

# Procesy starzenia się komórki jajowej a niepłodność

## Ovarian aging and infertility

Monika Szafarowska, Małgorzata Jerzak,

Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska

### Streszczenie

Kluczowym elementem warunkującym prawidłowy rozród pozostaje stan biologiczny komórki jajowej. Spadek liczby oocytów związany ze starzeniem, a także zaburzenia neuroendokrynej funkcji jajnika oraz zmiany w macicy przyczyniają się do ograniczenia płodności. Zmniejszaniu liczby pęcherzyków jajnikowych towarzyszy znaczne obniżenie ich jakości, obejmujące zwłaszcza nieprawidłowości jądra komórkowego (rozproszona chromatyna, dekondensacja chromosomów oraz zaburzenia związane z wrzecionem podziałowym). Konsekwencją tego są następnie niepowodzenia rozrodu wynikające z nieprawidłowości gametogenezy, procesu zapłodnienia, wczesnego rozwoju zarodka oraz nieprawidłowej implantacji.

Praca ta opisuje związane z wiekiem mechanizmy biochemiczne warunkujące zmiany molekularne zachodzące pod wpływem nieprawidłowego mikrośrodowiska jajnika, których kumulacja prowadzi do starzenia się oraz do przyspieszonego wejścia oocyty na drogę apoptozy. Istnieje wiele teorii wskazujących na przyczyny uszkodzenia oocytów: nieprawidłowe unaczynienie, stres oksydacyjny i zaburzenia równowagi wolnych rodników, wpływ związków toksycznych oraz zmiany na poziomie genetycznym.

Zmniejszony przepływ krwi w mikrośrodowisku dojrzewającej komórki jajowej prowadzi do hipoksji, a w efekcie do rozwoju ciągu reakcji stresu oksydacyjnego. Konsekwencją zaburzenia równowagi oksydacyjnej są nieprawidłowości biomolekuł komórkowych. Ponadto sugeruje się, że zachodzące w komórkach procesy glikacji prowadzące do powstania związków nazywanych ogólnie AGEs (ang. Advanced Glycation End Products), także są odpowiedzialne za starzenie się komórek. Przyczyniają się bezpośrednio do uszkodzenia białek, indukują ciąg reakcji stresu oksydacyjnego oraz nasilają reakcje zapalne. Ostatnio szczególną uwagę zwraca się na rolę mitochondriów i telomerów w procesie starzenia i utraty funkcji reprodukcyjnych.

W pracy tej podkreślono ponadto wartość prognostyczną stosowanych w praktyce klinicznej markerów oceniających rezerwę jajnikową. Przedstawiono rolę hormonu antymüllerowskiego, hormonu folikulotropowego, estradiolu, inhibiny B oraz rolę oceny liczby pęcherzyków antralnych.

Słowa kluczowe: **niepłodność / starzenie jajników / apoptoza / stres oksydacyjny / VEGF / telomery /**

### Adres do korespondencji:

Monika Szafarowska  
Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej, Wojskowy Instytut Medyczny  
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa, Polska  
tel: 022 68 17 530; Fax: 022 810 11 75  
e-mail: monika.szafarowska@wp.pl

Otrzymano: 26.04.2012  
Zaakceptowano do druku: 15.03.2013

Monika Szafarowska, Małgorzata Jerzak. *Procesy starzenia się komórki jajowej a niepłodność.***Abstract**

*The biological state of the ovum remains the key element in normal reproduction. Age-related decrease in the number of oocytes, as well as disturbed neuroendocrine function of the ovary and lesions in the uterus, contribute to reduced fertility. Decreasing number of ovarian follicles is accompanied by reduction of their quality, including mainly abnormalities of the nucleus (dispersed chromatin, decondensation of chromosomes and abnormalities connected with the spindle apparatus). This results in failed reproduction due to abnormal gametogenesis, fertilization process, early development of the embryo and abnormal implantation.*

*This work describes age-related biochemical mechanisms conditioning molecular changes occurring due to abnormal microenvironment of the ovary; their accumulation leads to aging and to a more rapid apoptosis of the oocyte. There are many theories explaining the causes of oocyte destruction, including abnormal vascularization, oxidative stress, imbalance of free radicals, influence of toxic compounds and genetic changes.*

*Decreased blood perfusion in the microenvironment of a maturing ovum leads to hypoxia and thus to a chain of reactions of oxidative stress. Oxidative imbalance leads to abnormalities of cellular biomolecules. Moreover, it is suggested that glycation processes in a cell, leading to the formation of compounds called AGEs (Advanced Glycation End Products), are also responsible for aging of the cells. They contribute directly to protein damage, induce a chain of reactions of oxidative stress, and increase the inflammatory reactions. Recently, the role of mitochondria and telomeres in the aging process and loss of reproductive functions has been especially underscored.*

*Moreover, this work stresses the prognostic value of clinically used markers evaluating the ovarian reserve. The role of Anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol, inhibin B and antral follicle count (AFC) was presented in this paper.*

Key words: **infertility / ovary aging / apoptosis / oxidative stress / VEGF / telomeres /**

**Wstęp**

Problem niepłodności dotyczy 10-15% małżeństw (tj. ok. 1,3 mln par) w Polsce i w około 20-25% ma niewyjaśnioną przyczynę [1]. Maksymalna płodność kobiety przypada około 20r.ż., już po 25r.ż. zaczyna się zmniejszać, ulegając znacznemu ograniczeniu po 37r.ż.. Wraz z wiekiem dochodzi do zmniejszenia się ilości komórek jajowych. W życiu płodowym występuje około 6-7 mln pęcherzyków primordialnych, jednak ze względu na szybkie wejście w procesy apoptozy przy urodzeniu pozostaje ich tylko ok. 1-2mln. W momencie wystąpienia pierwszej miesiączki w jajniku obserwuje się ok. 300-400 tys. pęcherzyków, a każdy cykl miesięczkowy wiąże się z utratą ok. 1000 pęcherzyków. W okresie okołomenopauzalnym ilość pozostałych pęcherzyków obniża się do niespełna 1000 [2]. Utrata komórek jajowych jest związana z ich starzeniem się i eliminacją drogą apoptozy [3]. Zaobserwowano, że indeks apoptoptyczny jest znacznie wyższy w starzejących się komórkach a oocyt starzeje się szybciej niż inne komórki organizmu człowieka [4, 5]. W celu potwierdzenia znacznej utraty komórek jajowych ocenia się parametry rezerwy jajnikowej, takie jak: stężenie hormonu anti-Müllerowskiego (ang. *Anti-Müllerian Hormone* - AMH) czy hormonu folikulo-tropowego (ang. *Follicle-Stimulating Hormone* - FSH).

Wynikające z wieku kobiety zaburzenia neuroendokrynej funkcji jajnika, zmiany w macicy oraz spadek ilości oocytów przyczyniają się do ograniczenia płodności, jednakże kluczowym elementem pozostaje stan biologiczny oocytu [6]. Zmniejszaniu ilości pęcherzyków towarzyszy znaczne obniżenie ich jakości, obejmujące zwłaszcza nieprawidłowości jądra komórkowego. Narastające zaburzenia chromosomalne prowadzą do powstawania aneuploidii w zarodkach uniemożliwiając prawidłowy rozwój ciąży. Rola jakości oocytów potwierdza fakt uzyskania wyższego wskaźnika ciąż w metodach rozrodu wspomaganego, gdzie do zapłodnienia użyto oocyty pobrane od młodych kobiet [7].

Dojrzewanie oocytów, prawidłowa segregacja chromosomów, zapłodnienie, wczesny rozwój zarodka oraz implantacja zależne są od dostarczenia dużej ilości energii, której źródłem są mitochondria. W starzejących się oocytach zaobserwowano zmniejszoną zawartość ATP, co jest konsekwencją narastających nieprawidłowości mitochondriów, do których dochodzi pod wpływem toksycznego mikrośrodowiska [8]. Zmniejszone stężenie wewnątrzkomórkowego ATP koreluje z nieprawidłowościami jądra oocytu – zwłaszcza z uszkodzeniem wrzeciona podziałowego [9]. Transfer prawidłowych mitochondriów do starzejącej się komórki warunkuje jej prawidłowy rozwój, wyższy wskaźnik zapłodnień oraz prawidłowy rozwój zarodków [10].

**Zmiany na poziomie molekularnym**

Starzenie się oocytów jest związane przede wszystkim z znacznym obniżeniem ich jakości oraz przyśpieszonym obumieraniem w mechanizmie apoptozy. Wpływ na stan biologiczny oocytu wydaje się mieć mikrośrodowisko, w jakim się znajduje: płyn pęcherzykowy oraz sąsiedztwo komórek somatycznych dających sygnał do wejścia oocytu na drogę starzenia się, a następnie apoptozy [11].

Jak dotąd nie znaleziono pojedynczego biomarkera identyfikującego starzejącą się komórkę, jednak istnieje szereg cech, których współwystępowanie jest bardzo charakterystyczne. Zmiany molekularne związane ze starzeniem zaobserwowano nie tylko w oocycie, ale także w otaczających go komórkach ziarnistych. Komórki ziarniste kobiet o zaburzonej płodności są mniej liczne, zawierają uszkodzone mitochondria, liczne nieprawidłowości w mitochondrialnym DNA, mają ograniczoną zdolność produkcji hormonów oraz zmniejszoną ekspresję enzymów antyoksydacyjnych. Zmiany w mitochondriach obserwowane w komórkach ziarnistych są tożsame ze zmianami w przebiegu hipoksji. Niepowodzenia rozrodu wynikają jednak przede wszystkim z obniżonej jakości oocytu [12].

Najważniejsze nieprawidłowości dotyczą chromosomów w jądrze komórkowym (dekondensacja chromosomów, rozproszona chromatyna oraz zaburzenia związane z wrzecionem podziałowym) i są one przyczyną powstawania aneuploidii [13, 14]. W starzejącym się oocyście zaobserwowano ponadto mleczną, ciemną cytoplazmę oraz rozfragmentowane organelle komórkowe otoczone osłonką przejrzystą [15]. Zmiany w mitochondriach dotyczą nieprawidłowości morfologicznych, genetycznych i czynnościowych. Obecne są liczne mutacje w mitochondrialnym DNA oraz obniżony potencjał elektryczny wewnętrznej błony mitochondrialnej. Zaburzona jest aktywność mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów w łańcuchu oddechowym.

Mitochondria pełnią niezwykle ważną rolę w metabolizmie energetycznym, homeostazie oraz śmierci komórki. To właśnie jakość mitochondriów, ich stan metaboliczny i biologiczny odpowiada za jakość oocytów, a w konsekwencji za proces zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodka [16]. W badaniach doświadczalnych zaobserwowano, że uszkodzenie mitochondriów w pierwotnie zdrowych, młodych oocytach prowadzi do zahamowania procesów podziału pęcherzyka terminalnego, tworzenia wrzeciona podziałowego oraz segregacji chromosomów [17].

W starzejących się oocytach zaobserwowano także nieprawidłową syntezę białek związanych z funkcją mitochondriów, stresem oksydacyjnym oraz zaburzenia ekspresji genów regulujących cykl komórkowy, strukturę cytoszkieletu oraz szlaki energetyczne.

## Przyczyny starzenia się komórki jajowej

Uszkodzenie struktur komórki jajowej następuje najprawdopodobniej pod wpływem toksycznego mikrośrodowiska działającego na pęcherzyk w stadium primordialnym, a także w czasie dojrzewania oocytu. Istnieje wiele teorii wskazujących na przyczyny uszkodzenia: nieprawidłowe unaczynienie, stres oksydacyjny i zaburzenia równowagi wolnych rodników, wpływ związków toksycznych oraz zmiany na poziomie genetycznym.

## Rola unaczynienia

Prawidłowe unaczynienie pęcherzyków primordialnych jak i dojrzewających oocytów dostarcza odpowiednią ilość tlenu oraz czynników sygnałowych [18]. Zaobserwowano, że z wiekiem przepływ krwi wokół pęcherzyka dominującego ulega znacznemu ograniczeniu, zwłaszcza w późnej fazie folikularnej [19]. Uważa się, że skąpe unaczynienie mikrośrodowiska (naczynia podścieliska) przyczynia się również do przyspieszonego zmniejszania ilości oocytów [20].

Zmniejszony przepływ krwi w mikrośrodowisku dojrzewającej komórki jajowej prowadzi do hipoksji, a w efekcie do rozwoju reakcji stresu oksydacyjnego. Ponadto hipoksja odpowiada za zaburzone wnikanie kapilar do warstwy tekalnej, pogłębiając nieprawidłowe ukrwienie dojrzewającego pęcherzyka. Wykładnikiem próby adaptacji komórki do hipoksji jest wzrost stężenia VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) [21]. VEGF syntetyzowany w jajniku m.in. przez komórki ziarniste i tekalne odpowiada za właściwą angiogenezę. Zaobserwowano wzrost stężenia VEGF w płynie pęcherzykowym kobiet w starszym wieku [22, 23]. Wyniki badań wskazują, że zmniejszony przepływ krwi nie w pełni zapewnia dojrzewającym oocytom niezbędne substancje odżywcze i regulatorowe.

## Stres oksydacyjny

Najlepiej poznaną biologiczną reakcją związaną ze starzeniem się komórek jest stres oksydacyjny [24]. Stres oksydacyjny można określić jako zaburzenie równowagi między nasileniem procesów oksydacyjnych, które indukują powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*), a przeciwdziałającym systemem obronnym – antyoksydacyjnym [25].

Podczas procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach dochodzi do wytwarzania wolnych rodników. Jednakże w prawidłowych warunkach procesy te znajdują się pod ścisłą kontrolą, w wyniku działania enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych [26]. Zaobserwowano, że wolne rodniki pośredniczą w istotnych dla komórki funkcjach, takich jak: przenoszenie sygnału, wzrost, proliferacja, różnicowanie czy apoptoza [27]. Odgrywają one także rolę w fizjologicznie zachodzących procesach dojrzewania oocytów, w steroidogenezie, warunkują prawidłową funkcję ciała żółtego oraz procesów zapłodnienia, wczesnego rozwoju zarodka oraz ciąży [28]. W celu utrzymania równowagi, organizmy mające kontakt ze środowiskiem zawierającym tlen wytworzyły różne mechanizmy obronne chroniące ich integralność przed działaniem wolnych rodników [25]. Stan równowagi komórkowej utrzymywany jest przez enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza nadtlenkowa, katalaza, transferaza S-glutationowa oraz inne substancje, jak np. glutation czy witaminy E, C i A. Związki te umożliwiają usuwanie nadmiaru wolnych rodników tlenowych z komórek.

## Zaburzenia równowagi wolnych rodników

Zakłada się, że głównym mechanizmem starzenia się komórki jest kumulacja uszkodzeń powstałych w trakcie procesów metabolicznych zachodzących w ciągu życia. Wiele badań sugeruje, że zarówno primordialne, jak i dojrzewające pęcherzyki są narażone na uszkodzenia związane ze spadkiem aktywności enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej wynikającej z wieku. Do zaburzenia równowagi i kumulacji wolnych rodników dochodzi pod wpływem hipoksji, hiperoksji, czynników chorobotwórczych oraz oddziaływań zewnętrznych [21].

Zaburzenie równowagi oksydacyjnej prowadzi do nieprawidłowości biomolekuł komórkowych [24]. Wolne rodniki w warunkach *in vitro* wywołują chemiczne modyfikacje oraz uszkadzają białka (agregacja i denaturacja), lipidy (peroksydacja), węglowodany oraz indukują zmiany w strukturze DNA prowadzące do mutacji [26, 29]. Toksyczne produkty reakcji utleniania działają cytostatycznie na komórkę, uszkadzając błony komórkowe oraz prowadzą do śmierci poprzez uwolnienie czynników prowadzących do apoptozy [30].

Wydaje się, że zaburzona równowaga oksydacyjna ma negatywny związek ze wszystkimi etapami reprodukcji (gametogeneza, owulacja, zapłodnienie, wczesny rozwój zarodkowy oraz implantacja), czym przyczynia się do rozwoju patologii prowadzących do niepłodności kobiecej i męskiej [28]. Wyniki badań sugerują, że zwiększone stężenie wolnych rodników w płynie pęcherzykowym prowadzi do obniżenia zdolności zapładniającej oocytu i jest związane z przyspieszonym procesem starzenia jajnika [31, 32]. Ponadto zwiększona aktywność wolnych rodników koreluje z gorszymi wynikami zapłodnienia pozaustrojowego. Zaobserwowano także obniżoną aktywność systemu obronnego równowagi oksydacyjnej w płynie pęcherzykowym starszych kobiet, głównie zmniejszenie stężenia enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, transferazy glutationowej) [33].

### Zmiany ekspresji genów w procesie starzenia

Środowisko stresu oksydacyjnego prowadzi do zaburzeń metabolizmu oraz zmian ekspresji genów i białek. Zmiany ekspresji genów dotyczą zwłaszcza mitochondrialnego DNA, które ze względu na brak ochronnego działania histonów jest bardziej narażone na uszkodzenia, a długotrwała ekspozycja na wolne rodniki powoduje akumulację mutacji. Uważa się, że wzrost ekspresji genów i aktywności szlaków sygnałowych związanych z funkcją ochronną jest odpowiedzią komórki na procesy starzenia [35]. Zaobserwowano zróżnicowaną ekspresję genów związanych z regulacją cyklu komórkowego, strukturą cytoszkieletu, szlakami energetycznymi oraz z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny. W starzejących się komórkach obserwuje się także nadekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną (np. regulujących aktywność dopełniacza) i z zapaleniem, z funkcją lizosomów, a także z procesem apoptozy, natomiast obniżoną ekspresję genów związanych z metabolizmem energetycznym komórki i funkcją mitochondriów [35]. Identyfikacja biomarkerów (geny, enzymy szlaków przekazywania sygnałów) jest przedmiotem licznych badań, które mają przybliżyć mechanizmy starzenia się komórki. Dotychczasowe wyniki tych badań są jednak niejednoznaczne.

Liczne badania potwierdziły, że restrykcyjna dieta (ograniczenie kaloryczne, eliminacja poszczególnych aminokwasów) wydłuża życie i oddala w czasie procesy starzenia [36]. Mechanizm tego zjawiska jest nadal niejasny i wymaga dalszych wnikliwych badań. Jednakże podczas stosowania diety zauważono pewne zmiany w komórkach dotyczące ekspresji genów m.in. nadekspresję genów regulujących równowagę oksydacyjną, proliferację komórkową, odpowiedź przeciwzapalną (geny supresorowe wpływające na NF- $\kappa$ B); natomiast zmniejszoną ekspresję genów odpowiedzialnych za reakcję zapalną [37]. Niskokaloryczna dieta poprawia także metabolizm lipidów, który wpływa na prawidłowy przebieg cyklu komórkowego oraz proliferację [38]. Ponadto mitochondria w odpowiedzi na dietę reagują wzrostem ekspresji genów związanych z oddychaniem komórkowym oraz z transportem jonów metali ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) co pozwala na zachowanie równowagi komórkowej [39].

### Udział telomerów w starzeniu oocyty

Na podstawie licznych badań wysunięto teorię, że za zaburzenia mejozy w starzejących się oocytach mogą odpowiadać skrócone telomery. Telomery są powtarzającą się sekwencją TTAGGG, która tworzy ochronną „czapkę” na końcach chromosomów zapobiegając ich skracaniu się oraz fuzji [40, 41]. Do skracania telomerów dochodzi podczas każdego podziału komórki, a obecność wolnych rodników w mikrośrodku znacznie przyspiesza ten proces [42, 43]. Nieprawidłowe mikrośrodko, obecność wolnych rodników podczas wydłużonej profazy jest najprawdopodobniej przyczyną skrócenia telomerów w oocytach [44, 45]. Krytyczne skrócenie telomerów powoduje zatrzymanie podziałów komórkowych, niestabilność genetyczną oraz wyzwala proces apoptozy [46]. Natomiast telomeraza jest odwrotną transkryptazą, która zapobiega skracaniu się telomerów w komórkach rozrodczych, macierzystych oraz nowotworowych. Jednak jej stężenie w oocytach pozostaje na bardzo niskim poziomie. Eksperymentalne genetyczne lub farmakologiczne skrócenie telomerów w oocytach mysich odzwierciedla typowy fenotyp starzejącego się oocytu (zaburzenia wrzeciona podziałowego, niestabilność chromosomalna, zahamowa-

ny rozwój, nieprawidłowości w zarodkach) [47]. Prawidłowa długość telomerów w oocytach kobiet poddanych procedurom zapłodnienia pozaustrojowego wykazuje istotną pozytywną korelację z rozwojem ciąży [48]. Zmniejszona długość telomerów w oocycie jest uznawanym biomarkerem niepowodzeń rozrodu wśród niepłodnych kobiet poddawanych procedurom zapłodnienia pozaustrojowego.

### Końcowe produkty zaawansowanej glikacji – AGEs (ang. *Advanced Glycation End Products*)

Procesy glikacji zachodzące w komórkach prowadzą do powstania związków nazywanych ogólnie AGEs, które także są odpowiedzialne za procesy starzenia się komórek [49, 50]. Przyczyniają się bezpośrednio do uszkodzenia białek poprzez tworzenie wiązań krzyżowych, oraz pośrednio przez łączenie się ze specyficznymi receptorami (RAGE - *receptors for advanced glycation end products*), które występują w komórkach ziarnistych, warstwie tekalnej wewnętrznej, komórkach zrębu i śródbłonka naczyniowego jajnika [51]. Interakcja AGEs z receptorami RAGE silnie indukuje stres oksydacyjny oraz aktywuje syntezę NF- $\kappa$ B nasilając reakcje zapalne [51]. Najbardziej wrażliwym białkiem na działanie AGEs jest kolagen. Zaburzona struktura kolagenu, a w konsekwencji nieprawidłowa budowa naczyń, mogą prowadzić do zaburzeń ukrwienia w jajniku. Zaobserwowano, że podwyższone stężenie AGEs w surowicy koreluje z upośledzonym dojrzewaniem oocytów oraz nieprawidłowym rozwojem zarodka, a w konsekwencji zmniejszonym odsetkiem uzyskanych ciąż [52].

### Markery procesu starzenia się jajnika

Procesy patofizjologiczne, które prowadzą do uszkodzenia komórek jajowych przyczyniają się do przyspieszonego zmniejszenia rezerwy jajnikowej. W praktyce klinicznej ocena rezerwy jajnikowej jest niezwykle istotna przy wyborze odpowiedniej metody leczenia, pozwalającej na uzyskanie jak najlepszych efektów przy zminimalizowanym ryzyku działań niepożądanych oraz przy zminimalizowaniu kosztów leczenia.

### Hormon antymüllerowski – AMH (ang. *Anti-Müllerian Hormone*)

Wiele badań i obserwacji przeprowadzono oceniając rolę hormonu antymüllerowskiego, jako biomarkera odzwierciedlającego potencjał rozrodczy kobiety [53]. AMH jest glikoproteiną należącą do rodziny transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ , ang. *transforming growth factor  $\beta$* ), o masie cząsteczkowej 140kD [54]. Gen kodujący AMH znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 19, a efekt działania zależy od obecności na komórkach docelowych receptorów dla AMH (receptor typu I dla AMH-AMHRI, receptor typu II dla AMH-AMHRII) [55]. AMH jest produkowany u kobiet przez komórki ziarniste wzrastających pęcherzyków primordialnych (preantralnych i wczesnych antralnych) [56]. Fizjologiczna rola AMH nie jest w pełni poznana. W okresie rozrodczym kobiety czynnik ten hamuje rekrutację pęcherzyków primordialnych oraz zmniejsza odpowiedź pęcherzyków wzrastających na FSH, tym samym uczestnicząc w selekcji pęcherzyka dominującego [59]. Stężenie AMH w surowicy wzrasta z wiekiem osiągając maksimum między 21-30r.ż., następnie ulega stopniowemu zmniejszeniu. Odzwierciedla ono wielkość puli wzrastających pęcherzyków primordialnych, co pozwala uznać AMH za bardzo czuły marker rezerwy jajnikowej

oraz wczesnej fazy procesów starzenia jajnika [57, 58]. Niewykrywalne lub bardzo niskie stężenie AMH świadczy o wyczerpaniu rezerwy jajnikowej i jest czynnikiem prognostycznym wystąpienia menopauzy w ciągu około 5 lat [60].

Sugerowano, że AMH jest jednym z najlepszych spośród dostępnych czynników prognostycznych płodności i starzenia jajnika [61]. Jednak badania pokazują, że odzwierciedla jedynie mniejszą pulę pęcherzyków, natomiast nie koreluje z ich jakością [62]. Nie zaobserwowano także związku stężenia AMH ze zdolnością do uzyskania ciąży przy zastosowaniu metod rozrodu wspomaganego [61]. Istnieją jednak doniesienia o istniejącej korelacji pomiędzy stężeniem AMH (>2,7ng/ml) a zwiększonym odsetkiem implantacji i uzyskanych ciąż [63]. Hormon antymüllerowski jest uważany za czynnik prognostyczny odpowiedzi jajników na stymulację hormonalną w procesach rozrodu wspomaganego [64]. Pozwala także przewidzieć wystąpienie zespołu hiperstymulacji jajników (OHSS – *ovarian hyperstimulation syndrome*), jako poważnego powikłania indukcji owulacji [64].

AMH jest czynnikiem prognostycznym aktywności jajników po chemioterapii [64]. Znalazł także zastosowanie jako marker przy podejmowaniu decyzji o kwalifikacji do procedur zachowania płodności w przypadku leczenia chorób nowotworowych [65]. Hirokawa i wsp. rekomendują także zastosowanie AMH w celu prognozowania płodności po operacjach chirurgicznych na przydatkach, jednak wartość prognostyczna nie została potwierdzona w innych badaniach [66]. Ostatnie badania pokazały, że stężenie AMH u kobiet z zespołem policystycznych jajników jest wyższe w stosunku do pozostałych kobiet [67].

### **Hormon folikulotropowy – FSH** **(ang. *Follicle-Stimulating Hormone*)**

FSH jest glikoproteiną wydzielaną przez przedni płat przysadki mózgowej. U kobiet pobudza dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych oraz wydzielanie estrogenów przez komórki ziarniste jajnika. Oznaczenie FSH we wczesnej fazie folikularnej w wielu ośrodkach służy do oceny rezerwy jajnikowej oraz jest wykorzystywane jako czynnik prognostyczny odpowiedzi jajników na stymulację owulacji oraz uzyskanie ciąży. Wyniki badań sugerują jednak, że stężenie FSH oznaczone w 3 dniu cyklu nie ma wartości prognostycznej w przewidywaniu ciąży u kobiet dobrze odpowiadających na stymulację [68]. Także Bancsi i wsp. w swoim badaniu zauważa, że stężenie FSH jest bezużytecznym markerem w przewidywaniu wyników IVF [69]. Natomiast van der Steeg wskazuje na mniejszą szansę na naturalne zajście w ciążę kobiet, u których wartość stężenia FSH przekracza 8 IU/l [63, 70].

Stężenie FSH koreluje z odpowiedzią jajników na stymulację owulacji, co znalazło potwierdzenie w licznych badaniach [71]. Podwyższone wartości stężenia FSH we wczesnej fazie folikularnej zaobserwowano u kobiet słabo odpowiadających na stymulację owulacji [72]. Badanie Eldar-Geva wskazuje na wartość FSH-8,3IU/l powyżej której odpowiedź jajników pozostaje na bardzo niskim poziomie [73]. Ashrafi uzyskał korelację pomiędzy FSH>15 IU/l a mniejszą liczbą uzyskanych pęcherzyków jajnikowych [63, 74]. Zastosowanie oznaczenia stężenia FSH w celu oceny rezerwy jajnikowej wydaje się mieć największe znaczenie w grupie niepłodnych kobiet z bezowulacyjnymi cyklami, endometriozą oraz wśród kobiet poniżej 35 roku życia [65].

### **Estradiol**

Próby zastosowania oznaczeń stężenia estradiolu jako czynnika prognostycznego odpowiedzi jajników na stymulację owulacji oraz szansę na uzyskanie ciąży nie przyniosły satysfakcjonujących wyników. Wśród kobiet z prawidłowym stężeniem FSH ocena stężenia estradiolu nie ma żadnej wartości prognostycznej powodzeń rozrodu [75]. Ponadto nawet wśród pacjentek z zaburzeniami cyklu miesięczkowego, których przyczyną jest dysfunkcja jajników, estradiol pozostaje w granicach normy [76]. Bancsi i wsp. wysunęli wniosek, że oznaczanie stężenia estradiolu przed rozpoczęciem procedury IVF ma bardzo ograniczoną zdolność predykcyjną zarówno uzyskania odpowiedzi na stymulację owulacji jak i uzyskanie ciąży [77]. W swojej pracy Miao i wsp. sugeruje natomiast, że stężenie estradiolu w 5 dniu cyklu może być czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na stymulację. Uzyskano korelację pomiędzy niskimi stężeniami estradiolu a koniecznością zastosowania wyższych dawek gonadotropin podczas stymulacji owulacji [78]. Według pracy Costello stężenie estradiolu oznaczane w 3 dniu cyklu koreluje z szansą na uzyskanie ciąży. Przy wartości stężenia estradiolu >150 pmol/l uzyskano 4% wskaźnik ciążowy, natomiast przy wartości < 150 pmol/l uzyskano 13% wskaźnik ciążowy [79]. Ponadto sugeruje się istnienie korelacji pomiędzy stężeniem estradiolu oznaczanym po podaniu gonadotropiny kosmówkowej (hCG – *human chorionic gonadotropin*) w cyklu stymulowanym, a uzyskaniem klinicznej ciąży oraz żywych urodzeń. Prawidłowy pik estradiolu po stymulacji wynosi 1000-2000 pg/ml [80]. Osiągnięcie niższych stężeń estradiolu o więcej niż 10% wartości prawidłowej wiąże się ze zmniejszeniem o 40-50% szansy na uzyskanie ciąży [81]. Obniżonej odpowiedzi jajników na stymulację owulacji można się spodziewać przy wartościach estradiolu <900 pg/ml [81]. Większość danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie sugeruje jednak brak korelacji pomiędzy stężeniem estradiolu a możliwością uzyskania ciąży [78, 82, 83]. Uważa się, że stężenie estradiolu oznaczone w dniu podania hCG może być czynnikiem prognostycznym wystąpienia zespołu hiperstymulacji jajników [84]. Ze względu na małą zdolność predykcyjną powodzeń rozrodu nie zaleca się stosowania oznaczeń stężenia estradiolu jako kryterium włączenia pacjentki do programu leczenia przy użyciu technik rozrodu wspomaganego [63].

### **Inhibina B**

Inhibina-B jest glikoproteiną należącą do rodziny transformujących czynników wzrostu TGF- $\beta$ , wydzielaną przez komórki ziarniste i tekalne jajnika [63]. Inhibina-B hamuje uwalnianie FSH przez przysadkę mózgową [63]. Stężenie inhibiny-B ujemnie koreluje ze stężeniem FSH, natomiast dodatnio z liczbą małych (<5mm) pęcherzyków antralnych obserwowanych w przedpochwowym badaniu ultrasonograficznym [85]. Liczne prace potwierdziły dużą zdolność predykcyjną oznaczania stężenia inhibiny-B w celu identyfikacji kobiet słabo odpowiadających na indukcję owulacji [73, 78, 86-89].

Według badań Eldar-Geva i wsp. stężenie inhibiny <79,4pg/ml jest czynnikiem prognostycznym obniżonej odpowiedzi na indukcję owulacji [73, 74, 90]. Ponadto zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy stężeniem inhibiny-B a ilością uzyskiwanych oocytów w trakcie stymulacji. Wykazano, że u pacjentek ze stężeniem inhibiny-B >100pg/ml można uzyskać w trakcie stymulacji >6 oocytów [63]. Sugeruje się, że podwyższone stężenie

inhibiny-B jest czynnikiem prognostycznym rozwoju zespołu hiperstymulacji jajników [90]. W dostępnym piśmiennictwie istnieją duże rozbieżności w kwestii wartości prognostycznej oznaczeń inhibiny-B w przewidywaniu uzyskania ciąży [91]. Badacze sugerują istnienie korelacji pomiędzy stężeniem inhibiny-B a wskaźnikiem żywych urodzeń [86]. Wykazano 68,71% czułość oraz 88,51% swoistość oznaczeń stężenia inhibiny-B w uzyskaniu żywych urodzeń po IVF [63]. Istnieją jednak doniesienia, które sugerują ograniczoną wartość kliniczną stężenia inhibiny-B w przewidywaniu uzyskania ciąży [73, 78]. Ze względu na wahania stężenia inhibiny-B niektórzy autorzy nie zalecają stosowania tego oznaczenia jako samodzielnego czynnika prognostycznego rezerwy jajnikowej [63, 92].

### Liczba pęcherzyków antralnych – AFC (ang. *Antral Follicle Count*)

Oceny liczby pęcherzyków antralnych (średnicy 2-10mm) dokonuje się między 3-5 dniem naturalnego cyklu miesięczkowego, lub po teście progesteronowym, w przezpochwowym badaniu ultrasonograficznym. Badanie to jest uważane za jeden z najlepszych czynników predykcyjnych rezerwy jajnikowej oraz odpowiedzi jajników na stymulację owulacji [73, 86, 93].

Obecność <11,5 pęcherzyków antralnych koreluje ze słabą odpowiedzią na stymulację owulacji [72, 73]. Według innych doniesień słaba odpowiedź na stymulację obserwowana była przy AFC < 5,7 [94]. Czulość metody ocenia się na około 89% [63]. Sugeruje się, że oznaczenie AFC pozwala na identyfikację kobiet, które mają większe szanse na zajście w ciążę, a wartość AFC > 11 wg badań Maseelall'a wiąże się z większą szansą na uzyskanie żywych urodzeń [95, 96]. Zaobserwowano także, że aż 98,7% kobiet zaszło w ciążę przy AFC ≥ 4 [97]. Wartość prognostyczna oznaczenia AFC jako samodzielnego markera wydaje się być porównywalna do kombinacji klinicznych, biochemicznych oraz ultrasonograficznych oznaczeń w prognozowaniu wyników IVF [98]. Autorzy licznych badań rekomendują zastosowanie oceny AFC, jako rutynowego testu przeprowadzanego w trakcie badania ultrasonograficznego u każdej pacjentki leczonej z powodu niepłodności.

### Podsumowanie

Skuteczne leczenie niepłodności jest niezwykle trudne, wymaga doświadczenia i wykorzystania najnowszych osiągnięć medycyny. Kluczem do sukcesu jest właściwa kwalifikacja i wdrożenie celowanego leczenia. Dlatego też niezwykle ważne wydają się być badania mające na celu zrozumienie istoty procesów patofizjologicznych zachodzących w komórkach jajnika i jego mikrośrodowisku, które prowadzą do uszkodzenia oraz szybszego starzenia się oocytów w porównaniu z innymi komórkami człowieka. Znaczne obniżenie jakości oocytów związane z ich starzeniem (po 35 r.ż.), obejmuje zwłaszcza nieprawidłowości jądra komórkowego. Konsekwencją tego są niepowodzenia rozrodu wynikające z zaburzenia: gametogenezy, procesu zapłodnienia, wczesnego rozwoju zarodka oraz nieprawidłowej implantacji.

Skupienie uwagi na aspektach molekularnych oocytów, komórek ziarnistych i otaczającego je mikrośrodowiska pozwoliło na wysunięcie ważnych wniosków. Główne hipotezy toksycznego działania mikrośrodowiska takie jak nieprawidłowe unaczynienie, stres oksydacyjny, nieprawidłowa glikacja czy zmiany ekspresji genów znajdują odzwierciedlenie w licznych niepra-

widowościach oocytów i komórek ziarnistych. Wielu badaczy potwierdziło wspólną teorię starzenia sugerując, że zaburzona równowaga oksydacyjna w oocytach i komórkach ziarnistych prowadzi do licznych uszkodzeń oraz zaburza równowagę metaboliczną komórki. Opisane procesy, jakie zachodzą w otoczeniu dojrzewającej komórki jajowej prowadzą do jej uszkodzenia i eliminacji. Jest to niewątpliwie przyczyną narastających z wiekiem zaburzeń płodności. Dalsze badania wydają się konieczne dla potwierdzenia mechanizmów tych zaburzeń, a tym samym pozwolą w przyszłości na wdrożenie celowanego leczenia.

**Praca powstała w ramach Działalności Statutowej (nr 183) prowadzonej w Wojskowym Instytucie Medycznym w Warszawie, przeznaczonej do realizacji w latach 2012-2014.**

### Piśmiennictwo

1. Speroff L, Fritz M. Niepłodność żeńska. W: Kliniczna endokrynologia ginekologiczna i niepłodność. Red. Jakimiuk A, Czajkowski K. Warszawa: *MediPage*, 2007, 1179.
2. Faddy M, Gosden R. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod*. 1996, 11, 1484-1486.
3. Tilly J. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001, 2, 838-848.
4. Tatone C, Carbone M, Gallo R, [et al.]. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod*. 2006, 74, 395-402.
5. Tatone C, Amicarelli F, Carbone M, [et al.]. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*. 2008, 14, 131-42.
6. Velde E, Pearson P. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002, 8, 141-154.
7. Sauer M, Paulson R, Lobo R. A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. *N Engl J Med*. 1990, 323, 1157-1160.
8. Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasm. *Hum Reprod*. 1998, 13, 2857-2868.
9. Zhang X, Wu XQ, Lu S, [et al.]. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse Mill oocyte spindles. *Cell Res*. 2006, 16, 841-850.
10. Yi YC, Chen MJ, Ho JY, [et al.]. Mitochondria transfer can enhance the murine embryo development. *J Assist Reprod Genet*. 2007, 24, 445-449.
11. Perez G, Jurisicova A, Matikainen T, [et al.]. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *FASEB J*. 2005, 19, 860-862.
12. Tatone C, Carbone M, Falone S, [et al.]. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 2006, 12, 655-660.
13. Battaglia D, Goodwin P, Klein N, Sovles M. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod*. 1996, 11, 2217-2222.
14. Liu L, Keefe D. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod*. 2002, 17, 2678-2685.
15. Tarín J, Pérez-Albalá S, Cano A. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod*. 2001, 65, 141-150.
16. Dumollard R, Duchon M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2007, 77, 21-49.
17. Takeuchi T, Neri Q, Katagiri Y, [et al.]. Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis. *Biol Reprod*. 2005, 72, 584-592.
18. Redmer A, Reynolds L. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*. 1996, 1, 182-192.
19. Costello M, Shrestha S, Sjoblom P, [et al.]. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perfollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2006, 23, 359-365.
20. Kok H, van Asselt K, van der Schouw Y, [et al.]. Heart disease risk determines menopausal age rather than the reverse. *J Am Coll Cardiol*. 2006, 47, 1976-1983.
21. Chandel N, Budinger G. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med*. 2007, 42, 165-174.
22. Klein N, Battaglia D, Woodruff T, [et al.]. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, 85, 4520-4525.
23. Artini P, Monti M, Cristello F, [et al.]. Vascular endothelial growth factor in females of reproductive age. *Gynecol Endocrinol*. 2003, 17, 477-492.
24. Sohal R. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med*. 2002, 33, 37-44.
25. Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. Oxidative stress in cells damage processes. *Pol Merkur Lekarski*. 2009, 27, 44-47.
26. Sheu S, Nauduri D, Anders M. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1762, 256-265.
27. Gatecka E, Mrowicka M, Malinowska K, [et al.]. Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii. *Pol Merkur Lek*. 2008, 24, 446-448.
28. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005, 3, 28.
29. Bailey M, Landar A, Darley-Usmar V. Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free*

- Radic Biol Med.* 2005, 38,175-188.
30. Orenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007, 47, 143-183.
  31. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, [et al.]. Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 2006, 21, 2403-2407.
  32. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, [et al.]. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochromiluminescence assay correlate with outcome parameters in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004, 82, Suppl 3,1171-1176.
  33. Carbone M, Tatone C, Delle Monache S, [et al.]. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod.* 2003, 9, 639-643.
  34. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, [et al.]. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003, 329, 23-38.
  35. de Magalhães J, Curado J, Church G. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics.* 2009, 25, 875-881.
  36. Masoro E. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2005, 126, 913-922.
  37. Swindell W. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. *BMC Genomics.* 2009, 10, 585.
  38. Hong S, Heo H, Kim D, [et al.]. Revealing system-level correlations between aging and caloric restriction using a mouse transcriptome. *Age (Dordt).* 2010, 32, 15-30.
  39. Sharma P, Mittal N, Deswal S, Roy N. Calorie restriction up-regulates iron and copper transport genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst.* 2011, 7, 394-402.
  40. Blackburn E. Telomeres and telomerase: their mechanism of action and the effects of altering their function. *Febbs Lett.* 2005, 579, 859-863.
  41. Verdun R, Karlseder J. Replication and protection of telomeres. *Nature.* 2007, 447, 924-931.
  42. Kurz D, Decary S, Hong Y, [et al.]. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2004, 117, 2417-2426.
  43. Passos J, von Zglinicki T. Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp Gerontol.* 2005, 40, 466-72.
  44. Keefe D, Franco S, Liu L, [et al.]. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women—toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192, 1256-1260.
  45. Keefe D, Liu L, Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci.* 2007, 64, 139-143.
  46. Hande M, Samper E, Lansdorf P, [et al.]. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol.* 1999, 144,589-601.
  47. Battaglia D, Goodwin P, Klein N, Sovles M. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996, 11, 2217-2222.
  48. Keefe D. Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2007, 64, 115-116.
  49. Baynes J. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol.* 2001, 36, 1527-1537.
  50. Yin M, Yin H, Lee C, [et al.]. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001, 928, 48-53.
  51. Schmidt A, Yan S, Yan S, Stern D. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2000, 1498, 99-111.
  52. Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, [et al.]. Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2011, 26, 604-610.
  53. Visser J, de Jong F, Laven J, Themmen M. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006, 131, 1-9.
  54. Karkanaki A, Vosnakis Ch, Panidis D. The clinical significance of anti-Müllerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. *Hormones.* 2011, 10, 95-103.
  55. Skałba P, Cygal A, Dąbkowska-Huc A. Wpływ hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) na folikulogenezę. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 137-140.
  56. Hagen C, Akslaegde L, Sorensen K, [et al.]. Individual serum levels of anti-Müllerian hormone in healthy girls persist through childhood and adolescence: a longitudinal cohort study. *Hum Reprod.* 2012, 27, 861-866.
  57. Kevenaar M, Meerasahib M, Kramer P, [et al.]. Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology.* 2006, 147, 3228-3234.
  58. de Vet A, Laven J, de Jong F, [et al.]. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002, 77, 357-362.
  59. Hampel R, Šnajderová M, Mardeši T. Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res.* 2011, 60, 217-223.
  60. Sowers M, Eyyvazadeh A, McConnell D, [et al.]. Anti-müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93, 3478-3483.
  61. Younis J. Ovarian aging: latest thoughts on assessment and management. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2011, 23, 427-434.
  62. Loh J, Maheshwari A. Anti-Müllerian hormone—is it a crystal ball for predicting ovarian ageing? *Hum Reprod.* 2011, 26, 2925-2932.
  63. Carvalho B, Gomes Sobrinho D, Vieira A, [et al.]. Ovarian Reserve Assessment for Infertility Investigation. *Obstet Gynecol.* 2012, 576, 385.
  64. Nelson S, Anderson R, Broekmans F, [et al.]. Anti-Müllerian hormone: clairvoyance or crystal clear? *Hum Reprod.* 2012, 27, 631-636.
  65. Nelson S, Lawlor D. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Med.* 2011, 8, e1000386.
  66. Hirokawa W, Iwase A, Gotto M, [et al.]. The postoperative decline in serum anti-Müllerian hormone correlates with the bilaterality and severity of endometriosis. *Hum Reprod.* 2011, 26, 904-910.
  67. Wikarek T, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J, [et al.]. Hormon anty-Müllerowski a zaburzenia płodności u otyłych kobiet i kobiet z zespołem policystycznych jajników. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 205-209.
  68. Weghofer A, Kim A, Barad D, Gleicher N. Follicle stimulating hormone and anti-müllerian hormone per oocyte in predicting in vitro fertilization pregnancy in high responders: a cohort study. *PLoS One.* 2012, 7, 34290.
  69. Bancsi L, Broekmans F, Mol B, [et al.]. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2003, 79,1091-1100.
  70. van der Steeg J, Steures P, Eijkemans M, [et al.]. Predictive value and clinical impact of basal follicle stimulating hormone in subfertile, ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92, 2163-2168.
  71. Andersen A, Witjes H, Gordon K, [et al.]. Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment. *Hum Reprod.* 2011, 26, 3413-3423.
  72. Erdem M, Erdem A, Gursoy R, Biberogh K. Comparison of basal and clomiphene citrate induced FSH and inhibin B, ovarian volume and antral follicle counts as ovarian reserve tests and predictors of poor ovarian response in IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2004, 21, 37-45.
  73. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz I, [et al.]. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Human Reprod.* 2005, 20, 3178-3183.
  74. Ashrafi M, Madani T, Seirafi Tehrani A, Kalekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005, 91, 53-57.
  75. Vladimirov I, Tacheva D, Kalinov K, [et al.]. Prognostic value of some ovarian reserve tests in poor responders. *Arch Gynecol Obstet.* 2005, 272, 74-9.
  76. Laven J, Fauser B. What role of estrogens in ovarian stimulation. *Maturitas.* 2006, 20, 54, 356-362.
  77. Bancsi L, Broekmans F, Eijkemans M, [et al.]. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2002, 77, 328-336.
  78. Miao M, Huang H. Dynamic measurements of serum inhibin B and estradiol: a predictive evaluation of ovarian response to gonadotrophin stimulation in the early stage of IVF treatment. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009, 10, 35-45.
  79. Costello M, Hughes G, Garrett D, [et al.]. Prognostic value of baseline serum oestradiol in controlled ovarian hyperstimulation of women with unexplained infertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2001, 41, 69-74.
  80. Anifandis G, Koutselini E, Louridas K, [et al.]. Estradiol and leptin as conditional prognostic IVF markers. *Reproduction.* 2005, 129, 531-534.
  81. Kondapalli L, Molinaro T, Sammel M, Dokras A. A decrease in serum estradiol levels after human chorionic gonadotrophin administration predicts significantly lower clinical pregnancy and live birth rates in in vitro fertilization cycles. *Hum Reprod.* 2012, 27, 2690-2697.
  82. Hazout A, Bouchard P, Seifer D, [et al.]. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril.* 2004, 82, 1323-1329.
  83. Sharara F. Value of mid-luteal oestradiol level: prognostic implications for IVF. *Hum Reprod.* 2001, 16, 2476.
  84. Lee TH, Liu CH, Huang CC, [et al.]. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod.* 2008, 23, 160-167.
  85. Tinkanen H, Blauer M, Laippala P, [et al.]. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 94, 109-113.
  86. Peñarubia J, Peralta S, Fábregues F, [et al.]. Day-5 inhibin B serum concentrations and antral follicle count as predictors of ovarian response and live birth in assisted reproduction cycles stimulated with gonadotropin after pituitary suppression. *Fertil Steril.* 2010, 94, 2590-2595.
  87. Broekmans F, Kwee J, Hendriks D. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006, 12, 685-718.
  88. Chen Y, Yu Q, Zhang YW, [et al.]. Value of serum inhibin B measurement in predicting ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization cycle. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006, 41, 368-371.
  89. Urbancsek J, Hauzman E, Murber A, [et al.]. Serum CA-125 and inhibin B levels in the prediction of ovarian response to gonadotropin stimulation in in vitro fertilization cycles. *Gynecol Endocrinol.* 2005, 21, 38-44.
  90. Miao M, Huang H. Dynamic assay of serum inhibin B and estradiol concentrations obtained after gonadotrophin therapy as predictors of ovarian response in vitro fertilization cycle. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006, 41, 114-117.
  91. Wunder D, Guibourdenche J, Birkhäuser M, [et al.]. Bersinger N. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2008, 90, 2203-2210.
  92. Scheffer J, Lozano D, Frydman R, [et al.]. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007, 29, 186-191.
  93. Bonilla-Musoles F, Castillo J, Caballero O, [et al.]. Predicting ovarian reserve and reproductive outcome using antimüllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC) in patients with previous assisted reproduction technique (ART) failure. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012, 39, 13-18.
  94. Elgindy E, El-Haieg D, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 2008, 89, 1670-1676.
  95. Ben-Haroush A, Farhi J, Zahalka Y, [et al.]. Small antral follicle count (2-5 mm) and ovarian volume for prediction of pregnancy in in vitro fertilization cycles. *Gynecol Endocrinol.* 2011, 27,748-752.
  96. Maseelal P, Hernandez-Rey A, Oh C, [et al.]. Antral follicle count is a significant predictor of live birth in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009, 91, 1595-1597.
  97. Gibreel A, Maheshwari A, Bhattacharya S, [et al.]. Ultrasound tests of ovarian reserve; A systematic review of accuracy in predicting fertility outcomes. *Hum Fert.* 2009, 12, 95-106.
  98. Verhagen T, Hendriks DJ, Bancsi L, [et al.]. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2008, 14, 95-100.