine een waardevolle en specifieke merker is voor deze tumoren (128). Vervolgens rapporteerde Healy *et al.* dat in postmenopauzale vrouwen, waar de serum inhibine spiegel normaal zeer laag of ondetecteerbaar is, dat de spiegels verhoogd zijn bij vrouwen met GCT of mucineuze epitheliale tumoren (129). Deze 2 observaties waren de aanleiding tot een reeks studies die het nut van inhibine onderzochten.

#### ➤ *Doelgroep – analytisch aspect*

In de meeste studies (5/7) worden de vrouwen met een ovariële ca als postmenopauzaal beschouwd o.b.v. menopauzale symptomen, leeftijd, FSH waarde of postoperatief na bilaterale salpingo-oophorectomie (131, 132, 133, 134, 136). Dit enerzijds omdat deze tumoren frequenter voorkomen bij oudere postmenopauzale vrouwen en anderzijds omdat serum inhibine fluctueert tijdens de menstruele cyclus, wat het gebruik van inhibine in preoperatieve setting zou compliceren (133, 134). Het gebruik van inhibine bij vrouwen tijdens hun vruchtbare periode wordt echter slechts een beetje bemoeilijkt door deze fluctuaties. Het serum inhibine bij vrouwen met een GCT is meestal drastisch gestegen

waardoor dit theoretisch probleem in de praktijk meevalt. In de overige twee studies worden zowel pre- als postmenopauzale vrouwen als studiepopulatie gebruikt (130, 135).

Met uitzondering van de studie van Jobling *et al.* zijn alle studies, waarin inhibine wordt geëvalueerd als tumormerker, retrospectieve, single-centrische studies. De oudste studies maken gebruik van een radioimmunoassay (RIA) terwijl in de andere studies een specifiekere enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wordt uitgetest als diagnostische test voor GCT. Met RIA worden alle moleculaire vormen van inhibine gedetecteerd, met de ELISA's daarentegen worden enkel de specifieke dimerische vormen (Inhibine A of B) gedetecteerd (Zie 3. ANALYTISCH ASPECT). In de studie van Robertson *et al.* wordt een immunofluorometrisch assay (IFMA) vergeleken met het RIA assay en in nog een andere studie van deze auteur wordt deze RIA test met meerdere ELISA testen vergeleken (133, 134). De diagnose en het ziektestadium (FIGO) van ovariumca wordt in elke studie bevestigd door histopathologisch onderzoek.

➤ *De verschillende vormen van inhibine*

Bij GCT blijkt het serum inhibine negatief gecorreleerd te zijn met het serum FSH. Dit toont aan dat het inhibine, geproduceerd door deze tumor biologisch actief is (15, 129, 133). Inhibine producerende GCT blijken de verschillende vormen niet in gelijke hoeveelheden te secreteren. Inhibine B blijkt de dominante vorm te zijn, die door de granulosa-cellen bij GCT tot expressie wordt gebracht. Bij alle GCT komen gestegen inhibine B waarden voor en in de meerderheid van de gevallen ook gestegen inhibine A spiegels (133). Echter, inhibine B stijgt veel hoger dan inhibine A serumconcentratie bij actieve GCT. Zo wordt een 60-voudige verhoging van inhibine B waargenomen t.o.v. gemiddelde controlewaarden en slechts een 7-voudige verhoging van inhibine A. Inhibine B blijkt ook beter gecorreleerd te zijn met de ziektestatus (131, 133, 135). Bij progressieve GCT kon er geen correlatie tussen inhibine A en inhibine B aangetoond worden (131).

Niet enkel GCT kunnen een stijging van inhibine veroorzaken. Epitheliale ovariële tumoren (EOT) kunnen ook inhibine produceren. Tevens kan er een stijging optreden tijdens de zwangerschap en menstruele cyclus. Het serum inhibine, door EOT gesecreteerd, blijkt niet gecorreleerd te zijn met het serum FSH (in tegenstelling tot GCT). Dit suggereert dat bij deze tumoren het inhibine een gedaalde biologische activiteit heeft. Er wordt verondersteld dat deze tumoren vooral inhibine peptiden gerelateerd aan de  $\alpha$ -subunit secreteren (129, 133). Robertson *et al.* vergeleek de verschillende technieken in postmenopauzale vrouwen met GCT of een ovariumca van het sereuze, mucineuze of gemengde type (133). Het sereuze type komt over het algemeen het meest frequent voor. Volgens deze studie discrimineren meer specifieke assays voor inhibine A en B niet goed tussen normale stalen en serumstalen van vrouwen met ovariumca in vergelijking met Pro- $\alpha$ C (vrije  $\alpha$ -subunit) assays. Dit bevestigt dat de niet-dimerische  $\alpha$ -subunit de dominante inhibine vorm is bij EOT. Het totale inhibine assay, die zowel dimerische als monomerische vormen detecteert, maakt een betere differentiatie mogelijk tussen normaal en maligne. Echter bij de 11 patiënten met een GCT is inhibine B wel geschikt en verhoogd in deze 11 patiënten. Totaal inhibine blijkt vooral voor EOT van het mucineuze en sereuze type een mogelijke potentiële merker te zijn (129, 136, 137).

➤ *Diagnostische performantie*

Inhibine als individuele merker

Inhibine is een relatief specifieke merker voor ovariumtumoren (GCT én EOT). Totaal inhibine bepaald met een RIA assay heeft een relatief lage analytische sensitiviteit. RIA faalt om in de meerderheid van de gezonde postmenopauzale vrouwen, die in de meeste studies als controle worden beschouwd, inhibine te detecteren. Dit suggereert de nood aan meer

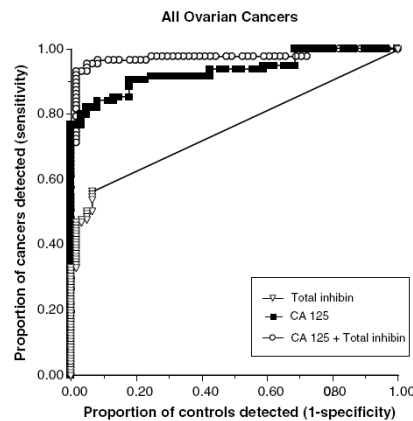
gevoeligere assays om een betere discriminatie respons te verkrijgen. IFMA is gevoeliger en detecteert de inhibine concentratie in 84% van dezelfde gezonde controle groep. Hiermee gepaard gaand heeft  $\alpha$ C IFMA een vergelijkbare of verbeterde detectie van mucineuze (90% versus 71%) en GCT (100% versus 100%) vergeleken met RIA (134).

In verschillende studies werden de performantiekenmerken van de specifieke ELISA testen voor inhibine B en inhibine A onder de loep genomen (131, 133, 135). De gevoeligheid van inhibine B voor GCT schommelt naargelang de studie en varieert tussen 89% en 100%. Voor Inhibine A daarentegen wordt een sensitiviteit tussen de 67% en 77% gevonden. Voor vroege detectie van EOT wordt totaal inhibine bepaald. De gevoeligheid varieert per subtype van ovariumca. (133). In de studie van Tsigkou wordt voor totaal inhibine een gevoeligheid en specificiteit gerapporteerd van 84 % en 95%, respectievelijk voor detectie van alle EOT (136). Het risico op vals negatieve resultaten is reëel ten gevolge van de relatief lage gevoeligheid van inhibine in bepaalde studies. Een normale waarde voor inhibine kan dus een GCT niet met zekerheid uitsluiten (Tabel 15).

Als diagnostische test voor de verschillende ovariumca (EOT én GCT) blijkt de RIA en  $\alpha$ C IFMA het meest geschikt. Deze testen worden echter in de praktijk in moderne routinelabo's niet gebruikt. RIA is arbeidsintensief en duurt 5 dagen voordat men de resultaten verkrijgt.  $\alpha$ C IFMA is ook geen optie voor een wijdverspreid diagnostisch gebruik omdat het moeilijk blijkt te zijn om de assay betrouwbaarheid te behouden tussen verschillende loten van antisera (17).

#### Combinatie van inhibine en CA-125

CA-125 detecteert de meerderheid van EOT, vooral van het sereuze type. Bij 92% (specificiteit 95%) van de patiënten met een sereuze EOT, opgenomen in een studie van Robertson *et al.* werd een verhoogde CA-125 waarde gevonden (134). Deze merker heeft ook enkele tekortkomingen. Enerzijds wordt de specificiteit en de mogelijkheid om ovariumca in een vroeg stadium te detecteren met deze merker wordt in vraag gesteld, vermits CA-125 soms ook stijgt bij goedaardige gezwellen. Anderzijds is deze merker minder effectief voor het detecteren van GCT en mucineuze tumoren (129). In deze context is het belangrijk om te vermelden dat naast bloedanalyse echografie een belangrijke 'tool' is bij de diagnose van benigne en maligne eierstoktumoren (138). Inhibine is reeds in een vroeg stadium van het cancerous proces gestegen. Het 'Monash' assay toonde gestegen inhibine concentraties bij ongeveer 80% van de patiënten met een mucineus carcinoom (129). Zoals reeds eerder vermeld, produceren EOT vooral de vrije  $\alpha$ -subunit. Zo wordt voor de detectie van mucineuze tumoren met de specifieke dimerische assays (tegen inhibine A of B) een lagere sensitiviteit bekomen. Robertson *et al.* rapporteerde een gevoeligheid van 60% en 20% voor inhibine B en inhibine A, respectievelijk (133). Bovenstaande bevindingen suggereren de mogelijke complementariteit van inhibine en CA-125. Combinatie van deze twee merkers zou de meerderheid van de ovariumca's kunnen diagnosticeren. Robertson *et al.* rapporteert dat 90% van alle ovariumca's (GCT en EOT) kunnen worden gedetecteerd met 95% specificiteit wanneer beide parameters worden bepaald (134). Dit in tegenstelling met individuele bepaling van CA-125 of totaal inhibine met respectievelijk een gevoeligheid van 80% en 50% bij een specificiteit van 95% (Figuur 11). Tsigkou *et al.* vindt een sensitiviteit van 99% bij 95% specificiteit voor combinatie van deze twee tumormerkers voor detectie van verschillende EOT. Voor CA-125 en totaal inhibine werd in deze studie respectievelijk een gevoeligheid van 87% en van 84% bekomen (136).



**Figuur 11:** ROC curve van CA125, totaal inhibine en een combinatie van CA125 en totaal inhibine voor alle ovarium kankers (16).

#### ➤ *Follow-up*

De inhibine serumtest is zeker ook waardevol bij follow-up na operatie voor GCT. Na een operatie wordt normaalgezien een significante afname van de inhibine concentratie gevonden. Patiënten in klinische remissie hebben normaal zeer lage tot ondetecteerbare inhibine waarden. (130, 131). Wanneer de referentiewaarden voor inhibine toch overschreden blijven is dit suggestief voor een occulte (resterende) ziekte. Bij (progressief) stijgende inhibine waarden is relapse van de kanker waarschijnlijk. Specifieke case studies hebben aangetoond dat herhal van de ziekte veel vroeger kan gedetecteerd worden dan klinisch duidelijk (130). Gestegen inhibine spiegels bij patiënten in klinische remissie na operatie voorspellen herhal/relaps met gemiddeld 11 maanden (132, 135). In andere studies wordt zelfs een 'lead-time' van ongeveer 2 jaar vermeld (128, 130). Dus inhibine is een nuttige parameter om ziektevrije intervallen te monitoren. Boggess *et al.* kon in een aantal patiënten, met teruggekeerde ziekte, aantonen dat inhibine concentraties correleerden met de tumorgrootte (132). Ook kan aan de hand van inhibine bepaling de respons op adjuvante chemotherapie worden gevolgd (127, 132). Vermits laattijdig herhal niet uitzonderlijk is, wordt follow-up met serum inhibine B gedurende voldoende lange tijd aanbevolen (124, 127, 135).

Vroege detectie van een relapse/herhal heeft therapeutische consequenties. Door snel in te grijpen is er nog een mogelijkheid tot behandeling d.m.v. chirurgische resectie, mogelijks gevolgd door chemo- of radiotherapie. Bovendien laat vroege detectie minder uitgebreide chirurgische 'debulking' toe met een gedaalde morbiditeit tot gevolg (127, 135).

#### **SAMENVATTING**

**Diagnostisch:** Serum inhibine is een performante merker voor GCT. Detectie in vroeg stadium van de ziekte is mogelijk. Inhibine B blijkt de predominante vorm te zijn, die door deze tumoren wordt gesecreteerd. Inhibine B heeft daarenboven een hogere sensitiviteit voor detectie van GCT én reflecteert ook beter de ziektestatus van de patiënt dan inhibine A. Voor EOT is CA-125 nog steeds de serummarker bij uitstek. Echter voor de meerderheid van de ovariumtumoren te diagnosticeren kan de combinatie van CA-125 en totaal inhibine nuttig zijn.

**Follow-up:** Het gebruik van inhibine als tumormarker voor surveillance van patiënten met GCT is nuttig voor vroege detectie van relapse en kan zo het aantal noodzakelijke uitgebreide chirurgische ingrepen verminderen. Tevens kan de respons op therapie worden beoordeeld a.d.h.v. deze serumparameter. Dus naast regelmatige gynaecologische onderzoeken en echografie (CT) heeft inhibine een plaats tijdens de follow-up van de patiënten met een GCT.

## B. AMH

Naast inhibine wordt AMH in enkele studies naar voor geschoven als performante merker voor GCT (131, 139, 140, 141, 142). De eerste beschrijving van verhoogd serum AMH bij patiënten met GCT dateert van 1992 (139). Gustafson *et al.* toonde een abnormaliteit in de AMH secretie aan in relatie tot de ovariummaligniteit. Zo werden bij de vier patiënten met GCT verhoogde serumwaarden gevonden. Zes vrouwen, die een tumorresectie van GCT 2-45 maanden eerder ondergingen, waren ziektevrij en hadden een normale AMH spiegel. AMH was ondetecteerbaar in vrouwen met EOT.

### ➤ *Doelgroep – analytisch aspect*

In de studie van Rey *et al.* worden patiënten met een adult GCT (AGCT) onderzocht. Alle vrouwen waren postmenopauzaal of ondergingen een bilaterale ovariectomie. Ook werden vrouwen met andere kwaad- en goedaardige tumoren of cysten opgenomen in de studie om de specificiteit van AMH als serummarker te bepalen (140). Zowel pre- als postoperatieve stalen werden geanalyseerd. AMH werd ook bepaald in het serum van patiënten met een progressief AGCT in het onderzoek van Petraglia *et al.* (131). Lane *et al.* bestudeerde daarentegen zowel pre- als postmenopauzele vrouwen met voorkomen van JGCT en AGCT (141). Indien mogelijk werden data met betrekking tot de follow-up gerapporteerd in beide studies.

AMH wordt in alle studies gedetecteerd gebruikmakend van een ELISA. In de studies van de jaren '90 werden de ELISA reacties nog volgens een traditionele manier ('in house' protocols) uitgevoerd. Deze methoden zijn zeer arbeidsintensief en complex (131, 140, 141). In 2000 werd een vergelijkende studie uitgevoerd tussen de traditionele methode en een nieuwe ultrasensitieve ELISA, AMH/MIS ELISA kit (Immunotech-Coulter, Marseilles, France) (142). De AMH resultaten van 31 patiënten met een GCT (follow-up gedurende 7 jaar) werden geanalyseerd met beide methoden en nadien vergeleken. De AMH/MIS kit heeft een significant hogere sensitiviteit. Het recente ultrasensitieve assay is in staat om AMH waarden tot 0,1 ng/ml te meten (i.t.t. traditionele assay 0,2 ng/ml). De assay-vergelijking toonde een discrepantie in serum AMH bij 6/31 patiënten. Echter de klinische winst/bijdrage van het ultrasensitieve assay omvatte één patiënt met herval en twee patiënten waarbij de behandeling niet volledig succesvol was. Deze 3 patiënten hadden een ondetecteerbaar AMH met het traditionele assay, terwijl het ultrasensitieve assay deze patiënten wel alarmeerde door gestegen serum AMH. Dit assay is nuttig om vroeg, preklinisch herval te voorspellen en op een precieze manier de resultaten van behandeling te evalueren (142).

### ➤ *Diagnostische performantie*

Een verhoogde AMH waarde is zeer specifiek voor GCT. Bij andere ovariële tumoren, goedaardige ovariële cyste of extra-ovariële kanker was de serum AMH waarde in de normale range (controlegroep) (139, 140). Enkel een sertoli-cel tumor geeft verhoogde AMH waarden. Dit is evident, vermits deze cellen net zoals de granulosa-cellen AMH aanmaken en secreteren. Rey *et al.* toonde gestegen waarden aan in 8 van de 9 patiënten (89%) met progressieve GCT (140). In de andere studies, was de globale gevoeligheid voor AMH 76% (141) en 91% (11/12) bij patiënten met progressieve ziekte (131). Vals negatieve waarden komen alsnog voor. De verhogingen van serum AMH bij initiële diagnose en herval correleren niet met het ziektestadium (141). Tevens bestaat er geen correlatie tussen inhibine en AMH bij patiënten met progressieve GCT (131) (Tabel 16).

### ➤ *Follow-up*

Post-operatieve serum AMH waarden kunnen ook worden gebruikt om de volledigheid van de tumorverwijdering te evalueren en herval te voorspellen. Bij succesvolle behandeling moeten

de AMH waarden ondetecteerbaar zijn binnen enkele dagen. De halfwaardetijd van AMH bedraagt 48 h (143). Verhoogde waarden van AMH zijn suggestief voor residuele ziekte. In de studie van Lane *et al.* werden 56 vrouwen gevolgd na tumorverwijdering. 15/56 toonden verhoogde AMH waarden. In 9 gevallen ging het om een klinisch detecteerbare tumor en in de overige 6 gevallen om een niet volledig verwijderde tumor of herval (141). In de studie van Rey *et al.* waren de AMH waarden in 91% (10/11) van de gevallen in klinische remissie normaal. Daarnaast toonde AMH in hun longitudinale studie van 11 patiënten met recurrenente GCT een goede correlatie met de evolutie van de ziekte in 9 cases tijdens de follow-up (140). In de studie van Long *et al.* werden de AMH waarden bepaald tijdens de follow-up van patiënten die een bilaterale ovariëctomie ondergingen als gevolg van een GCT. Tijdens de follow-up van 24 patiënten met GCT in klinische remissie (na bilaterale ovariëctomie) waren de AMH waarden ondetecteerbaar in 96% (23/24). 15 patiënten hadden een recurrenente GCT en in 14 gevallen werd een stijging van AMH gedetecteerd. De sensitiviteit, specificiteit, PPV en NPV waren 93, 96, 93 en 96%, respectievelijk (Tabel 16) (142).

### **SAMENVATTING**

**Diagnostisch:** AMH is een specifiekere serummarker voor GCT dan inhibine. AMH is enkel gestegen in 'sex-cord' stromale tumoren, terwijl inhibine ook gestegen kan zijn in bepaalde epitheliale ovariumtumoren. Als detectietechniek moet gekozen worden voor het ultrasensitieve AMH/MIS assay. Hoge serum AMH spiegels worden teruggevonden bij 76-93% van de patiënten met GCT.

**Follow-up:** De AMH concentratie stijgt significant vroeger voordat enige klinische evidentie van relapse kan worden waargenomen. Seriële AMH bepalingen na een operatie zijn dus bruikbaar voor het opsporen van residuele ziekte en vroeg vaststellen van herval. Samen met beeldvorming en klinisch onderzoek kan een herval vroegtijdig worden vastgesteld met de mogelijkheid tot snelle interventie.

### **ALGEMENE CONCLUSIE**

**Kortom, de betrouwbaarheid van AMH en inhibine als tumormarker blijkt vergelijkbaar te zijn. Beide hormonen zijn nuttig voor de diagnose en de follow-up van granulosa-cel tumoren. Voor epitheliale tumoren is CA-125 nog steeds de serummarker bij uitstek. Een combinatie van CA-125 en totaal inhibine wordt aanbevolen om de meerderheid (90-95%) van de ovariumtumoren te diagnosticeren.**



### 3. HET ANALYTISCH ASPECT: welke technieken/kits zijn er beschikbaar?

#### 3.1. Inhibine

##### 3.1.1. Preanalytische beschouwingen

In [figuur 3](#) wordt de variatie van serum inhibine B t.o.v. leeftijd bij de man weergegeven. Zoals eerder ook aangehaald vertoont inhibine B in de man een diurnaal ritme. Er wordt best voor een gestandaardiseerde tijd voor bloedverzameling gekozen.

De variatie van inhibine B tijdens de menstruele cyclus wordt in [figuur 4](#) getoond. Wanneer inhibine B wordt gehanteerd voor de beoordeling van de ovariële reserve, wordt inhibine B doorgaans op dag 3-5 gemeten.

De referentiewaarden, die momenteel in UZ Leuven worden gebruikt, werden bepaald in de VUB, Jette en worden weergegeven in [tabel 17](#). In [tabel 18](#) worden gegevens zoals staaltipe, staalvolume en stabiliteit van de stalen weergegeven.

##### 3.1.2. Analytische beschouwingen

In 1987 werd het eerste immunoassay voor inhibine ontwikkeld. Dit is gekend als het 'Monash assay', een klassiek radioimmunoassay. De antistoffen waren gericht tegen epitopen van de  $\alpha$ -subunit en kan dus geen onderscheid maken tussen inhibine A, inhibine B, precursor vormen en vrij circulerend  $\alpha$ -subunit. Groome *et al.* ontwikkelde een tweezijdige ELISA techniek voor circulerend inhibine te meten (144). Later ontwikkelde deze studiegroep een ELISA methode voor het detecteren van het Pro- $\alpha$ C fragment van de inhibine alfa subunit (145). Dit assay detecteert het vrije  $\alpha$ C of  $\alpha$ N $\alpha$ C subunit niet.  $\alpha$ C IFMA evenaart de uitgebreide 'specificiteit' van het RIA assay en is in staat om de dimerische inhibine vormen ( $\alpha$ C regio van de  $\alpha$ -subunit) alsook de vrije  $\alpha$ -subunit te detecteren (134). Nieuwere assays die specifiek inhibine A en B dimeren detecteren werden recenter ontwikkeld. Deze laatstgenoemde assays detecteren enkel de dimerische vormen A en B.

Inhibine kan in menselijk serum circuleren onder een hoog moleculaire vorm, waarschijnlijk gecomplexeerd door  $\alpha$ 2-macroglobuline. Onder de reactiecondities van deze inhibine A en B ELISA interfereert  $\alpha$ 2- macroglobuline niet met het immunoassay (12).

Momenteel zijn er twee kits op de markt in België voor de bepaling van inhibine B nl. de DSL Inhibin B ELISA en de OBI (Oxford Bio-innovation Ltd.) Inhibin B ELISA. De standaarden gebruikt in deze kits, werden gekalibreerd t.o.v. het WHO International Reference Reagent voor inhibine B (code 96/784). Dit reagens bevat 32 kD inhibine B en werd geproduceerd door 'The National Institute for Biological Standardisation and Control (NIBSC)'. De DSL kit bevat eveneens 2 controles (low en high). In onderstaande [tabel 18](#) wordt deze kits beknopt vergeleken. De analyse van inhibine B is met beide kits vrij arbeidsintensief en een incubatie overnacht is noodzakelijk. Met de DSL kit is er geen staalvoorbereiding vereist, terwijl met de OBI kit een 5-stapsvoorbereiding van ongeveer 45 min. nodig is. Voor de uitgebreide analyse procedure wordt verwezen naar desbetreffende bijsluiters (152, 153).

**Tabel 18:** Vergelijking commerciële kits voor inhibine B bepaling (152, 153).

	DSL Inhibin B ELISA	OBI Inhibin B ELISA
Standaard range	10 - 1000 pg/ml (n = 7)	15,6 - 1000 pg/ml (n = 8)
Staalvolume	50 µl	100 µl
Staaltype	serum	serum/plasma
Analytische sensitiviteit	7 pg/ml	<15 pg/ml
Precisie:		
<i>Intra-assay</i>	69 - 472 pg/ml; 3,5-5,6%	< 7%
<i>Inter-assay</i>	50 - 355 pg/ml; 6,2-7,6%	< 7%
Accuraatheid:		
<i>Recovery</i>	97% - 114%	Niet gespecificeerd
Lineariteit	87% - 110%	Niet gespecificeerd
Specificiteit	Specifiek	1% kruisreactie met inhibine A
Stabiliteit	Bij - 20°C: 30 dagen	Bij - 80°C tot analyse

### 3.1.3. Turn Around Time (TAT)

Momenteel wordt de analyse doorgestuurd naar de VUB (Jette) en bedraagt de TAT maximum 5 weken. Uit de data van 2007 blijkt de TAT gemiddeld 22,7 dagen (range: 7 - 46,8) te zijn. De klinici wensen eerder een TAT van 1 week tot maximum 2 weken om deze parameter te kunnen gebruiken bij differentiaal diagnose.

## 3.2. AMH

### 3.2.1. Preanalytische beschouwingen

De minimale variatie in serum AMH waarde tijdens de menstruele cyclus, maakt het mogelijk om de stalen op om het even welk moment tijdens de cyclus te nemen (38). De stabiliteit van de AMH spiegel tijdens de verschillende stappen van reproductieve fysiologie is in de praktijk zeer voordelig om AMH metingen te gebruiken voor onderzoek en 'managing' van (in)fertiliteit. Eén meting van AMH is in feite voldoende. De recente studie van Wunder *et al.* raadt toch aan om AMH spiegels te bepalen tijdens de eerste 5 dagen van de fysiologische, ovulatoire menstruele cyclus omdat de concentraties later in de cyclus toch (minimaal) kunnen fluctueren (40). Echter deze fluctuaties zijn niet klinisch relevant want deze kleine veranderingen in AMH zijn kleiner dan de intercyclus variabiliteit (146). In alle studies opgenomen in tabel 5 werd serum AMH gemeten tussen dag 3-5 van de menstruele cyclus (meestal dag 3).

De halfwaarde tijd van AMH wordt geschat op 48 h (143). Ovariectomie bij regelmatig menstruerende vrouwen is geassocieerd met het verdwijnen van AMH in 3-5 dagen. Zo zullen reeds na 72h gedaalde AMH concentraties worden gemeten bij een succesvolle operatie in het kader van resectie van een ovariumcarcinoom. Dit toont nogmaals aan dat AMH exclusief afkomstig is van de ovaria (142, 147). Zoals inhibine is AMH/ MIS ondetecteerbaar bij postmenopauzale vrouwen (Zie 2. TOEPASSINGEN).

Een aandachtspunt is het feit dat AMH als pro-hormoon wordt gesynthetiseerd, waarna klieving optreedt. Hierdoor wordt de covalente binding tussen de N- en C-terminale monomeren verbroken, maar blijft het molecuul door niet-covalente binding in stand (148, 149). Deze onstabiele binding kan door herhaaldelijk bevriezen en ontdooien verbroken worden, waardoor de gemeten concentraties afnemen wanneer gebruik wordt gemaakt van ELISA, waarin zowel antilichamen tegen het N- als tegen het C-terminale deel van het eiwit worden gebruikt. In tabel 20 worden gegevens zoals staaltype, staalvolume en stabiliteit van de stalen weergegeven.

De variatie tijdens de kinder- en jeugdijaren bij jongens en meisjes wordt weergegeven in [figuur 6](#). In de publicatie van Lee *et al.* worden normale AMH waarden tot en met 18 jaar voor jongens en meisjes weergegeven ([Tabel 19](#)) (11). Voor volwassen vrouwen worden er geen referentiewaarden opgegeven door de VUB, Jette. Uit de meeste studies blijkt dat voor een vrouw met normale fertiliteit een AMH waarde boven de 1 à 1,5 wordt verwacht. In AZ Sint Jan, Brugge werden recent de referentiewaarden, opgeven in de bijsluiters van de Beckman Coulter ELISA (Immunotech), geverifieerd. Voor een populatie vrouwen tussen 20 en 40 jaar werden referentiewaarden (0,8 – 7,8 ng/ml) bepaald (Zie *infra*). In deze populatie werd echter niet aangetoond dat deze vrouwen een normale ovarieële reserve hadden.

### 3.2.2. Analytische beschouwingen

AMH kan in serum worden gemeten door gebruik te maken van verschillende immunologische bepalingmethoden, volgens het principe van het klassieke radioimmunoassay en nu volgens enzym-immunometrische methodes. Deze laatste methoden evolueerden van traditionele ELISA (139, 148, 149) naar ultrasensitieve ELISA (142, 150). In 2000 ontwikkelde Long *et al.* een ELISA, die zowel bruikbaar is voor vrouwen als mannen, een sandwich type assay met een detectielimiet van 0,1 ng/ml (in tegenstelling tot het traditionele assay 2 ng/ml, gebruikt voor 2000). In 2005 is er een nieuwe dubbel-antistof ELISA voor AMH ontwikkeld met een detectielimiet van < 0,078 ng/ml (Oxford-Brookes assay) (150). De meeste studies voor 2005 maakten gebruik van Beckman Coulter ELISA (Immunotech). Momenteel zijn er twee kits op de markt in België voor de bepaling van AMH nl. AMH Beckman Coulter ELISA (Immunotech) en AMH DSL ELISA (154, 155). Twee studies vergeleken beide kits (98, 151). Ze rapporteerden onafhankelijk van elkaar dat de AMH waarden 4,6 en 3,1 maal lager zijn, wanneer er gemeten wordt met de DSL kit in vergelijking met de Immunotech kit. De lineaire correlatie tussen beide kits was goed over het hele meetbereik. AMH resultaten zijn methode-afhankelijk. Het verschil tussen de 2 methoden is waarschijnlijk te wijten aan het gebrek aan internationale standaard voor AMH. Door een standaard zou de kwaliteit van de assays sterk kunnen worden verbeterd.

**Tabel 20:** Vergelijking commerciële kits voor AMH bepaling (154, 155).

	EIA AMH/MIS kit (Immunotech-BC)	DSL
Standaard range	0,4 - 21 ng/ml (n = 6)	0,05 - 15 ng/ml (n = 6)
Staalvolume	25 µL	20 µL
Staaltype	Serum/plasma	Serum
Analytische sensitiviteit	0,1 ng/ml	0,017 ng/ml
Precisie:		
<i>Intra-assay</i>	≤ 12,3 % (bij 1 ng/ml)	≤ 4,6 % (bij 0,14 ng/ml)
<i>Inter-assay</i>	≤ 14,2 % (bij 0,8 ng/ml)	≤ 8 % (bij 0,15 ng/ml)
Accuraatheid:		
<i>Recovery</i>	91,4 - 108,2%	98 - 109%
<i>Dilutie</i>	90 - 109%	75 - 100%
Dynamische range	0,1 - 21 ng/ml	0,017 - 15 ng/ml
Specificiteit	Specifiek	Specifiek
Stabiliteit	Bij - 18°C: 20 maanden	Bij - 20°C of lager: tot analyse

### 3.2.3. Turn Around Time (TAT)

Momenteel wordt de analyse doorgestuurd naar de VUB (Jette) en de opgegeven TAT bedraagt maximum 1 maand. Uit de data van 2007 blijkt de TAT gemiddeld 23,6 dagen (range: 8-61) te zijn. De klinici wensen eerder een TAT van 1 week tot maximum 2 weken om deze parameter te kunnen gebruiken bij differentiaal diagnose.

## 4. WAT ZIJN DE MOGELIJKHEDEN VOOR LAG – UZ LEUVEN?

### 4.1. Situatie in UZ Leuven

#### **4.1.1. Voor welke disciplines kunnen de parameters inhibine B en/of AMH nuttig zijn? Huidige aanvraagindicaties en mogelijkheden in de toekomst.**

De bepaling van inhibine B en/of AMH vindt zijn toepassing in de algemene gynaecologie, oncologische gynaecologie, infertiliteitsgeneeskunde en endocrinologie. Uit een korte rondvraag en overleg met de clinici bleek de interesse voor deze parameters.

Momenteel wordt inhibine B aangevraagd voor de diagnose en follow-up van GCT door de dienst gynaecologische oncologie. Dit betekent ongeveer 150 aanvragen per jaar ( $\pm 25$  nieuwe patiënten,  $\pm 20$  bepalingen tijdens chemotherapie en  $\pm 100$  patiënten in follow-up). De gynaecologen doen ook beroep op inhibine B (en in mindere mate AMH) voor de menopauzale status en de ovariële reserve van de patiënten in te schatten. Initieel was er ook interesse om AMH als menopauze merker te gebruiken voor de start van therapie bij borstcarcinomen. In UZ Leuven worden er ongeveer 600 nieuwe borstkankerpatiënten per jaar gediagnosticeerd. Voordat een behandeling met aromatase-inhibitoren kan worden gestart, dient de vrouw menopauzaal te zijn. Echter door een recente casus, bleek AMH in deze setting toch niet zo betrouwbaar (Zie casus Dr. Johan Van den Berghe) en wordt afgezien van de AMH bepaling voor de therapiekeuze bij borstkankerpatiënten.

Jaarlijks worden  $> 60$  diagnoses van PCOS gesteld in UZ Leuven. Enkel bij twijfel van de diagnose (geen duidelijke klinische symptomen, geen of beperkt hyperandrogenisme, FSH en LH mild verhoogd...) zou AMH behulpzaam kunnen zijn volgens de gynaecologen. Tevens zou AMH nuttig zijn bij verdenking van prematuur ovariëel falen (POF) bij een leeftijd van  $< 40$  jaar.

In het fertiliteitscentrum van UZ Leuven worden ongeveer 500-700 patiënten jaarlijks behandeld ( $\pm 1500$  cycli/jaar). Wanneer een duidelijkere link tussen AMH en de therapie kan worden aangetoond, lijkt het voor deze clinici mogelijks ook een aanwinst. Momenteel wordt voor deze grote populatie geen AMH bepaling aangevraagd.

Ten slotte, zou inhibine B door de endocrinologen vooral aangevraagd worden bij mannen met niet-obstructieve azoöspermie in het kader van TESE. Op jaarbasis gaat dit over  $\pm 60$  mannen.

Op de dienst pediatrie wordt inhibine B sporadisch aangevraagd om onder andere de ovariële reserve (na maligniteit) in te schatten, bij vermoeden van prematuur ovariëel falen, testiculaire dysgenese en bij seksuele ambiguïteit bij geboorten en het Turner syndroom.

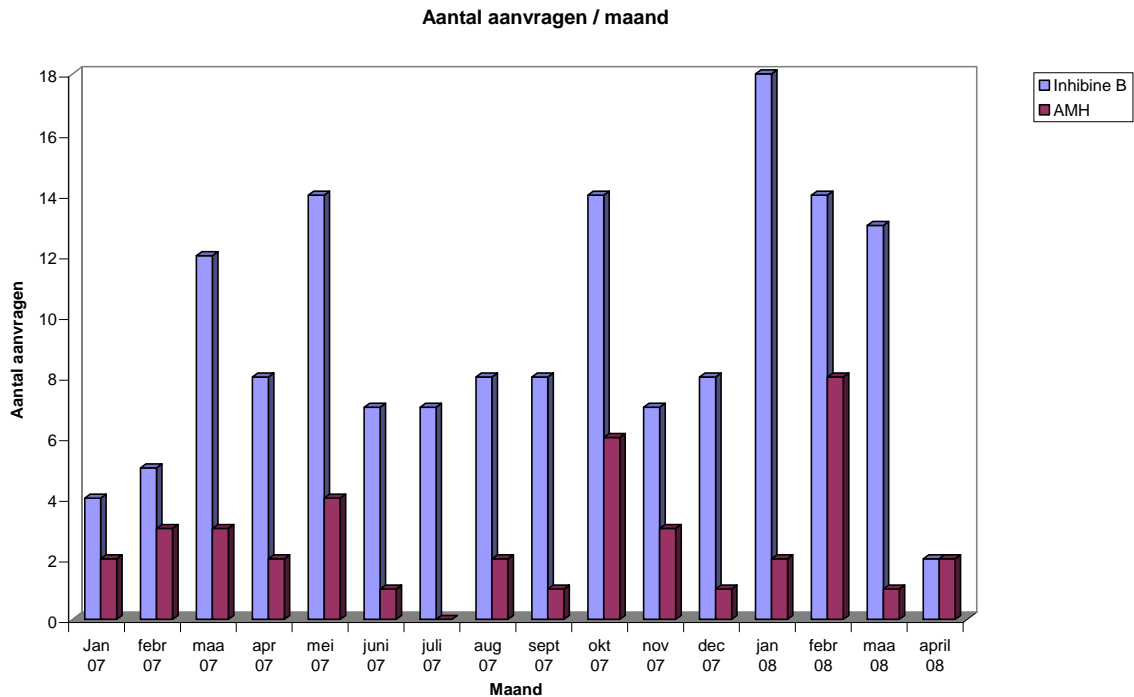
#### **4.1.2. Aanvragen van inhibine B en/of AMH**

Inhibine B is vermeld op het standaardaanvraagformulier 3012 (test 924). Wanneer de clinicus een AMH bepaling wenst, dient deze aanvraag via een 'Geachte collega'-bon te gebeuren. Dit geeft soms problemen naar de duidelijkheid van aanvragen, vermits regelmatig de aanvraag voor AMH op het standaardaanvraagformulier wordt bijgeschreven t.h.v. de inhibine B aanvraag of in het tekstvak voor klinische informatie. Dit kan makkelijk worden opgelost door AMH aan het aanvraagformulier 3012, in het vak voor reproductieve endocrinologie, toe te voegen.

#### **4.1.3. Huidige frequentie van aanvragen van inhibine B en/of AMH**

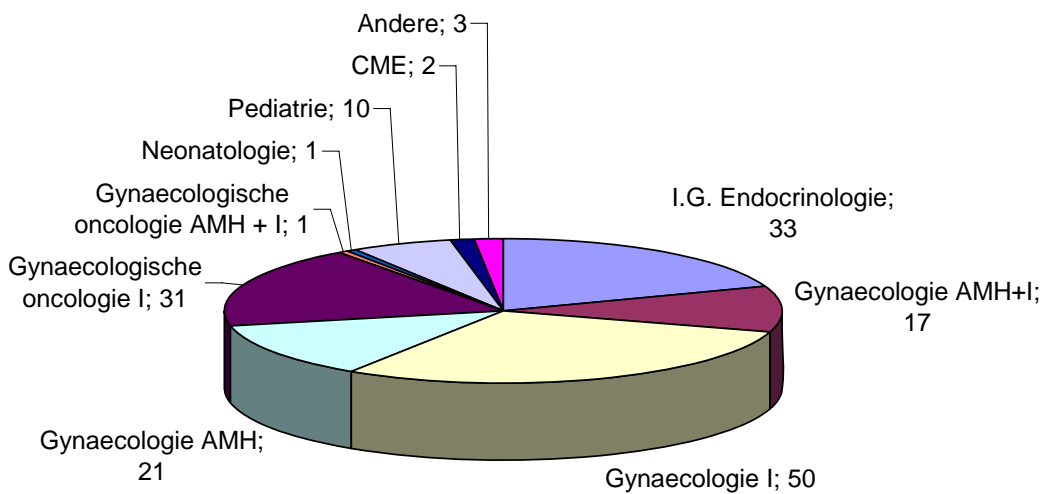
In de periode 2007 tot april 2008 werd inhibine B 148 maal aangevraagd en AMH slechts 39 keer. AMH werd 21 keer alleen aangevraagd en 18 keer in combinatie met inhibine B (17 keer door de dienst gynaecologie en 1 keer door oncologische gynaecologie).

De aanvraagfrequentie en aanvraagverdeling over verschillende disciplines van inhibine B en AMH voor 2007 en 2008 (tot en met april) worden in onderstaande grafieken weergegeven (Figuren 12-13).



**Figuur 12:** Aantal aanvragen per maand van inhibine B en AMH voor de periode 2007 tot april 2008. Inhibine B werd in deze periode gemiddeld 9 keer per maand en AMH 2 tot 3 keer per maand aangevraagd.

**Aanvragen inhibine B en AMH per eenheid**



**Figuur 13:** Aantal aanvragen van inhibine B en AMH per eenheid voor de periode 2007- april 2008. (I = inhibine B)

## 4.2. Kostprijs van de testen inhibine B en AMH

### 4.2.1. Primaire kostprijs

Momenteel is de kostprijs van de inhibine B en de AMH bepaling, wanneer uitgevoerd in de VUB 20 euro en 18 euro, respectievelijk. Voor de inhibine B bepaling wordt in de VUB gebruik gemaakt van de OBI Inhibin B ELISA en voor de AMH bepaling de Beckman Coulter ELISA (Immunotech).

De kost van primaire activiteit (reagentia en personeelskost van MLT) voor de analyse van inhibine B en AMH wordt berekend voor de verschillende kits op de Belgische markt en wordt hieronder weergegeven. De ondersteunende kost wordt niet in rekening gebracht.

#### A. INHIBINE B

##### 1) OBI Inhibin B ELISA

Kit: 620 euro (excl. BTW)

500 euro (proefkit)

2 x 96 well plaat (192 wells). Mogelijkheid tot 96 analyses, wanneer alle analyses in duplo worden uitgevoerd.

Standaardcurve opstellen a.d.h.v. 8 standaarden.

Dus mogelijkheid: 88 analyses van stalen.

620 : 192 = 3,2 euro per well, dus in duplo: 6,5 euro per analyse.

MLT: effectieve workload: 3 uur (1 uur staalvoorbereiding en 2 uur analyse-uitvoering).

Kost voor MLT: gemiddeld 40 euro/uur → 3 uur werk: 120 euro.

Stalen per run	Stalen en standaarden/controles	Prijs *per test	Prijs per test + personeelskost
2	10	32,5	92,5
6	14	15,2	35,2
9	17	12,3	25,6
12	20	10,8	20,8
24	32	8,6	13,6

\* prijs in euro

Inhibine B wordt momenteel gemiddeld 9 keer per maand aangevraagd (grijs gearceerd).

##### 2) DSL Inhibin B ELISA

Kit: 510 euro (excl. BTW)

350 euro (proefkit)

96 well plaat. Mogelijkheid tot 48 analyses, wanneer alle analyses in duplo worden uitgevoerd.

Standaardcurve opstellen a.d.h.v. 7 standaarden en meenemen van 2 controles

Dus mogelijkheid: 39 analyses van stalen.

510 : 96 = 5,3 euro per well, dus in duplo: 10,6 euro per analyse.

MLT: effectieve workload: 2 uur.

Kost voor MLT: gemiddeld 40 euro/uur → 2 uur werk: 80 euro.

Stalen per run	Stalen en standaarden/controles	Prijs* per test	Prijs per test + personeelskost
2	11	58	98
6	15	26,5	39,8
9	18	21,2	30,1
12	21	18,5	25,2
24	33	14,5	17,8

\* prijs in euro

Inhibine B wordt momenteel gemiddeld 9 keer per maand aangevraagd (grijs gearceerd).

## B. AMH

### 1) Beckman Coulter ELISA (Immunotech)

Kit: 535 euro (excl. BTW)

420 euro (proefkit)

96 well plaat. Mogelijkheid tot 48 analyses, wanneer alle analyses in duplo worden uitgevoerd.

Standaardcurve opstellen a.d.h.v. 6 kalibratoren en meenemen van 2 controles (bv. gebruik van serumpools of gebruik van Biorad Lyphochek Immunoassay plus level 1, waarin  $\pm 5$  ng/ml AMH wordt gevonden (VUB). Dit kan worden gebruikt om de precisie te testen)

Dus mogelijkheid: 40 analyses

$535 : 96 = 5,5$  euro per well, dus in duplo: 11 euro per analyse.

MLT: effectieve workload: 2 uur.

Kost voor MLT: gemiddeld 40 euro/uur  $\rightarrow$  2 uur werk: 80 euro.

Stalen per run	Stalen en standaarden/controles	Prijs* per test	Prijs per test + personeelskost
2	10	55	95
3	11	40,3	66,9
6	14	25,6	38,9
12	20	18,3	25
24	32	14,6	17,9

\* prijs in euro

AMH wordt momenteel gemiddeld 2 tot 3 keer per maand aangevraagd (grijs gearceerd).

### 2) AMH DSL ELISA

Kit: 460 euro (excl. BTW)

275 euro (proefkit)

96 well plaat. Mogelijkheid tot 48 analyses, wanneer alle analyses in duplo worden uitgevoerd.

Standaardcurve opstellen a.d.h.v. 6 kalibratoren en meenemen van 2 controles (in kit)

Dus mogelijkheid: 40 analyses

$460 : 96 = 4,8$  euro per well, dus in duplo: 9,6 euro per analyse.

MLT: effectieve workload: 2 uur.

Kost voor MLT: gemiddeld 40 euro/uur  $\rightarrow$  2 uur werk: 80 euro.

Stalen per run	Stalen en standaarden/controles	Prijs* per test	Prijs per test + personeelskost
2	10	48	88
3	11	35,2	61,9
6	14	22,4	35,7
12	20	16	22,6
24	32	12,8	16,1

\* prijs in euro

AMH wordt momenteel gemiddeld 2 tot 3 keer per maand aangevraagd (grijs gearceerd).

#### 4.2.2. De terugbetaling van inhibine B en AMH

De bepaling van AMH en inhibine B zijn niet opgenomen in de RIZIV nomenclatuur. Momenteel is er dus geen ZIV terugbetaling mogelijk.

#### Conclusie

De inhibine B en AMH analyses zijn tijdrovend en arbeidsintensief. Voor de inhibine B bepaling blijkt de OBI Inhibin B ELISA goedkoper dan de DSL Inhibin B ELISA en voor de AMH bepaling is de AMH DSL ELISA voordeliger qua kostprijs dan de Beckman Coulter ELISA (Immunotech).

Inhibine B wordt gemiddeld 9 keer per maand en AMH 2 tot 3 keer per maand aangevraagd (Zie supra).

Rekening houdend met de huidige aanvraagfrequentie blijkt uitbesteding van deze analyses aan de VUB goedkoper te zijn.



## 5. ENKELE ILLUSTRATIES MET BETREKKING TOT DE SERUM AMH BEPALING

### 1) Referentiewaarden

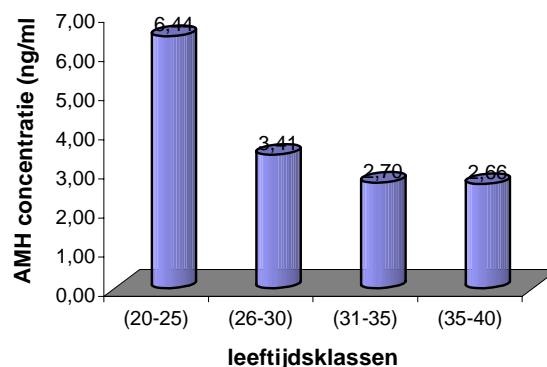
In de literatuur en door de VUB worden geen referentiewaarden voor vrouwen gerapporteerd. In het AZ Sint Jan in Brugge werden referentiewaarden opgesteld met de AMH Beckman Coulter ELISA (Immunotech) kit en de resultaten werden getoetst aan de opgegeven waarden van de fabrikant. Omdat het grootste toepassingsgebied van AMH voor de vrouw de fertiliteitsgeneeskunde is, werden 41 serumstalen van vrouwen tussen 20 en 40 jaar oud geanalyseerd (13 vrouwen tussen 20-30 jaar, 28 vrouwen tussen 30-40 jaar). Deze stalen waren afkomstig van bloeddonoren. Er werd echter niet aangetoond dat iedere vrouw een normale ovariële reserve had. In [tabel 21](#) en [figuren 14-15](#) worden de resultaten weergegeven.

**Tabel 21:** referentiewaarden opgesteld aan de hand van 41 serumstalen van gezonde, niet-geselecteerde vrouwelijke bloeddonoren tussen 20 en 40 jaar.

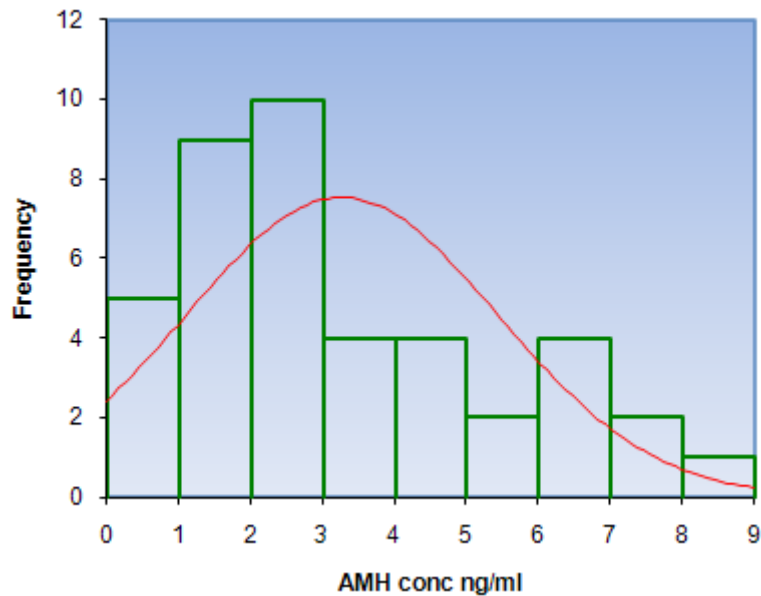
	AMH concentratie (ng/ml) AZ Sint Jan Brugge	AMH concentratie (ng/ml) Opgegeven door bijsluiter*
Aantal stalen	41	40
Gemiddelde	3,27	2,67
Mediaan	2,70	2,28
Standaarddeviatie	2,17	
Minimum	0,37	
Maximum	8,20	
2,5 <sup>de</sup> percentiel	0,79	
97,5 <sup>de</sup> percentiel	7,80	

\* AMH Beckman Coulter ELISA (Immunotech) kit

**AMH concentratie bij vrouwen tussen 20 en 40 jaar**



**Figuur 14:** Gemiddelde AMH concentraties bij vrouwen tussen 20 en 40 jaar verdeeld over 4 leeftijdsklassen.



**Figuur 15:** Histogram van de serum AMH concentratie. De rode lijn geeft een normale verdeling weer.

### Conclusie

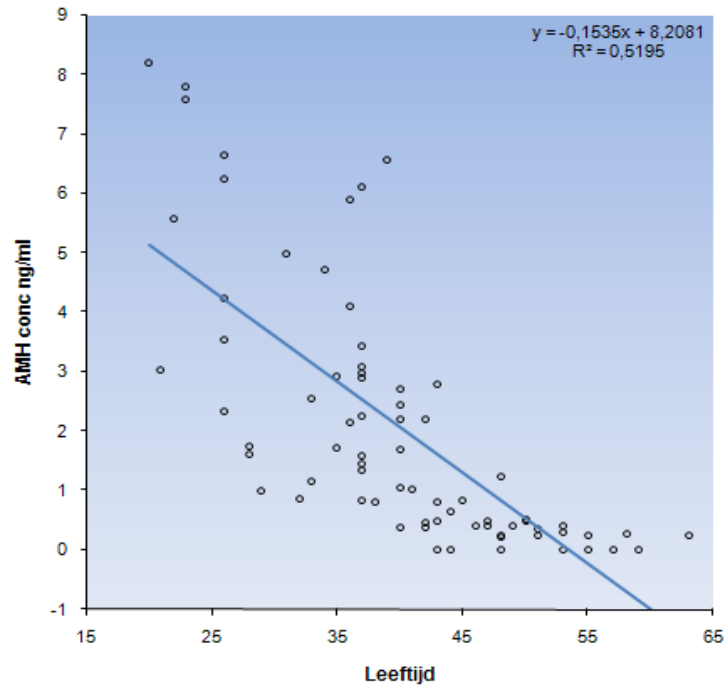
De bekomen resultaten suggereren dat een serum AMH concentratie tussen 0,80 ng/ml en 7,8 ng/ml als referentie kan worden beschouwd voor vrouwen tussen 20 en 40 jaar.

De waarden opgegeven in de bijsluiters van de Beckman Coulter ELISA (Immunotech) zijn lager dan de waarden van AZ Sint Jan Brugge, maar liggen in dezelfde lijn.

Het histogram is duidelijk visueel afwijkend van een normale verdeling.

## **2) Correlatie tussen de AMH concentratie en de leeftijd**

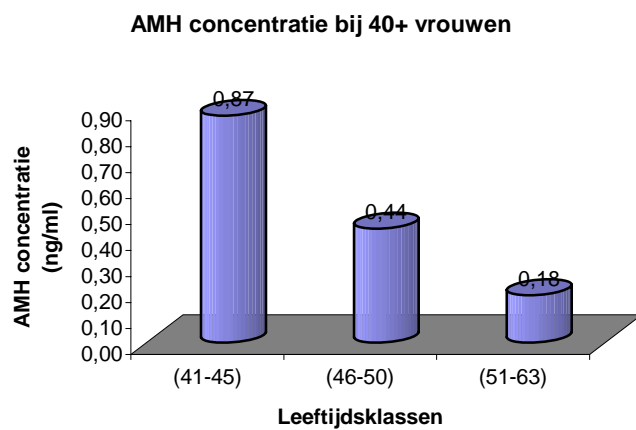
Uit literatuurgegevens blijkt het serum AMH gecorreleerd te zijn met de leeftijd. Vermits de ovariële reserve daalt met de leeftijd, zal ook het AMH dalen met ouder worden door geleidelijke uitputting van de folliculaire pool. In AZ Sint Jan Brugge werd dit gegeven getoetst door het analyseren van 73 serumstalen van vrouwelijke bloeddonoren van verschillende leeftijden, variërend tussen 20 en 63 jaar. Deze stalen werden niet geselecteerd op basis van een normale ovariële reserve. In [figuur 16](#) wordt de correlatie tussen de leeftijd en de AMH concentratie via een scatter diagram weergegeven.



**Figuur 16:** AMH concentratie weergegeven in functie van de leeftijd ( $r = -0,724$  en  $p < 0,0001$ ).

Met de toename van de leeftijd blijkt dus het AMH te dalen om ondetecteerbaar te worden bij postmenopauzale vrouwen. Dit wordt geïllustreerd door een aantal ( $N = 32$ ) serumstalen van vrouwen die ouder zijn dan 40 jaar te analyseren met de AMH Beckman Coulter ELISA (Immunotech) kit. Dit zijn stalen afkomstig van het transfusiecentrum en opnieuw niet geselecteerd op basis van normale folliculaire voorraad. Ook is het niet geweten of de onderzochte vrouwen pre- of postmenopauzaal zijn.

De leeftijd varieerde tussen de 40 en de 63 jaar. De resultaten worden in 3 leeftijdsklassen ingedeeld: 41-45 ( $N = 11$ ), 45-50 ( $N = 10$ ) en 50+ ( $N = 10$ ) met gemiddelde waarden van 0,87; 0,44 en 0,18 respectievelijk. De resultaten worden weergegeven in **figuur 17**.



**Figuur 17:** Gemiddelde AMH concentraties bij '40+-vrouwen' verdeeld over 3 leeftijdsklassen.

## Conclusie

Een statistische significante ( $p < 0,0001$ ) inverse correlatie tussen de leeftijd en de serum AMH concentratie wordt gezien.

Ook bij de 40+ vrouwen wordt deze duidelijke dalende trend waargenomen met toenemende leeftijd. De folliculaire reserve van deze '40+vrouwen' is al sterk gedaald en deze lage AMH concentraties zijn dus in lijn met de theoretische verwachtingen (zie APPRAISAL).

### **3) Kleine retrospectieve pilootstudie in UZ Leuven: serum AMH bepaling op fertiliteitsstalen**

Doel: Nagaan wat de spreiding is van de AMH waarden in een geselecteerde jonge populatie vrouwen, die voor de eerste maal een IVF cyclus ondergaan.

Illusteren of er in een geselecteerde populatie vrouwen van het Leuvens fertiliteitcentrum, net zoals in de literatuur, een correlatie bestaat tussen AMH en het aantal mature oocyten/aangeprikte oocyten.

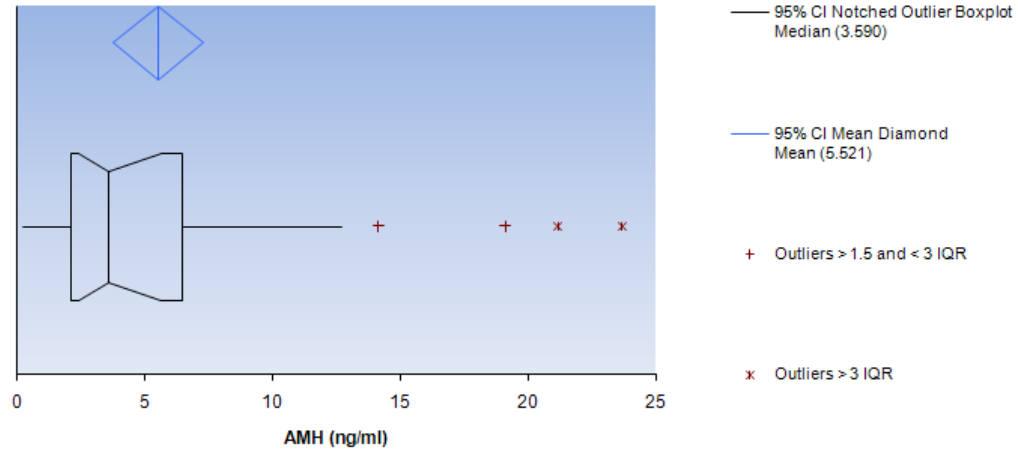
Populatie: 41 vrouwen, jonger dan 36 jaar, die voor de eerste maal deelnamen aan een IVF cyclus. De embryotransfer gebeurde telkens op dag 3 en er werd telkens 1 embryo teruggeplaatst.

Studie-opzet: De analyse van AMH werd bepaald op 41 serumstalen (2006-2007), die bewaard werden in de serotheek van de dienst laboratoriumgeneeskunde. De analyse werd uitgevoerd in AZ Sint Jan (Brugge) en de analyses werden uitgevoerd met de AMH Beckman Coulter ELISA (Immunotech) kit. De klinische data van de patiënten zijn afkomstig van het fertiliteitscentrum van UZ Leuven. We beschikten over data zoals: het aantal aangeprikte oocyten, het aantal mature oocyten, aantal bevruchte oocyten en de hormonen; oestradiol en FSH bij het begin van de cyclus. Tevens waren gegevens beschikbaar over de detectie van hCG (biochemische zwangerschap) en de aanwezigheid van een intra-uteriene vruchtzak op het einde van de cyclus.

#### Resultaten:

##### ➤ *Spreiding van de serum AMH waarden*

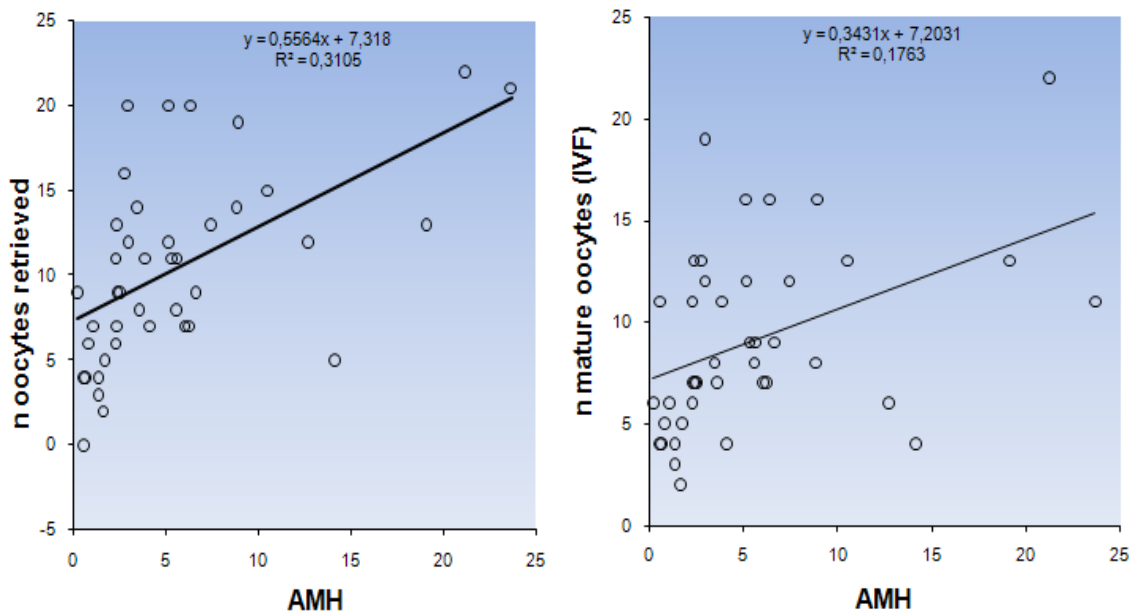
De gemiddelde AMH concentratie bedraagt 5,5 ng/ml, met een minimum van 0,21 ng/ml en een maximum van 23,66 ng/ml. De mediaan is 3,6 ng/ml en de standaarddeviatie 5,6 (variantie = 30,9; IQR = 4,07). De spreiding van de AMH concentraties worden in onderstaande Box plot weergegeven (Figuur 18). De serum AMH concentraties in een vooraf geselecteerde groep vrouwen blijkt een grote spreiding te hebben.



**Figuur 18:** Box plot-weergave van de spreiding van de AMH concentraties in een populatie jonge vrouwen, die voor de eerste maal een IVF cyclus ondergaan.

➤ *Correlaties (Pearson)*

In deze kleine populatie kon een significante positieve correlatie tussen serum AMH en het aantal aangeprikte/mature oocyten worden aangetoond (**Figuur 19**). Tussen AMH-oestradiol/FSH en tussen het aantal aangeprikte/mature oocyten en oestradiol/FSH kon geen correlatie worden gevonden.



**Figuur 19:** Correlatie tussen de serum AMH concentratie en het aantal aangeprikte oocyten ( $r = 0,56$  en  $p = 0,0002$ ) en het aantal mature oocyten ( $r = 0,42$  en  $p = 0,0063$ ) respectievelijk.

➤ *Zwangerschap*

De aanwezigheid van een intra-uteriene zak is de manier om de implantatiekans per utero teruggeplaatste embryo te beoordelen én is de belangrijkste parameter om een IVF-programma te beoordelen. In 13 van 41 vrouwen was een intra-uteriene zak aanwezig. Omwille van de kleine testpopulatie en de ongelijkheid tussen het aantal in de 2 groepen (o.b.v. aanwezigheid van intra-uteriene zak) heeft het geen zin om de al dan niet aanwezigheid van een intra-uteriene vruchtzak statisch te vergelijken met de serum AMH concentratie.

In de meeste studies varieert de drempelwaarde voor IVF-falen rond de 1,1 - 1,5 ng/ml. Uit de resultaten van deze kleine studie werd opgemerkt dat in 8 van de 41 serumstalen een serum AMH concentratie lager dan 1,5 ng/ml werd gedetecteerd. Bij 2 van deze 8 vrouwen met een laag serum AMH was op het einde van de cyclus een intra-uteriene zak aanwezig.

#### Conclusie:

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat er een positieve correlatie bestaat tussen de serum AMH concentratie en de aangeprikte/mature oocyten, zoals meermaals beschreven in de literatuur. Tevens wordt ook aangetoond dat een succesvolle zwangerschap niet gelinkt is aan de serum AMH concentratie. AMH kan dus zeker niet gebruikt worden om patiënten uit te sluiten van behandeling op basis van een (té) lage AMH waarde.

Wat de reële bruikbaarheid is van de parameter AMH binnen de fertiliteitsgeneeskunde in UZ Leuven dient nog verder te worden onderzocht in een grote, prospectieve cohort studie.

## COMMENTS

---

De aanvraagfrequentie van inhibine B en AMH is relatief gering. Deze analyses worden niet door ZIV terugbetaald, waardoor hoogstwaarschijnlijk de patiënt zelf de kost van de analyse moet financieren. Om een 'aanvaardbare' prijs te kunnen aanbieden en aan de TAT vereisten van minstens tweemaandelijks tegemoet te kunnen komen, worden deze testen in principe te weinig aangevraagd.

Wat de kost voor de patiënt betreft, moet in overweging worden genomen dat de AMH analyse echter slechts éénmalig moet uitgevoerd worden wanneer diagnostisch gebruikt voor toepassingen zoals evaluatie van seksuele disfunctie, de bepaling van de menopauze, PCOS en GCT. Ook voor de ovariële reserve te meten voor COH of na een maligniteit is slechts éénmalige AMH analyse noodzakelijk. Voor follow-up van GCT is 3 (eerste 2 jaar) tot 6 maandelijks (tot 5 jaar) bepaling van inhibine B of AMH aan te raden. Tot 10 jaar na de tumor worden deze hormonen jaarlijks gecontroleerd. Inhibine B bepaling bij de volwassen man dient in de meeste gevallen ook slechts eenmalig te worden bepaald om de oorzaak van infertiliteit op te helderen.

Wat de TAT betreft, moeten de zorg en de noden van de patiënt centraal staan. De diagnosestelling van bijvoorbeeld cryptorchidie, seksuele disfunctie, PCOS of een ovariële tumor vereisen soms 'snelle' ( $\leq 2$  weken) analyse van deze hormonen. Zo kan de clinicus sneller actie ondernemen; sneller starten van de medicamenteuze behandeling of plannen van een chirurgische ingreep. Tevens kan de patiënt en de familie sneller worden geïnformeerd. Voor de andere toepassingen is de langere TAT van ondergeschikt belang. Momenteel worden deze analyses uitbesteed aan de VUB (Jette) en kan aan de gewenste TAT niet worden voldaan. Wanneer deze analyses in UZ Leuven uitgevoerd zouden worden en rekening wordt gehouden met de huidige aanvraagfrequentie blijkt dit ook quasi onmogelijk om een TAT van maximum 2 weken te garanderen.

## TO DO/ACTIONS

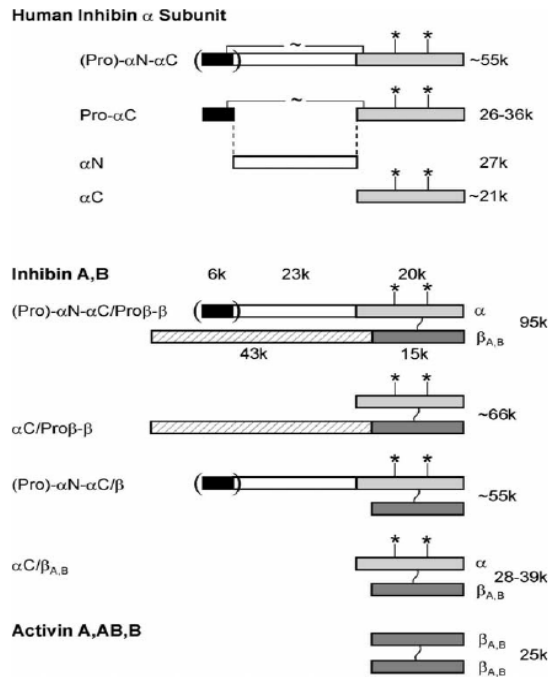
---

- 1) Indien besloten wordt om de test aan te bieden in UZ Leuven, dienen de gekozen kits te worden gevalideerd en moeten er referentiewaarden worden opgesteld.
  - Voor inhibine B dienen de referentiewaarden, opgegeven door de VUB, worden geverifieerd op een kleine populatie vrouwen (N = 30) en mannen (N = 30).
  - Voor de bepaling van AMH kunnen de referentiewaarden van AZ Sint Jan Brugge een leidraad zijn. In deze populatie (zie supra) werd niet aangetoond dat iedere vrouw een normale ovariële reserve had. In UZ Leuven dienen nog referentiewaarden te worden opgesteld. Eerst dient de referentiepopulatie correct te worden gedefinieerd. Een voorstel kan zijn: AMH bepalen in een grote populatie (N = 100) vrouwen met 'bewezen fertiliteit' (minstens 1 bewezen conceptie en normaal hormonaal bilan). In samenwerking met de clinici (gynaecologen) zou de selectie van deze populatie mogelijk kunnen zijn.
- 2) Nagaan of het mogelijk is om de ELISA testen voor inhibine B en AMH (gedeeltelijk) te automatiseren door gebruik te maken van de MicroProbe (Packard) en/of BEP (Dade Behring).
  - a. Het gebruik van een toestel is nauwkeurig in het pippeteren van stalen en reagentia en veroorzaakt minder pippeteerfouten. Dit zou de reproduceerbaarheid en precisie ten goede komen. Er kan eventueel worden overwogen om de analyse in enkelvoud uit te voeren, wat ook kostenbesparend is qua reagentia.

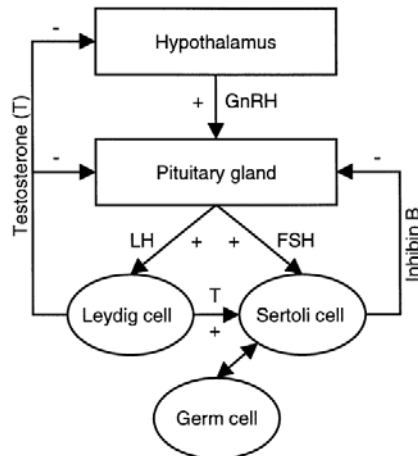
- b. Tijdens de incubatie moeten de ELISA platen voor inhibine B en AMH bepaling geschud worden. De BEP kan geen platen schudden. Er moet worden uitgetest dat dit schudden essentieel is in de procedure en nagaan of het niet schudden van de platen grote verschillen in resultaten met zich meebrengt.



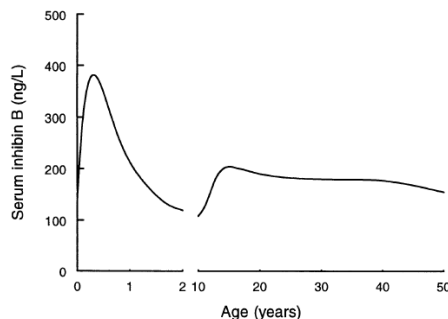
ATTACHMENTS



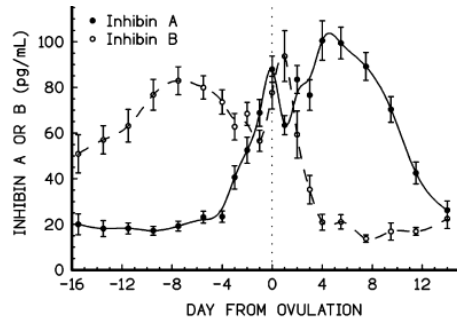
Figuur 1: Verschillende moleculaire vormen van inhibine en activine (137).



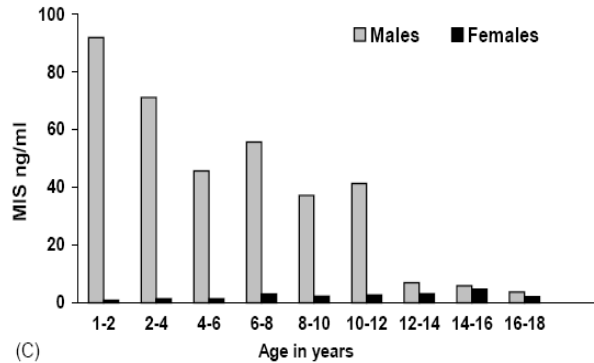
Figuur 2: Een schematische voorstelling van de hypothalamo-hypofysaire-testis as bij de volwassen man.



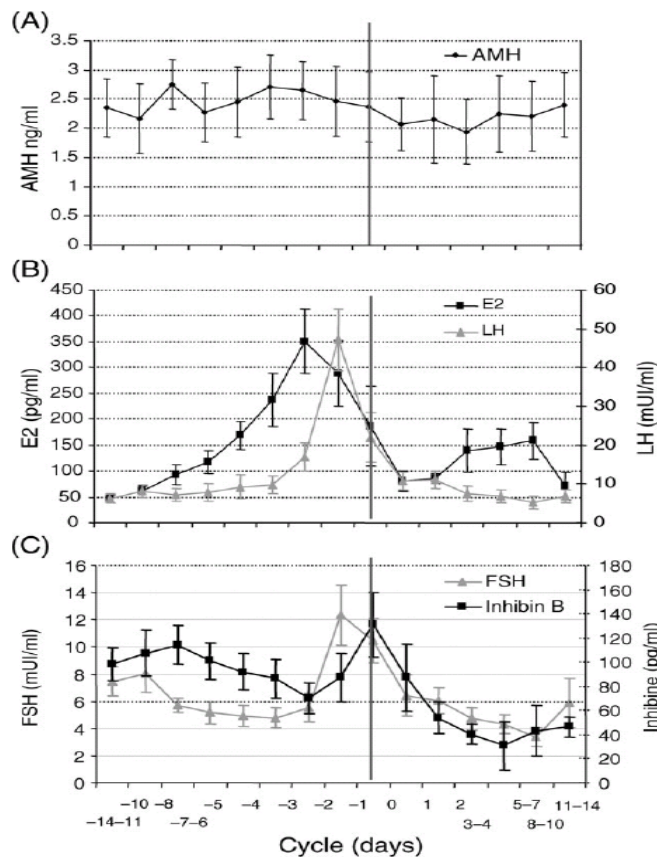
Figuur 3: Serum inhibine B in mannen in relatie tot de leeftijd. De eerste piek in de neonatale periode is te wijten aan de Sertoli-cel proliferatie. Tijdens de kindertijd daalt de inhibine B spiegel en wordt gevolgd door een tweede stijging bij het begin van de puberteit. Inhibine B daalt met het ouder worden (9).



Figuur 4: Verloop van inhibine A en B concentraties tijdens de menstruele cyclus (40).



Figuur 6: AMH waarden bij kinderen in kinder-/jeugdijaren, weergegeven voor jongens en meisjes t.o.v. de leeftijd in jaren. In tegenstelling tot de hoge AMH waarden bij jongens zijn de serum AMH waarden bij meisjes zeer laag of ondetecteerbaar tijdens de kinder-/jeugdijaren (32).



Figuur 7: Variatie van de hormonale serum spiegels ten opzichte van de dag van de ovulatie (verticale lijn) (37).

**Tabel 1:** Interpretatie van serum AMH waarden in jongens met cryptorchidie en kinderen met intersex condities weergegeven (11).

MIS	Interpretation	Intervention
Boys with cryptorchidism		
Detectable	Testes present	Infants: observe >1 year: orchiopexy
Unmeasurable	Probably anorchia (R/O PMDS)	hCG stimulation test to confirm
Children with intersex conditions		
Above male range (usually elevated during infancy and puberty, otherwise normal)	Testicular tissue present (CAIS, 5 $\alpha$ -reductase deficiency, testosterone biosynthetic defects)	Intersex evaluation (hormonal, genetic, and imaging studies) Consider exploration/biopsy/resection
Normal male range	Testes usually normal (hypothalamic-pituitary dysfunction, PAIS, idiopathic male pseudohermaphroditism) R/O occasional ovotestes	Intersex evaluation (hormonal, genetic, and imaging studies) Consider exploration/biopsy Resect dysgenetic testicular tissue or ovotestes
Below normal male range and above female range	Testicular tissue present (dysgenetic testes, ovotestes)	Intersex evaluation (hormonal, genetic, and imaging studies) Exploration/ biopsy Resect dysgenetic testicular tissue or ovotestes
Normal female range	Testicular tissue usually absent (46,XX CAH, pure gonadal dysgenesis) R/O occasional dysgenetic testes or ovotestes	Intersex W/U (hormonal, genetic, and imaging studies) Consider exploration/biopsy if CAH excluded
Undetectable	Testicular tissue absent (CAH, pure gonadal dysgenesis) Exceptions: PMDS, specimen at room temperature	Intersex W/U (hormonal, genetic, and imaging studies) Consider exploration/biopsy if CAH excluded

CAH: congenital adrenal hyperplasia

PAIS: partial androgen insensitivity syndrome

CAIS: complete androgen insensitivity syndrome

PMDS: persistent Mullerian duct syndrome

**Tabel 2:** Positieve en negatieve predictieve waarden van serum inhibine B en FSH alleen en gecombineerd als merker voor mannelijke infertiliteit in populaties met verschillende prevalentie van infertiliteit (42).

	Cut-off	Positieve predictieve waarde (%)			Negatieve predictieve waarde (%)		
		P = 0,05	P = 0,1	P = 0,5	P = 0,05	P = 0,1	P = 0,5
Inhibin B	119 pg/ml	36	54	91	97	95	67
FSH	6,86 IU/L	38	56	92	98	95	69
Inhibin B/ FSH ratio	23,5 ng/IU	39	58	93	98	96	71
Inhibin B en FSH	119 pg/ml en 6,86 IU/L	30	47	89	98	96	72

P: prevalentie

**Tabel 3:** De performantiekarakteristieken van de hormonen inhibine B, FSH en AMH voor het voorspellen van de uitkomst van 'testicular sperm extraction (TESE)'

Referentie	Aantal (N)	Hormonen	Drempel	Succesvolle TESE			
				Sens	Spec.	PPV	NPV
Eckardstein et al. (1999)	52	Inh B	94 pg/ml	46,8	66,6	71	41
		FSH	7 IU/L	41	72,2	72,2	40,6
		Inh B + FSH	94 pg/ml + 7 IU/L	75	73,3	75	41
		Inh B	139 pg/ml	25	88,8	80	40
		FSH	4,9 IU/L	25	88,5	80	40
		Inh B + FSH	139 pg/ml + 4,9 IU/L	83,3	41,7	19,2	93,8
Ballesca et al. (2000)	17	Inh B	40 pg/ml	90	100		
		FSH	17 IU/L	90	42,8		
Brugo-Olmedo et al. (2001)	72	Inh B	53 pg/ml	91	75,8	74,6	91,7
Vernaev et al. (2002)	185	Inh B	13,7 pg/ml	44,6	63,4		
		FSH	25 IU/L	74,3	44,3		
		Inh B- FSH ratio		75,7	41,4		
Bohring et al. (2002)	34	Inh B	79 pg/ml	52,5	50		
		FSH	10 IU/ml	58	60		
Tunc et al. (2006)	52	Inh B	6,25 pg/ml	90	14	58,6	50
		FSH	4,09 IU/L	90	19	60	57,1
Duvilla et al. (2007)	26	Inh B	15 ng/L	62,5	81,5		
		FSH	22 IU/L	100	55		
		InhB*	30 ng/L	66,6	66,6		
		AMH*	1,4 pmol/L	77,7	66,4		
		FSH, Inh B*, AMH*	1,358	100	80		
Goulis et al. (2008)	51	Inh B	14,5 pg/ml	100	29		
		FSH	16 mU/ml	74	74		
		AMH	3,6 ng/ml	81	50		

N: mannen met (niet- obstructieve azoöspermie) of hypospermatogenese. Van studie tot studie verschillen de inclusiecriteria.

\*: meten van de hormonen in seminaal plasma

**Tabel 5:** AMH voor de predictie van zwakke ovariële respons op COH (5).

Referentie	Cycli (N)	Zwakke respons	Drempelwaarde	Predictie van zwakke respons					
				Sens. %	Spec. %	LR +	Pretest prob. (%)	Posttest prob. (%)	Proportie met abnormale test (%)
Van Rooij et al. (2002)	119	< 4 oocyten	0,1 µg/l	0,49	0,94	8,2	29	77	18
			0,2 µg/l	0,54	0,90	5,4	29	70	23
			0,3 µg/l	0,60	0,89	5,5	29	70	25
Muttukrishna et al. (2004)	69	< 4 oocyten Afbreken cyclus	0,1 ng/ml	0,76	0,88	6,3	25	68	16
Tremellen et al. (2005)	238	< 4 oocyten	8,1 pmol/l	0,80	0,85	5,3	27	67	32
Muttukrishna et al. (2005)	108	< 4 oocyten	0,2 ng/ml	0,87	0,64	2,4			
Penarrubia et al. (2005)	80	Afbreken cyclus	4,9 pmol/L	0,40	0,92	5	25	62	16
Ficicioglu et al. (2006)	44	< 5 oocyten	0,25 pg:ml	0,91	0,91	10,1	25	77	30
La Marca et al. (2006)	48	< 4 oocyten Afbreken cyclus	0,5 ng/ml	0,85	0,82	4,7	25	63	33
			0,75 ng/ml	0,80	0,93	11,4	25	77	27
Ebner et al. (2006)	141	< 4 oocyten	1,66 ng/ml	0,69	0,86	4,9	26	63	28
McIlveen et al. (2007)	84	≤ 4 oocyten	1,25 ng/ml	0,58	0,75	2,3	57	76	44
Smeenk et al. (2007)	80	≤ 4 oocyten	1,4 µg/l	0,62	0,73	2,3	16	31	33
Freour et al. (2007)	69	< 6 oocyten	1,3 µg/l	0,44	1,00		13	100	6
Kwee et al. (2007)	104	< 6 oocyten	0,8 µg/l	0,55	0,94	9,2	27	75	19
			1 µg/l	0,66	0,94	11	27	78	22
			1,2 µg/l	0,69	0,88	5,8	27	68	27
			1,4 µg/l	0,76	0,86	5,4	27	66	31
			1,6 µg/l	0,79	0,78	3,6	27	56	38

LR: likelihood ratio

Prob.: probabilliteit

**Tabel 6:** Karakteristieken van de geïncludeerde studies voor AMH (N = 2) (6).

Referentie	Consecutief	1 cyclus/koppel	Definitie		Assay
			Zwakke respons	ZS	
Van Rooij et al. (2002)	Ja	Ja	< 4 oocyten of < 3 follikels	bezig	ELISA (Immunotech)
Muttukrishna et al. (2004)	Nee	Ja	< 4 follikels 15 mm	NVT	ELISA (Immunotech)

ZS: zwangerschap

NVT: niet van toepassing

**Tabel 7:** Performantiekarakteristieken van AMH voor de predictie van zwakke respons bij IVF patiënten en shift van pre-test naar post-test probabiliteit van zwakke respons bij patiënten met een abnormaal AMH resultaat (6).

Referentie	Cycli (N)	AMH dempel ng/mL	Predictie zwakke R				Probabiliteit	
			Sens.	Spec.	+LR	DOR	Pre-AMH	Post-AMH
Van Rooij et al. (2002)	119	< 0,1	0,49	0,94	8,2	14,9	29	77
		< 0,2	0,54	0,90	5,7	11,3	29	70
		< 0,3	0,60	0,89	5,6	12,5	29	70
Muttukrishna et al. (2004)	69	< 0,1	0,76	0,88	6,6	24,9	25	68

DOR: diagnostische odds ratio

+LR: Likelihood ratio voor een positief resultaat

**Tabel 8:** Karakteristieken van de geïncludeerde studies voor inhibine B (N = 9) (6).

Referentie	Consecutief	1 cyclus/koppel	Definitie		Assay
			Zwakke respons	ZS	
Balash et al. (1996)	Ja	Ja	< 3 follikels 14 mm	NVT	Immunoenzymometrisch (Medgenix)
Seifer et al. (1997)	Ja	Nee	< 4 follikels 15 mm	Klinisch	ELISA (Serotec)
Hall et al. (1999)	Nee	Nee		Klinisch	ELISA (Serotec)
Creus et al. (2000)	Ja	Ja	< 3 follikels 14 mm	NVT	ELISA (Serotec)
Fabregues et al. (2000)	Ja	Ja	< 3 follikels 14 mm	NVT	Immunoenzymometrisch (Medgenix)
Penarrubia et al. (2000)	Ja	Ja	< 3 follikels 14 mm	NVT	Immunoenzymometrisch (Bayer)
Bancsi et al. (2002)	Ja	Ja	< 4 oocyten of < 3 follikels 18 mm	Bezig	ELISA (Serotec)
Ficicioglu et al. (2003)	Nee	Ja	< 5 oocyten	NVT	ELISA (Serotec)
Erdem et al. (2004)	Ja	Nee	< 5 oocyten of < 3 follikels	NVT	ELISA (Serotec)

ZS: Zwangerschap

**Tabel 9:** Performantiekarakteristieken van inhibine B voor de predictie van zwakke respons bij IVF patiënten en shift van pre-test naar post-test probabiliteit van zwakke respons bij patiënten met een abnormaal inhibine B resultaat (6).

Referentie	Cycli (N)	Inhibine B dempel pg/mL	Predictie zwakke R				Probabiliteit	
			Sens.	Spec.	+LR	DOR	Pre-Inh B	Post-Inh B
Ballasch et al. (1996)	120	Logistiek model	0,52	0,80	2,6	4,4	33	57
Seifer et al. (1997)	178	< 45	0,53	0,79	2,6	4,3	8	19
Creus et al. (2000)	120	Logistiek model	0,70	0,63	1,9	3,9	33	48
Fabregues et al. (2000)	80	Logistiek model	0,32	0,83	1,9	2,3	35	50
Penarrubia et al. (2000)	80	Logistiek model	0,89	0,29	1,3	3,6	25	30
Bancsi et al. (2002)	120	< 45 < 53,8	0,33 0,39	0,95 0,94	6,9	10 10,1	30 30	75
Ficicoglu et al. (2003)	58	< 56	0,81	0,81	6,5 4,4	18	43	74 77
Erdem et al. (2004)	32	Logistiek model	0,69	0,63	1,8	3,7	50	65

Deze studie heeft een opmerkelijk betere accuraatheid. Deze studie was van goede kwaliteit, maar omvat slechts een klein aantal patiënten (N = 58).

**Tabel 10:** Voorgestelde cut-offs van serum AMH voor de classificatie van de respons voor ART (92).

Serum AMH (pmol/L)	Gevolg/type responder
< 1	Cyclus afbreken (~ 80%)
1-5	41% 'non of poor responders' ( $\leq 2$ oocyten)
5-15	Normale responders
15-25	Risico op 'excessive response' ( $\geq 21$ oocyten) 77,8% correct geïdentificeerd
	<i>Sens.</i> <i>Spec.</i> +LR                      -LR
	88%                              76,9%                      3,8                      0,15
> 25	Risico op 'excessive response' ( $\geq 21$ oocyten) 92,2% correct geïdentificeerd
	<i>Sens.</i> <i>Spec.</i> +LR                      -LR
	60%                              94,9%                      11,8                      0,42

= grote overlap tussen deze groepen

**Tabel 11:** AMH voor de predictie van niet-zwangerschap bij COH (5).

Referentie	N	Drempelwaarde	Predictie van niet-zwangerschap					
			Sens. %	Spec. %	LR +	Pretest prob. (%)	Posttest prob. (%)	Proportie met Abnormal test (%)
Van Rooij et al. (2002)	106	0,1 µg/l	0,22	0,89	2,0	75	85	19
		0,2 µg/l	0,27	0,85	1,8	75	84	24
		0,3 µg/l	0,28	0,81	1,5	75	81	25
Penarrubia et al. (2005)	80	/	0,62	0,55	1,4	66	73	56
Eldar-Geva et al. (2005)	56	18 pmol/l	0,67	0,69	2,2	54	71	50
Ebner et al. (2006)	132	1,66 ng/ml	0,19	0,69	0,6	51	39	25
Smeenk et al. (2007)	80	1,4 µg/l	0,38	0,73	1,4	50	58	33
Kwee et al. (2007)	104	1,4 µg/l	0,34	0,79	1,6	77	84	31

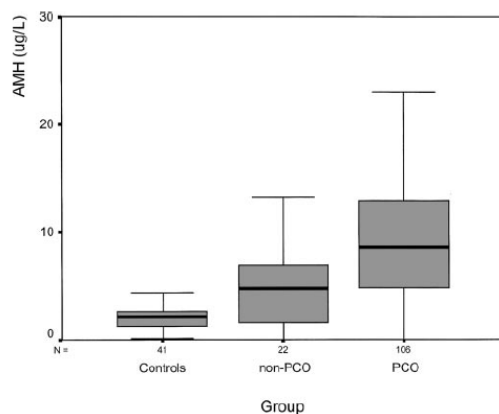
**Tabel 12:** Performantiekarakteristieken van AMH voor de predictie van niet-zwangerschap bij IVF patiënten en de shift van pre-test naar post-test probabiliteit van niet-zwangerschap bij patiënten met een abnormaal AMH resultaat (6).

Auteur	Cycli (N)	AMH dempel ng/mL	Predictie niet-zwanger				Probabiliteit	
			Sens.	Spec.	+LR	DOR	Pre-AMH	Post-AMH
Van Rooij et al. (2002)	119	< 0,1	0,22	0,89	1,9	2,2	75	85
		< 0,2	0,27	0,85	1,8	2,1	75	84
		< 0,3	0,28	0,81	1,5	1,7	75	81

**Tabel 13:** Performantiekarakteristieken van inhibine B voor de predictie van niet-zwangerschap bij IVF patiënten en de shift van pre-test naar post-test probabiliteit van niet-zwangerschap bij patiënten met een abnormaal inhibine B resultaat (6).

Auteur	Cycli (N)	Inhibine B dempel pg/mL	Predictie niet-zwanger				Probabiliteit	
			Sens.	Spec.	+LR	DOR	Pre-inh B	Post-Inh B
Seifer et al. (1997)	178	< 45	<b>0,28</b>	<b>0,92</b>	3,5	4,5	79	93
Hall et al. (1999)	111	< 53,8	0,23	0,74	0,9	0,8	39	36
		< 76,5	0,60	0,56	1,4	1,9	39	46
		< 105,3	0,77	0,25	1,0	1,1	39	39
Bancsi et al. (2003)	120	< 45	0,17	1,00	5,2	6,1	78	94
		< 53,8	0,19	0,96	5,2	6,2	78	95





**Figuur 10:** Serum AMH zijn gestegen in normogonadotrofe anovulatoire onvruchtbare vrouwen met PCOS en patiënten zonder PCOS (non-PCO). Deze worden vergeleken met normoovulatoire controles (97).

**Tabel 14:** Performantie van AMH bij de diagnose van PCOS.

Referentie	Populatie	Type assay	Cut-off.*	Sens.	Spec.
Pigny (2006)	73 PCOS	ELISA Immunotech-Coulter	7	80%	80%
			8,4	67%	92%
			9,8	56%	98%
Chu (2005)	46 PCOS	ELISA Immunotech-Coulter	10	20%	
Jonard (2003)	214 PCOS	US	12**	75%	99%

\* Cut-off uitgedrukt in ng/ml.

\*\* Cut-off uitgedrukt in FNPO (follikel aantal per ovarium). Deze cut-off is opgenomen in de Rotterdam criteria.

**Tabel 15:** Sensitiviteiten van inhibine bepaling bij de diagnose van GCT.

Referentie	Populatie	Type assay	Cut-off	Sens.	Spec.
Healy (1993)	3 AGCT	RIA Totaal inhibine	122 U/L	100%	
Jobling (1994)	27 GCT	RIA Totaal inhibine	122 U/L	100%	
Petraglia (1998)	13 AGCT	ELISA Inh A ELISA Inh B	<i>Inh A:</i> 8,7 ± 1,7 pg/ml <i>Inh B:</i> 5,3 ± 0,9 pg/ml	71% 88,8%	
Robertson (1999a)	11 AGCT	RIA ELISA Inh A ELISA Inh B Pro-αC ELISA	122 U/L 13,1 ng/l 30 ng/l 92,4 ng/l	100% 77% 100% 90%	
Robertson (1999b)	11 AGCT	RIA IFMA (αC subunit)	122 U/L 154 ng/l	100% 100%	
Mom (2007)	30 GCT	ELISA Inh A ELISA Inh B	<i>Inh A:</i> Pre: 150 ng/l Post: ≤ 5 ng/l <i>Inh B:</i> Pre: 200 ng/l Post: ≤ 15 ng/l	67% 89%	100% 100%

Inh A: Inhibine A  
Inh B: Inhibine B

Pre: premenopauzaal  
Post: postmenopauzaal

**Tabel 16:** Sensitiviteiten van AMH bepaling bij de diagnose van GCT.

Referentie	Populatie	Type assay	Cut-off	Sens.	Overige
Gustafson (1992)	4 GCT	Traditioneel ELISA	/	100%	
Rey (1996)	9 AGCT	Traditioneel ELISA	5 µg/l	88,8%	Spec: 91%
Petraglia (1998)	12 AGCT	Traditioneel ELISA	2,76 ± 0,80 ng/ml	91%	
Lane (1999)	8 JGCT 9 AGCT	Traditioneel ELISA	> hoogste waarde van controles per leeftijdsgroep	75% 78%	
Long (2000)	31 GCT 24 na BO en R 15 recurrente GCT	Ultrasensitieve ELISA	<i>Prepuberaal:</i> 22,8 ± 19,6 pmol/l <i>Volwassen:</i> 13,7 ± 18,8 pmol/l	93%	Spec: 96% NPV: 96% PPV: 93%

AGCT: adult granulasaceltumor      BO: bilaterale ovariectomie  
JGCT: juveniele granulosaceltumor      R: remissie

**Tabel 17:** De referentiewaarden van inhibine B (VUB, Jette), zoals momenteel gehanteerd/gerapporteerd in UZ Leuven.

Geslacht	Leeftijd (jaar)	Waarde	Eenheid	Commentaar
M	0 - 1	68 - 630	ng/L	
V	0 - 6	≤ 73	ng/L	
M	1 - 2	87- 419	ng/L	
M	2 - 6	42 -268	ng/L	
M	6 - 18		ng/L	Tanner stadium I: 35 - 182 II: 62 - 338 III: 78 - 323 IV: 67 - 304 V: 95 - 323
V	6 - 18		ng/L	Tanner stadium I: < 20 - 100 II: < 20 - 240 III: 28 - 227 IV: < 20 - 205 V: < 20 - 177
M	≥ 18	105 - 439	ng/L	
V	≥ 18		ng/L	normale cyclus: 5 - 200 gestimuleerde cyclus: < 3000 post-menopauze: < 5

Tabel 19: Normale AMH waarden (11).

	Age				
	0-1 month	1-24 months	2-6 years	6-12 years	12-18 years
<b>(A) Males</b>					
N	68	145	33	48	38
Mean MIS (ng/ml)	22.6	84.0	63.8	43.0	5.9
S.E.M.	1.9	6.2	10.1	5.7	0.9
Range	3.2-68.5	6.4-461	7.0-305	0.8-165	0.5-22.5
Percentiles					
1st	4.3	12.0	8.0	2.6	0.5
2.5th	5.1	14.4	9.4	4.9	0.5
5th	5.6	18.6	11.7	6.4	0.5
50th	17.3	58.0	45.0	31.5	4.6
<b>(B) Females</b>					
N	32	40	26	46	52
Mean MIS (ng/ml)	0.6	0.9	1.4	2.7	3.9
S.E.M.	0.1	0.2	0.2	0.3	0.7
Range	0.5-2.5	0.5-4.7	0.5-4.2	0.5-9.3	0.5-4.0
Percentiles					
50th	0.5	0.2	1.2	2.2	2.4
95th	1.1	2.8	3.4	6.0	8.8
97.5th	1.5	3.2	3.9	6.6	13.2