

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΚΠΑ ΓΝΑ "ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ"
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘ. κ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Η ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ AMH (Anti-Mullerian Hormone) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΕΝΤΑΣΣΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ.

***Διδακτορική διατριβή
Δήμητρης Αγραπίδης
Γυναικολόγος Μαιευτήρας***

ΑΘΗΝΑ 2017

Γενικές πληροφορίες

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς 24/03/10

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής

Επιτροπής

Καθηγητής Αρ. Αντσακλής Α΄ Μαιευτική και
Γυναικολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Ελ.Βενιζέλ.
Αλεξάνδρα.

Αν. Καθηγητής Κ.Καλλιανίδης, Α΄ Μαιευτική και
Γυναικολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών ,Νοσοκομείο Ελ.Βενιζέλ.
Αλεξάνδρα.

Αν.Καθηγητής Κ.Στεφανίδης,(επιβλέπων) Α΄ Μαιευτι
κή και Γυναικολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ημερομηνία κατάθεσης

Α΄ προόδου 04/07/12

Β΄ προόδου 24/11/17

Γ προόδου 15/12/17

Αφιέρωση

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά την Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή για την αμέριστη βοήθεια της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Αναλυτικότερα, τους Καθηγητές κ Λουτράδη Δημήτρη και Αντσακλή Αριστείδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν με την ανάθεση αυτής της διατριβής. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τους αναπληρωτές καθηγητές Στεφανίδη Κωνσταντίνο επιβλέποντα της διατριβής και τον Καλλιανίδη Κωνσταντίνο για τις συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

Τέλος, θέλω ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω την οικογένεια μου .Η συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής ήταν αμέριστη και η κατανόηση των προσπαθειών μου αποτέλεσαν τη βάση για την περαίωση της μελέτης.

Περίληψη

Σκοπός: Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διαγνωστικής αξίας της AMH σε σχέση με την FSH, LH, τον αριθμό των ωοθυλακίων, την ποιότητα των ωαρίων και τις κυήσεις της ασθενών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Επίσης, η μελέτη των επιπέδων AMH σε καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού και των ωοθηκών.

Υλικό – μέθοδος: Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, πριν την ένταξη τους σε κάποιο πρόγραμμα. Οι ορμονικοί προσδιορισμοί των δειγμάτων έγινε με την χρήση της AMH Gen II ELISA και η οι στατιστικές αναλύσεις με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η AMH (AUC: 0.618; 0.30-0.93, $p=0.474$) δεν είναι στατιστικά σημαντικός εκτιμητής του καρκίνου του μαστού, ενώ αντίθετα αποτελεί σημαντικό εκτιμητή του καρκίνου των ωοθηκών (AUC:0.732; 0.56-0.91, $p=0,011$). Η AMH (AUC:0.614; 0.52-0.71, $p=0,015$) εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την υπογονιμότητα, την ηλικία ($r=-0.261$ $p=0,005$), την FSH ($r=-0.226$ $p=0,017$), την LH ($r=0.236$ $p=0,012$), τα ωοθυλάκια ($r=0.527$ $p< 0,001$) και τα ωάρια ($r=0.452$ $p< 0,001$).

Συμπεράσματα: Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι η AMH εμφανίζεται ως σημαντικός προγνωστικός δείκτης του καρκίνου των ωοθηκών, της υπογονιμότητας και την πρόγνωσης της IVF. Αντίθετα δεν αποτέλεσε καλό δείκτη πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού. Καθώς το δείγμα της έρευνας είναι μικρό, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και η ανάγκη ενός ευρέως αποδεκτού δείκτη της AMH.

Λέξεις κλειδιά: Αντι-Μυλλέριος ορμόνη (AMH), εξωσωματική γονιμοποίηση, καρκίνος μαστού, καρκίνος ωοθηκών, υπογονιμότητα

Abstract

Objectives: The purpose of this study was to determine the diagnostic value of AMH in relation to FSH, LH, the number of follicles, the quality of eggs and pregnancies of patients before IVF, and the AMH levels in benign and malignant diseases of the breast and ovaries.

Methods: The study population consisted of patients in assisted reproduction, before their inclusion in a program. Sample hormonal determinations were made using the AMH Gen II ELISA and the statistical analysis with the SPSS statistical package, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results: The results showed that AMH (AUC: 0.618; 0.30-0.93, $p=0.474$) is not statistically significant predictor of breast cancer, while is a reliable predictor of ovarian cancer (AUC: 0.732; 0.56-0.91, $p = 0.011$). AMH (AUC: 0.614; 0.52-0.71, $p = 0,015$) showed a statistically significant association with infertility, age ($r = -0.261$ $p = 0,005$), the FSH ($r = -0.226$ $p = 0,017$), the LH ($r = 0.236$ $p = 0,012$), the follicle ($r = 0.527$ $p <0,001$) and ova ($r = 0.452$ $p <0,001$).

Conclusions: The present study showed that AMH appears as an important predictor of ovarian cancer, infertility, and prognosis of IVF. Instead, it was not a good predictor in breast cancer. As the research sample is small, further research is needed, as with a widely accepted indicator of AMH.

Keywords: Anti-Müllerian hormone (AMH), In vitro fertilization (IVF), Subfertility, ovarian neoplasms, Breast cancer

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	4
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	7
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Εισαγωγή	11
1. Αντιμυλλέριος ορμόνη	12
1.1 Υποδοχείς της AMH	13
1.2 Ο ρόλος της AMH στην φυσιολογία της ωοθήκης	16
1.3 Ο ρόλος της AMH στην στεροειδογένεση	22
1.4 Δοκιμασίες της AMH	23
1.4.1 Παράγοντες επηρεασμού των επιπέδων της AMH	26
2. Η AMH στις λειτουργίες των ωοθηκών	28
2.1 Δοκιμασίες ωοθηκικού αποθέματος	28
2.2 Πρόβλεψη της εμμηνόπαυσης	29
3. AMH και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.....	34
3.1 Η πρόβλεψη σύλληψης σε υπογόνιμα ζευγάρια	34
3.2 IVF	34
3.3 Σπερματέγχυση.....	39
3.4 Γονιμοποίηση ωαρίων και ποιότητα εμβρύων	40
3.5 Η χρήση της AMH στην υπογονιμότητα γυναικών με PCOS.....	42
4. Η χρήση της AMH στον γυναικείο καρκίνο	47
4.1 Καρκίνος του μαστού	49
4.2 Καρκίνος ωοθηκών	53
5. Λειτουργικές διαταραχές ωοθηκών	55
5.1 Ενδομητρίωση	55
5.2 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS).....	59
5.2.1 Η AMH και οι φαινότυποι του PCOS	62
5.2.2 AMH στην παχυσαρκία και στην αντίσταση στην ινσουλίνη	62
5.2.3 Η AMH στην διάγνωση του PCOS	63

5.3 Άλλες μορφές ανωορρηξίας	64
6. Η σχέση της AMH με την θεραπεία του καρκίνου	66
6.1 Η AMH και ο καρκίνος των ωοθηκών.....	67
6.2 Η δράση της AMH σε άλλους Μυλλέριους ιστούς και καρκίνους.....	70
6.3 Η AMH και οι μη-Μυλλέριοι ιστοί και καρκίνοι	72
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	74
7. Μέθοδοι και διαδικασίες της έρευνας	75
7.1 Σκοπός της έρευνας	75
7.2 Υλικό και μέθοδος	75
8. Στατιστική ανάλυση	76
9. Αποτελέσματα	78
9.1 Αποτελέσματα AMH-Ca Μαστού.....	78
9.2 Αποτελέσματα AMH-Ca Ωοθηκών	79
9.3 Αποτελέσματα AMH-υπογονιμότητας	81
9.4 Αποτελέσματα AMH- IVF	82
9.5 Αποτελέσματα (AMH-IVF φτωχή απαντήτρια) N=25 άτομα	93
10. Συζήτηση	98
10.1 Η AMH σε συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού	98
10.2 Η AMH σε συσχέτιση με τον καρκίνο των ωοθηκών	99
10.3 Η AMH σε συσχέτιση με την υπογονιμότητα και την πρόγνωση της της IVF.....	101
11. Συμπεράσματα.....	109
Παραπομπές	110

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού (N=25).....	78
Πίνακας 2. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού(N=25).....	79
Πίνακας 3. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών (N=53).	79
Πίνακας 4. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών (N=53).....	80
Πίνακας 5. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210)	81
Πίνακας 6. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210).....	82
Πίνακας 7. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά	83
Πίνακας 8. Συσχέτιση Δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τον δείκτη AMH (<6,2)	85
Πίνακας 9. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της έκβασης της κύησης	88
Πίνακας 10. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωοθυλακίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.	89
Πίνακας 11. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.	90
Πίνακας 12. Πολυπαραγοντική ανάλυση του ποσοστού καλών ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.	91
Πίνακας 13. Πολυπαραγοντική ανάλυση της έκβασης κύησης σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2).....	92
Πίνακας 14. Συσχέτιση Δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τον δείκτη AMH	93

Πίνακας 15. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωοθυλακίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες	94
Πίνακας 16. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες	96
Πίνακας 17. Πολυπαραγοντική ανάλυση του ποσοστού καλών ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες	96

Ευρετήριο γραφημάτων

Γράφημα 1. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού	78
Γράφημα 2. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών	80
Γράφημα 3. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210)	81
Γράφημα 4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά	84
Γράφημα 5. Συσχέτιση ωοθυλακίων με τον δείκτη AMH	86
Γράφημα 6. Συσχέτιση ωαρίων με τον δείκτη AMH	87
Γράφημα 7. Συσχέτιση ποσοστού ωαρίων καλής ποιότητας με τον δείκτη AMH	88
Γράφημα 8. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της έκβασης της κύησης	89

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών, τα έμβρυα και των δύο φύλων είχαν δυο ζεύγη πόρων: του Wollfian και του Müllerian. Στην δεκαετία του 1940, ο Alfred Jost έδειξε πως ένα παράγωγο των όρχεων, διαφορετικό από την τεστοστερόνη, ήταν υπεύθυνο για την παλινδρόμηση των πόρων του Müller στα θηλυκά έμβρυα. Αυτό το παράγωγο ονομάστηκε «ορμονικός αναστολέας». Τριάντα χρόνια πριν, το ανθρώπινο γονίδιο για την Αντιμυλλέριο ορμόνη (AMH) απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε (Cate et al., 1986).

Τα πειράματα σε ποντίκια που είχαν υποστεί απενεργοποίηση της AMH έχουν αποκαλύψει σημαντικούς ενδο-ωοθηκικούς ρόλους της AMH στην αναστολή της ανάπτυξης των αρχέγονων ωοθυλακίων. Στα ποντίκια αυτά, η χορήγηση της AMH είχε ως αποτέλεσμα την πρόσληψη της από τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Στους 4 μήνες, παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των πρώιμων και των μικρών ωοθυλακίων. Αντίθετα, τόσο στους 4 όσο και στους 13 μήνες, ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων ήταν σημαντικά μειωμένος. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν πως στα ποντίκια σε απουσία AMH, τα αρχέγονα ωοθυλάκια στρατεύονται με ταχύτερο ρυθμό, με αποτέλεσμα την πρόωρη εξάντληση της ωοθηκικού αποθέματος (Durlinger et al., 1999, 2001). Καθώς τα ποντίκια με απενεργοποιημένη AMH εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα της FSH μαζί με την ταυτόχρονη αύξηση των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, έχει υποτεθεί ότι, σε απουσία της AMH τα ωοθυλάκια είναι περισσότερο ευαίσθητα στην FSH. Η υποτιθέμενη ανασταλτική επίδραση της AMH στην ωοθυλακική ευαισθησία στην FSH μπορεί να παίξει ρόλο στην διεργασία της επιλογής των κυρίαρχων ωοθυλακίων (Durlinger et al., 1999, McGee & Hsueh, 2000). Καθώς τα ωοθυλάκια μεγαλώνουν, η έκφραση της AMH περιορίζεται και αυτό θα μπορούσε να μειώσει το επίπεδο της FSH, επιτρέποντας στα ωοθυλάκια να συνεχίσουν την ανάπτυξη και την ωορρηξία τους στον επόμενο έμμηνο κύκλο (Al Qahtani et al., 2005, Durlinger et al., 2001, Visser et al., 2007). Ωστόσο, μένει να αποδειχθεί κατά πόσο είναι λειτουργικός αυτός ο ενδο-ωοθηκικός παρακρινής ρόλος της AMH και στους ανθρώπους.

1. Αντιμυλλέριος ορμόνη

Η Αντιμυλλέριος ορμόνη των γονάδων (Antimüllerian Hormone - AMH) είναι μια δισουλφίδο-συνδεδεμένη ομοδιμερική γλυκοπρωτεΐνη 140 kDa και μέλος του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (TGF-β) της υπερικογένειας των αυξητικών παραγόντων μεταμόρφωσης, όπως είναι και οι ανασταλίνες και οι ακτιβίνες. Το γονίδιο εδράζεται στο βραχύ σκέλος του ανθρώπινου χρωμοσώματος, στη ζώνη 19p13.3 (Cohen-Hagueneauer et al., 1987). Το γονίδιο της AMH έχει μήκος 2750 bp και διαιρείται σε πέντε εξόνια. Το 3' άκρο του 5^{ου} εξονίου κωδικοποιεί το βιοενεργό τμήμα του μορίου και είναι εξαιρετικά πλούσιο σε GC (Rey et al., 2003, Teixeira et al., 2001). Αρχικά η AMH αναφερόταν ως Μυλλέριος-ανασταλτική ουσία (Müllerian Inhibiting Substance – MIS), και ήταν γνωστή από το 1940 για το ρόλο της στην σεξουαλική διαφοροποίηση του αρρένους κατά την διάρκεια της πρώιμης εμβρυονικής ανάπτυξης, εξαιτίας της πρωτοποριακής εργασίας του Alfred Jost. Η AMH παράγεται από τα εμβρυϊκά κύτταρα του Sertoli, προκαλώντας την παλινδρόμηση του πόρου του Müller, επιτρέποντας στους πόρους του Wolff να αναπτυχθούν στη γεννητική οδό του αρρένους, κάτω από την επίδραση της τεστοστερόνης (Wilson et al., 1981). Η παραγωγή της AMH από τους όρχεις έχει περιγραφεί κατά την 8^η εβδομάδα κύησης (Lee et al., 1997).

Φαίνεται πως η AMH δρα μόνο στα όργανα αναπαραγωγής (Teixeira et al., 2001). Σε απουσία της AMH το έμβρυο αναπτύσσεται σε θήλυ, επιτρέποντας στον πόρο του Müller να διαφοροποιηθεί σε ανώτερο κόλπο, μήτρα και σάλπιγγες. Ωστόσο, αργότερα κατά την εμβρυϊκή ζωή, η AMH συντίθεται από τα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθυλακίων, διεργασία που αρχικά περιγράφηκε σε ωθήκη ενήλικων κοτόπουλων (Hutson et al., 1981). Η AMH εκφράζεται επίσης στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών (Rajpert-De Meyts et al., 1999). Έχει αναφερθεί πως η FSH και η οιστραδιόλη μπορεί να μειώσουν την έκφραση της AMH και των υποδοχέων τύπου II της AMH στα ποντίκια (Baarends et al., 1995). Στα ανθρώπινα έμβρυα, η παραγωγή της ωοθηκικής AMH αρχίζει περίπου κατά την γέννηση (Rajpert-De Meyts et al., 1999).

Τα κοκκιώδη κύτταρα των αρχέγονων ωοθυλακίων δείχνουν μια ομοιόμορφη έκφραση της AMH. Στα μεγαλύτερα ωοθυλάκια η AMH παράγεται

κυρίως στα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο ωοκύτταρο και σε λίγα κύτταρα που περιβάλλουν το άντρο. Η AMH συνεχίζει να εκφράζεται στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια μέχρι αυτά να φτάσουν το μέγεθος και την κατάσταση διαφοροποίησης κατά την οποία πρόκειται να επιλεγούν ως κυρίαρχα υπο την δράση της FSH της υπόφυσης. Στα ποντίκια αυτό συμβαίνει κατά πρώιμα στάδια του άντρου σε μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, και στους ανθρώπους στα ωοθυλάκια μεγέθους 4-6mm. Η AMH δεν εκφράζεται στα άτρητα ωοθυλάκια και στα κύτταρα της θήκης (Baarends et al., 1995, Hirobe et al., 1994, Rajpert-De Meyts et al., 1999, Rey et al., 2000, Weenen et al., 2004, Ueno et al., 1989). Μέσα στα ωοθυλάκια η AMH εκκρίνεται κατά κύριο λόγο εντός του ενδο-ωοθυλακικού διαμερίσματος, προκαλώντας τις υψηλές συγκεντρώσεις του ωοθυλακικού υγρού. Οι εκκρινόμενες ποσότητες είναι αρκετά μεγάλες ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευση της AMH στην κυκλοφορία (Jeppesen et al., 2013, Josso et al., 1990, Hudson et al., 1990, Lee et al., 1997).

Έχει αποδειχθεί πως τα ωοκύτταρα, από τα αρχέγονα έως και τα προ-ωορρηκτικά ωοθυλάκια, αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της AMH στα κοκκιώδη κύτταρα, με τρόπο που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του ωοκυττάρου (Salmon et al., 2004). Επομένως, τα ευρήματα αυτά προτείνουν πως η ωοκυτταρική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κοκκιωδών κυττάρων συμβαίνει κατά την διάρκεια εκτεταμένων περιόδων της ανάπτυξης του ωοθυλακίου, και επίσης, ότι η ρύθμιση της έκφρασης της AMH των ωοκυττάρων μπορεί να έχει ρόλο στον ενδο/δια-θυλακικό συντονισμό της ανάπτυξης των ωοθυλακίων (La Marca & Volpe, 2006).

Ο μηχανισμός της ρύθμισης των ωοθηκικής έκφρασης της AMH παραμένει άγνωστος, αλλά η έκφραση των υποδοχέων της AMH στα κοκκιώδη κύτταρα υποδεικνύει πως μπορεί να παίζει ρόλο στην ωοθηκική φυσιολογία (Josso et al., 2001, Teixeira et al., 2001).

1.1 Υποδοχείς της AMH

Η AMH χρησιμοποιεί ένα σύστημα ετερομερών υποδοχέων αποτελούμενων από διαμεμβρανικούς υποδοχείς σερίνης-θρεονίνης-κινάσης που ονομάζονται τύπου I και τύπου II. Ο υποδοχέας τύπου II (AMHRII) προσδίδει εξειδίκευση στην δέσμευση του συνδέτη και ο τύπου I μεσολαβεί

στην σηματοδότηση κατά την ενεργοποίηση του από τον τύπο II (La Marca & Volpe, 2006).

Το ανθρώπινο γονίδιο του AMHRII απομονώθηκε το 1995 (Imbeaud et al., 1995). Εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 και αποτελείται από 11 εξόνια εκτεινόμενα σε έκταση μεγαλύτερη των 8 kbp. Οι AMHRII αγγελιοφόροι εκφράζονται από τα όργανα-στόχους της AMH, τους πόρους του Müller και τις γονάδες. Το AMHRII εδράζεται στο μεσέγχυμα γύρω από τους πόρους του Müller στην ουρογεννητική περιοχή τόσο των θηλυκών όσο και των αρσενικών ποντικών. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια της λειτουργίας των υποδοχέων τύπου II, όπως και των ίδιων των συνδετών της AMH στους ανθρώπους, προκαλούνται από το σύνδρομο του εμμένουτος πόρου του Müller (Imbeaud et al., 1994). Στις ωθήκες των ποντικών, ο AMHRII εκφράζεται τόσο στα κοκκιώδη όσο και στα κύτταρα της θήκης (Ingraham et al., 2000).

Η ταυτότητα των υποδοχέων τύπου I της AMH δεν είναι σαφής, ιδιαίτερα στις γονάδες. Τουλάχιστον τρεις τύποι υποδοχέων τύπου I έχουν μελετηθεί εκτενώς (di Clemente et al., 2003). Έχει υποτεθεί ότι η AMH μπορεί να μοιράζεται έναν υποδοχέα τύπου I με ένα άλλο μέλος της οικογένειας των TGF. Ο πρώτος υποδοχέας τύπου I της AMH που ταυτοποιήθηκε (Gouédard et al., 2000), ο Alk6, προήλθε από τον έκτο υποδοχέα τύπου I της οικογένειας των TGF-β, λόγω της ικανότητας του να αλληλεπιδρά με ένα σύνδεσμο-εξαρτώμενο τρόπο με τον AMHRII σε ωθηκικά κύτταρα Κινέζικων χάμστερ (Chinese hamster ovary CHO), που εκφράζουν μόνιμα ανθρώπινη AMHRII (CHO-3W) (Imbeaud et al., 1995). Οι Alk2 και Alk3 έχουν επιτυχώς προταθεί ως εναλλακτικοί υποδοχείς τύπου I της AMH (di Clemente et al., 2003). Οι Alk6 και Alk2 (Clarke et al., 2001, Visser et al., 2001) μπορεί να μεσολαβούν στην δράση της AMH σε άλλα όργανα στόχους, ενώ μόνο ο Alk3 έχει δείξει καθαρά την μεσολάβηση της δράσης της AMH στους πόρους του Müller (Jamin et al., 2002).

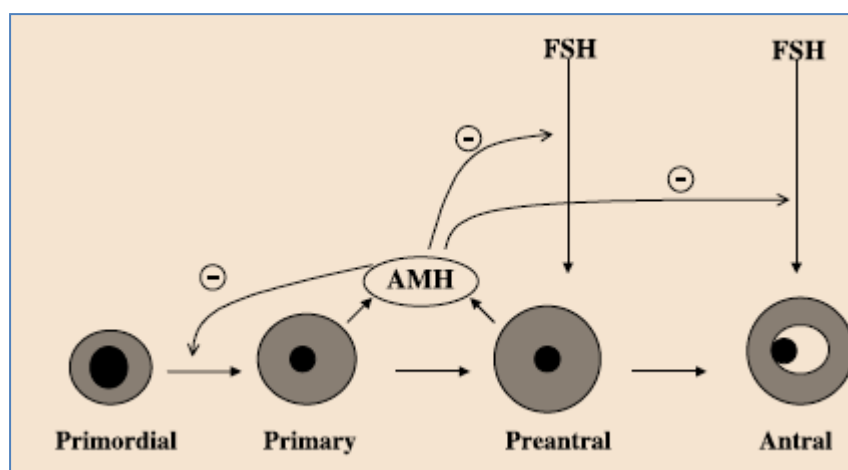
Ο μοριακός μηχανισμός της δράσης της AMH εμφανίζει πολλές ομοιότητες με αυτών των TGF-β. Η εξειδικευμένη δέσμευση με την εξωκυτταρική περιοχή του διαμεμβρανικού υποδοχέα τύπου II της AMH προκαλεί την φωσφορύλωση του υποδοχέα τύπου I και την μετέπειτα σηματοδότηση μέσω των ενδοκυτταρικών Smad πρωτεϊνών (Salhi et al.,

2004, Teixeira et al., 2001). Στον άνθρωπο, έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν την ίδια την AMH (χρωμόσωμα 19) ή στον τύπου II υποδοχέα της (χρωμόσωμα 12). Συχνά, κάποιες μεταλλάξεις (που επηρεάζουν την δέσμευση του συνδέτη, την μετάδοση του σήματος ή την ενδοκυτταρική μεταφορά) εμφανίζουν μια αυτοσωματική υπολειπόμενη κληρονομικότητα, προκαλώντας το σύνδρομο του εμμένοντος πόρου του Müller τους άντρες (Belville et al., 2009, Josso et al., 2005). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως πολλές οικογενειακές μελέτες έχουν δείξει φυσιολογική γονιμότητα στις επηρεασμένες αδερφές (Abduljabbar et al., 2012). Οι υποδοχείς AMH τύπου II έχουν βρεθεί και σε άλλους ιστούς (όπως στον εγκέφαλο, στον μαστό και στο ενδομήτριο), αν και ο λειτουργικός τους ρόλος παραμένει ασαφής (Lebeurrier et al., 2008, Segev et al., 2000, Wang et al., 2009).

Σε ορισμένες έρευνες έχει φανεί πως, σε γυναίκες με φυσιολογική ωορρηξία, ο πολυμορφισμός της AMH (rs10407022) που εδράζεται στο χρωμόσωμα 19p13.3, και οι πολυμορφισμοί της υποδοχέα τύπου II της AMH (AMHR2) (rs2002555 και rs11170547) που εδράζονται στο χρωμόσωμα 12q13 σχετίζονται με τα επίπεδα της οιστραδιόλης κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης. Η σχέση αυτή υποδεικνύει πως οι πολυμορφισμοί αυτών των γονιδίων μπορεί να επηρεάζουν την ρύθμιση της ευαισθησίας της FSH (Kevenaar et al., 2007). Έχει υποτεθεί πως ο πολυμορφισμός της AMH (rs10407022) και οι πολυμορφισμοί της AMHR2 (rs2002555 και rs11170547) μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην βιολογική δραστηριότητα των ορμονών που σχετίζονται με τον έλεγχο της ανάπτυξης και πρόσληψης των ωοθυλακίων (Peluso et al., 2015). Οι γενετικές παραλλαγές της AMH και της AMHR2 μπορεί να επιδρούν στον μεταβολισμό των ορμονών κατά την διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο και στην γονιμότητα (Peluso et al., 2015). Ο πολυμορφισμός rs10407022 c.146T > G οδηγεί στην υποκατάσταση της ισολευκίνης σε σερίνη στην θέση 49 της πρωτεΐνης της AMH (Ile49Ser). Από την στιγμή που είναι υπεύθυνη της πρωτεϊνικής σταθερότητας, μεταλλάξεις μέσα στην περιοχή αυτή μπορεί να επιδράσουν στη βιοσύνθεση ή στην βιοδραστικότητα της AMH, ακόμη και στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνης (Kevenaar et al., 2008).

1.2 Ο ρόλος της AMH στην φυσιολογία της ωοθήκης

Η ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων καθώς και ο ρυθμός της ωοθυλακικής ανάπτυξης ρυθμίζονται τόσο από θετικούς όσο και από αρνητικούς παράγοντες. Η AMH θεωρείται ως ένας αρνητικός ρυθμιστής των αρχικών σταδίων της ωοθυλακικής ανάπτυξης (εικόνα 1). Στα ομοζυγωτικά θηλυκά ποντίκια η απενεργοποίηση της AMH δείχνει κανονική (Behringer et al., 1994). Ωστόσο, μια προσεκτική ανάλυση δείχνει πως στην ομοζυγωτική απενεργοποίηση των θηλυκών υπήρχαν περισσότερα αυξημένα αρχέγονα ωοθυλάκια σε σχέση με τα ποντίκια άγριου-τύπου κατά την προεφηβική και νεαρή ηλικία (Durlinger et al., 1999). Ωστόσο, το απόθεμα των αρχέγονων ωοθυλακίων εξαντλούνταν νωρίτερα στη ζωή τους. Οι ετεροζυγώτες έχουν μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ μεταλλαγμένων και άγριου-τύπου ωοθηκών (La Marca & Volpe, 2006).



Εικόνα 1. Η AMH εκκρίνεται από τα πρωτογενή και τα προ-άντρου ωοθυλάκια. Φαίνεται πως αναστέλλει την αρχική στράτευση των ωοθυλακίων και τη διεγερμένη από την FSH ανάπτυξη των ωοθυλακίων (La Marca & Volpe, 2006).

Για να διερευνηθεί κατά πόσο η επίδραση της AMH ήταν άμεση στα αρχέγονα ωοθυλάκια, καλλιεργήθηκαν *in vitro* ωοθήκες νεογέννητων ποντικών που είχαν απενεργοποιημένη AMH, με την πρόσθεση AMH. Έπειτα από δύο ημέρες της *in vitro* έκθεσης στην AMH, βρέθηκαν περίπου κατά 40% λιγότερα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, υποδεικνύοντας πως ίσως η AMH επηρεάζει άμεσα τα ίδια τα αρχέγονα ωοθυλάκια (Durlinger et al., 2002). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε *in vitro* πειράματα ωοθηκικού

φλοιού βοοειδών (Gigli et al., 2005). Οι μελέτες αυτές προτείνουν πως, τουλάχιστον σε μη-ανθρώπινα είδη, η ύπαρξη της AMH δρα ως ένα φρένο στην ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και στην ανάπτυξη των προ-άντρου ωοθυλακίων (La Marca & Volpe, 2006).

Τόσο οι *in vitro* όσο και οι *in vivo* μελέτες δείχνουν πως τα ωοθυλάκια είναι περισσότερο ευαίσθητα στην FSH σε απουσία της AMH. Η επίδραση της AMH στην ενδοωοθυλακική ευαισθησία στην FSH ελέγχθηκε σε ένα *in vivo* μοντέλο στο οποίο τα ωοθυλακικά δυναμικά συγκρίθηκαν σε ποντίκια φυσιολογικά και με απενεργοποιημένη AMH, με την παρουσία χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων FSH στον ορό (Durlinger et al., 2001). Η έρευνα έδειξε πως παρά την παρουσία χαμηλών επιπέδων FSH, βρέθηκαν περισσότερα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια στα ποντίκια χωρίς AMH απ' ό,τι στα φυσιολογικά ποντίκια. Επιπρόσθετα, στην ύπαρξη διέγερσης των υψηλών επιπέδων FSH στον ορό, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ήταν μεγαλύτερη στα ποντίκια χωρίς AMH απ' ό,τι στα άλλα, τόσο σε αριθμό όσο και σε αναπτυξιακό στάδιο (Durlinger et al., 2001). Η υπόθεση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και από *in vitro* καλλιέργειες αρχέγονων ωοθυλακίων ποντικών. Η AMH ανέστειλε την εξαρτώμενη από την FSH ανάπτυξη του ωοθυλακίου με έναν χρόνο-εξαρτημένο τρόπο (Durlinger et al., 2001). Η επίδραση της AMH ήταν κυρίως αποτέλεσμα της ελαττωμένης διαφοροποίησης των κοκκιωδών κυττάρων, που είναι συνεπές με μία άλλη *in vitro* μελέτη καλλιέργειας κοκκιωδών κυττάρων, στην οποία φάνηκε πως η εξωγενής χορήγηση AMH ελάττωσε την έκφραση της αρωματάσης και τον αριθμό των υποδοχέων της LH (di Clemente et al., 1994). Με βάση την παρατήρηση αυτή, έχει υποτεθεί πως η AMH μπορεί να είναι ένας από τους εμπλεκόμενους παράγοντες για τον καθορισμό της ανταποκρισιμότητας των ωοθυλακίων στην FSH κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου (La Marca & Volpe, 2006).

Σε κάποιες μελέτες φάνηκε πως η AMH αναστέλλει την πρώτη μειωτική διαίρεση της διπλοταινίας των ωοκυττάρων σε ανώριμους αρουραίους (Ueno et al., 1988), αλλά αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες έρευνες. Επιπρόσθετα, *in vivo*, η AMH μπλόκαρε την διαφοροποίηση των ανθρώπινων κοκκιωδών-ωχρινικών κυττάρων (Kim et al., 1992), όπου η συγκέντρωση της AMH στο ωοθυλακικό υγρό ήταν αντιστρόφως ανάλογη των μιτωτικών δεικτών των κοκκιωδών κυττάρων (Seifer et al., 1993). Έτσι, η AMH

εμφανίζεται να έχει έναν αυτοκρινή ρόλο στην ωρίμανση των φυσιολογικών ωοθυλακίων. Έχειδειχθεί πως τα ωοκύτταρα ενισχύουν την ρύθμιση της έκφρασης της AMH στα κοκκιώδη κύτταρα με έναν τρόπο εξαρτημένο από την αναπτυξιακή κατάσταση του ωοκυττάρου (Salmon et al., 2004). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση πως τα αποθέματα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων μπορούν να ελέγξουν τα αποθέματα των αρχέγονων ωοκυττάρων μέσω της διαμόρφωσης της έκφρασης του ανασταλτικού παράγοντα AMH (La Marca & Volpe, 2006).

Η ανοσοϊστοχημική εξέταση του ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού επιβεβαιώνει την απουσία της χρώσης της AMH στα αρχέγονα ωοθυλάκια, μαζί και την υψηλή έκφραση της AMH στα πρωτογενή, δευτερογενή, πρώιμα και αρχικά ωοθυλάκια διαμέτρου <4mm. Η χρώση της AMH σταδιακά εξαφανίζεται στα ωοθυλάκια μεταξύ 4mm με 8mm (Weenen et al., 2004) (εικόνα 2). Σε μία πρόσφατη έρευνα επιβεβαιώθηκαν αυτά τα ευρήματα, αποδεικνύοντας πως η γονιδιακή έκφραση της AMH και της ολικής πρωτεΐνης της στο ωοθυλακικό υγρό αυξάνεται μέχρι να φτάσει το ωοθυλάκιο την διάμετρο των 8mm, μετά την οποία εμφανίζει μια απότομη πτώση (Jeppesen et al., 2013). Έχει αποδειχτεί πως τα ωοθυλάκια των 5-8mm συνεισφέρουν κατά ~60% στην κυκλοφορούμενη AMH. Αντιθέτως, τα προ-ωορρηκτικά ωοθυλακικά κύτταρα μεγαλύτερα των 10mm αποτυγχάνουν στην παραγωγή AMH (Jeppesen et al., 2013).

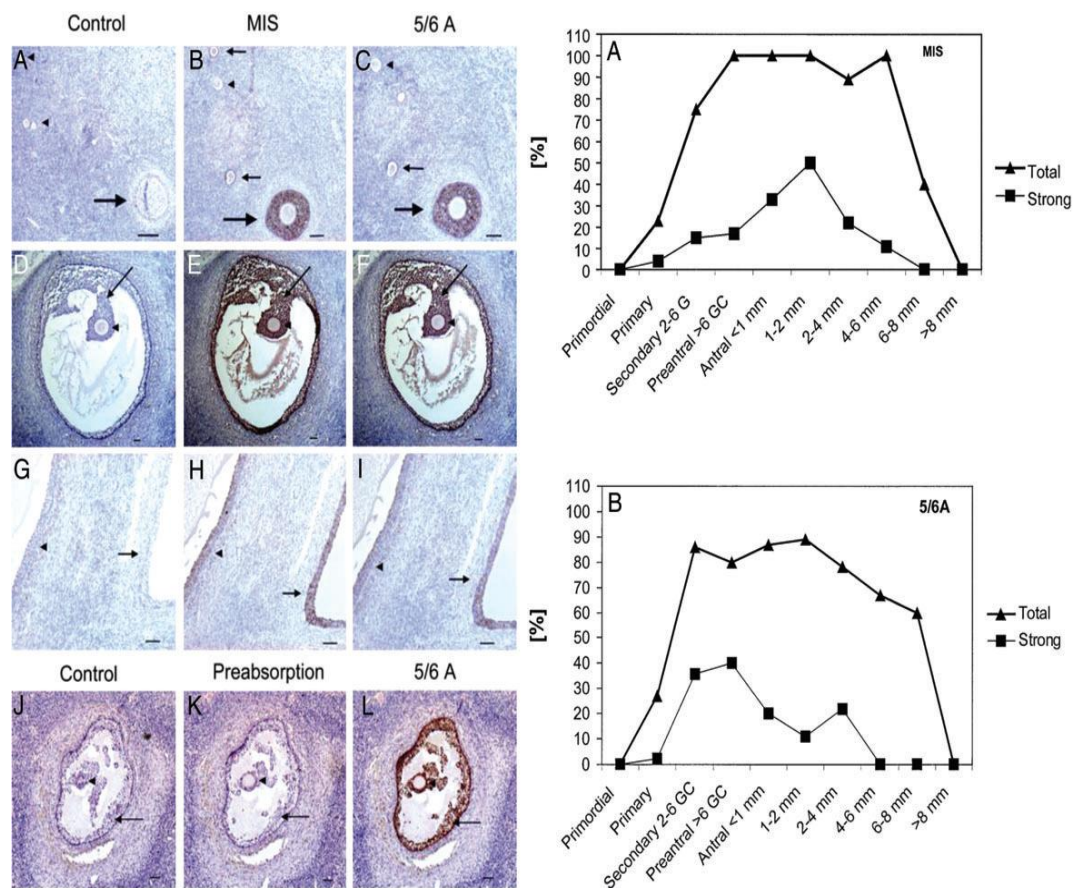
Σε πρωτόκολλα υπερδιέγερσης των ωοθηκών (όταν η πλειοψηφία των ωοθυλακικών άντρων εξελίσσεται σε μεγάλο κυρίαρχο ωοθυλάκιο), παρατηρείται μια σημαντική μείωση των επιπέδων της AMH στον ορό (Fanchin et al., 2003). Επιπλέον, με την αύξηση της ηλικίας αυξάνονται τα κυρίαρχα ωοθυλάκια, γεγονός που μπορεί να έχει μια αρνητική συσχέτιση με την AMH (Bentzen et al., 2013). Συμπερασματικά, η AMH της περιφερικής κυκλοφορίας προέρχεται κυρίως από τα άντρα των ωοθυλακίων. Με δεδομένο πως αυτός ο αριθμός σχετίζεται αναλογικά με την δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων, εμμέσως, η AMH αντιπροσωπεύει το ωοθηκικό αποθεματικό (Gougeon, 1984).

Η πρόωρη ανάπτυξη του ωοθυλακίου, πριν τη στράτευση του δευτερογενούς ωοθυλακίου, είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη της γοναδοτροπίνης (Fauser & Van Heusden, 1997). Τα επίπεδα της AMH στον

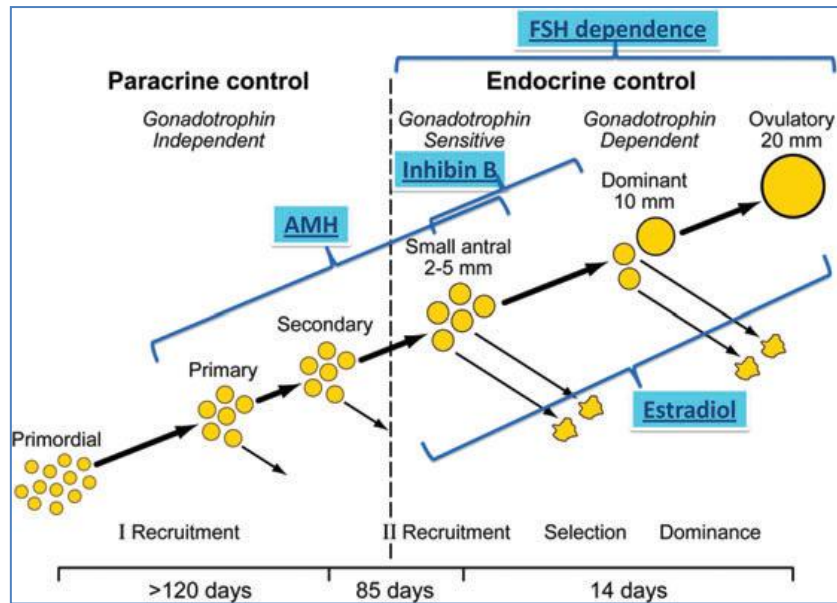
ορό δεν επηρεάζονται από την ανάπτυξη των κυρίαρχων ωοθυλακίων κατά την ύστερη ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού έμμηνου κύκλου. Αυτό καθιστά εύκολη την κλινική χρήση της AMH, σε αντίθεση με άλλους, επί του παρόντος, διαθέσιμους δείκτες της ωοθηκικής γήρανσης, όπως είναι οι Β-αναστολείς, η οιστραδιόλη (E_2) και η FSH, που είναι όλοι εξαρτώμενοι από τον έμμηνο κύκλο (εικόνα 3), και που συνιστούν σχετικά αργούς δείκτες της συνεχιζόμενης εξάντλησης των αποθεμάτων των αρχέγονων θυλακίων (Broer et al., 2014).

Ένας αριθμός επιπρόσθετων μελετών έχει επιβεβαιώσει πως τα επίπεδα της AMH στον ορό ελαττώνονται με την αύξηση της χρονολογικής ηλικίας. Στις γυναίκες από 21 ετών και πάνω ο μέσος όρος της ελάττωσης έχει υπολογιστεί σε 5.6% (Bentzen et al., 2013). Μια επιπλέον απόδειξη της αξίας της AMH στην άμεση αντανάκλαση του μεγέθους των αποθεμάτων των αρχέγονων ωοθυλάκων προέρχεται από μια μελέτη 42 γυναικών που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή λόγω καλοηθών γυναικολογικών αιτιών. Έπειτα από τον υπολογισμό με βάση την ηλικία, τόσο η AMH όσο και ο AFC είχαν καλή συσχέτιση με τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων του ωοθηκικού ιστού (Hansen et al., 2011).

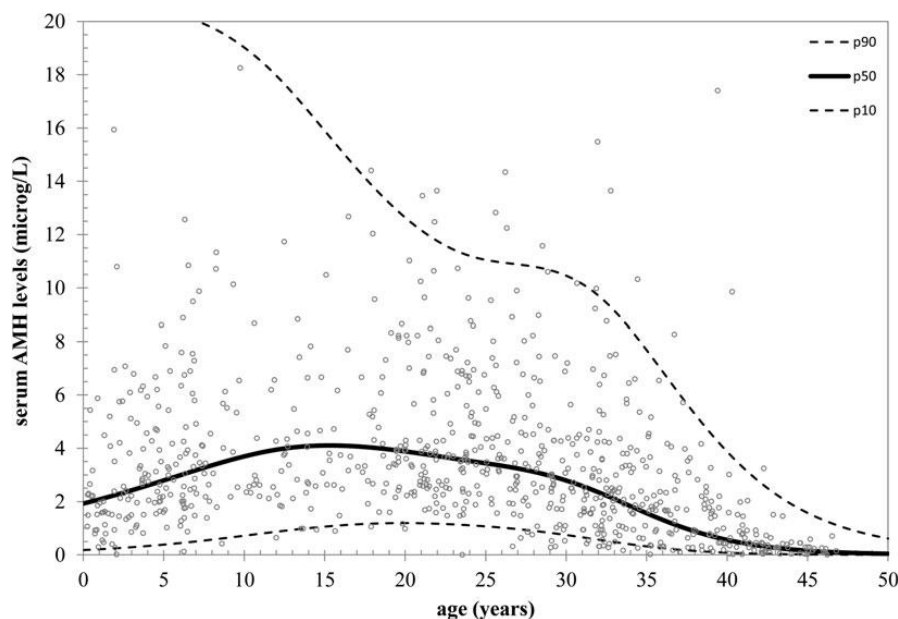
Υπάρχει σημαντική ατομική μεταβλητότητα στην ωοθηκική γήρανση, που πιθανολογείται ότι είναι αποτέλεσμα των διαφορών στην ελάττωση των ωοθυλακικών αποθεμάτων, καθώς υπάρχει μεγάλο εύρος ηλικιών φυσιολογικής εμμηνόπαυσης, από 40-60 ετών (Broekmans et al., 2009, te Velde & Pearson, 2002). Μερικές γυναίκες μπορεί στην ηλικία των 35 ετών να εμφανίζονται με πολύ πιο προχωρημένη ωοθηκική γήρανση σε σχέση με άλλες, όπως για παράδειγμα η συγκέντρωση της AMH να είναι παρόμοια με τα μέσα επίπεδα γυναικών 45 ετών (Kelsey et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί διάφορα νομογράμματα των φυσιολογικών επιπέδων της AMH από την γέννηση έως και την εμμηνόπαυση (Kelsey et al., 2011, Nelson et al., 2011a, b). Συνολικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν πως τα επίπεδα της AMH είναι χαμηλά κατά την προεφηβική ηλικία, αυξάνουν κατά την πρώιμη εφηβεία και φτάνουν σε ένα πλατό στα 20-25 χρόνια ηλικίας, όπου από εδώ και έπειτα ακολουθεί μια σταδιακή ελάττωση μέχρι να καταστεί μη ανιχνεύσιμη περίπου στην εμμηνόπαυση (εικόνα 3) (Hagen et al., 2010, Kelsey et al., 2011, Lie Fong et al., 2012).



Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική χρώση της AMH από ανθρώπινο ωθητικό ιστό, μαζί με τα γραφικά δεδομένα (Weenen et al., 2004). Αριστερά: μικρογραφία της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της AMH. Ειδική (καφέ) εναπόθεση της AMH στο κυτταρόπλασμα των κοκκιωδών κυττάρων (GC). Κλίμακα:100mm. Οι τομείς A, D και G είναι ελέγχου, οι τομείς B, E και H είναι σημασμένοι με C-20 αντίσωμα του MIS, οι τομείς C, F και I με την χρήση του αντισώματος 5/6A. **(A–C)** 3100 μεγέθυνση, με κατά σειρά ένα αρχέγονο ωθυλάκιο (καμία ανοσοχρώση του κυτταροπλάσματος των κοκκιωδών κυττάρων), ένα πρωτογενές ωθυλάκιο (φυσιολογική χρώση +) και ένα δευτερεύων ωθυλάκιο (ισχυρή χρώση ++). **(D–F)** 340 μεγέθυνση, με ένα μικρό ωθυλακικό άντρο 1 mm. Το ωκύτταρο δείχνει ασθενή χρώση ενώ τα κοκκιώδη κύτταρα έντονη χρώση (++). **(G–I)** 3100 μεγέθυνση, αριστερά ωθυλάκιο 6,1mm με ασθενή χρώση (+/±) των κοκκιωδών κυττάρων, δεξιά μικρότερο ωθυλάκιο 2,5mm με φυσιολογική χρώση (+). **(J–L)** 340 μεγέθυνση, με μικρό ωθυλακικό άντρο 1mm. το ωκύτταρο δείχνει μια αδύναμη, μη ειδική καφέ χρώση. Τα κοκκιώδη κύτταρα με τα 5/6A αντισώματα δείχνουν ισχυρή χρώση (++). Όταν το πεπτίδιο προστίθεται στο αντίσωμα δεν συμβαίνει καμία ανοσοϊστοχημική χρώση (K). Δεξιά: γραφική περίληψη των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων. Η χρώση αυξάνει ταχύτατα με τα ωθυλακικά στάδια και μειώνεται όταν τα ωθυλάκια είναι 0,4 έως 6mm. Επάνω γραφική παράσταση (A) χρώση με αντίσωμα MIS. Κάτω γραφική παράσταση (B), χρώση με το 5/6A αντίσωμα.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων με έμφαση στην παραγωγή της AMH στα πρώιμα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης (χαρακτηρίζεται από την ανεξάρτητη ανάπτυξη της γοναδοτροπίνης), σε αντίθεση με τον B-αναστολέα και την οιστραδιόλη που παράγονται σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων, όπου η ανάπτυξη είναι εξαρτώμενη από την FSH (McGee & Hsueh (2000)).



Εικόνα 4. Μονόγραμμα της AMH από την γέννηση έως την εμμηνόπαυση σε 804 υγιείς γυναίκες. Οι γραμμές αναφοράς της AMH στον ορό για την 10^η, 50^η και 90^η εκατοστιαία θέση των προβλεπόμενων, σχετικών με την ηλικία, τιμών της AMH (Lie Fong et al., 2012).

Έως τώρα δεν έχει γίνει κατανοητό γιατί τα επίπεδα της AMH αυξάνουν κατά την διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας. Ως την πιο πιθανή

εξήγηση έχουν προταθεί οι αλλαγές στον υποθαλαμικό-υποφυσιακό-ωοθηκικό άξονα, μαζί με τις διαφορές στην δυναμική της πρώιμης ωοθυλακικής στράτευσης και της ωοθηκικής ανάπτυξης (Buzi et al., 1998). Από αυτά φαίνεται πως η AMH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκτασης της ωοθηκικής γήρανσης σε γυναίκες μετά το 25^ο έτος της ηλικίας τους.

1.3 Ο ρόλος της AMH στην στεροειδογένεση

Έχει προσφάτως αναφερθεί πως η AMH ρυθμίζει την ωοθηκική στεροειδογένεση. Στην έρευνα του Grossman et al. (2008) φάνηκε πως η AMH αναστέλλει την έκφραση της εξαρτώμενης από την FSH αρωματάσης και την παραγωγή οιστραδιόλης. Έχει επίσης επιβεβαιωθεί η αρνητική σχέση της AMH με την δραστικότητα της αρωματάσης, αναφέροντας πως η γονιδιακή έκφραση της AMH και η συγκέντρωση της AMH στο ωοθυλακικό υγρό ήταν αρνητικά σχετιζόμενα με την συγκέντρωση της οιστραδιόλης (Jeppesen et al., 2013) και την έκφραση των CYP19A1 mRNA στα αντίστοιχα κοκκιώδη κύτταρα (Nielsen et al., 2010).

Η AMH αναστέλλει της δραστικότητα της FSH μέσω της σύνδεσης των ειδικών αναστολέων της, καθώς η απενεργοποίηση του τύπου II υποδοχέα της AMH αναστρέφει την αρνητική δράση της AMH στο ένζυμο της αρωματάσης (Chang et al., 2013).

Η έρευνα του Pellat et al. (2011) συνέβαλε σε πολύ μεγάλο βαθμό στην αποσαφήνιση της οδού της AMH στην ρύθμιση της στεροειδογένεσης. Πράγματι, έδειξε πως η AMH ελάττωσε την ευαισθησία των GC στην FSH, με την μείωση της έκφρασης της εξαρτώμενης από την FSH αρωματάσης και την δραστικότητα διαμέσου της αναστολής της δραστηριότητας του προωθητή II και της μείωσης του αριθμού των υποδοχέων της FSH.

Επίσης, μια έρευνα έδειξε πως είναι πιθανόν η AMH να ρυθμίζει την απόκριση στις γοναδοτροπίνες FSH και LH. Ειδικότερα, η AMH εμποδίζει την ενεργοποίηση των κλειδιών γονιδίων της στεροειδογένεσης, όπως το CYP19A1 και P450scc. (Sacchi et al., 2016). Το P450scc ανήκει στην υπεροικογένεια των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (οικογένεια 11, υποοικογένεια A, πολυπεπτίδιο 1). Οι πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 είναι μονο-οξυγενάσες που καταλύουν πολλές αντιδράσεις που σχετίζονται με την σύνθεση της χοληστερόλης και των στεροειδών. Εδράζεται στην

εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και καταλύει την μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη. Μαζί με την αρωματάση CYP19A1, το κυτόχρωμα P450scc είναι απαραίτητο στην ρύθμιση της οιστραδιόλης και της παραγωγής προγεστερόνης μέσα στην ωοθήκη (Sacchi et al., 2016).

Η διέγερση των GC με FSH προκαλεί την συσσώρευση P450scc mRNA στα κοκκιώδη κύτταρα χοίρων (Urban et al., 1991) και ανθρώπων (Voutilainen et al., 1986), ενδεχομένως με την μεσολάβηση της αυξημένης γονιδιακής μεταγραφής του P450scc. Πράγματι, η επώαση με hCG, FSH, και διβουτυρυλ-cAMP αύξησε την συσσώρευση των mRNA και την έκκριση προγεστερόνης (Voutilainen et al., 1986).

Οι δύο γοναδοτροπίνες φαίνεται που δρουν διαφορετικά στα δυο επίπεδα του γονιδίου. Πράγματι, έχει φανεί πως τόσο η FSH όσο και η LH διεγείρουν έντονα την έκφραση των CYP19A1 mRNA και την παραγωγή οιστραδιόλης στα ώριμα κοκκιώδη κύτταρα, ενώ η έκφραση των P450scc mRNA και η σύνθεση προγεστερόνης ήταν ασθενώς επαγόμενα της FSH. Έτσι, η μέγιστη σύνθεση συνέβη μόνο σε παρουσία LH (Yong et al., 1994). Ωστόσο, τα ώριμα ωχρινικά κύτταρα μπορεί να μην αντανakλούν την κατάσταση *in vivo*, καθώς τα κύτταρα αυτά δεν εκκρίνουν πλέον AMH, και εκτίθενται μόνο στα χαμηλά επίπεδα AMH του προ-ωορρηκτικού υγρού (Sacchi et al., 2016).

1.4 Δοκιμασίες της AMH

Κατά την δεκαετία του 2010, στις μελέτες των ανθρώπινων θηλέων χρησιμοποιούνταν δυο διαφορετικές δοκιμασίες AMH. Αυτές οι δοκιμασίες αναπτύχθηκαν ταυτόχρονα από το Diagnostic Systems Laboratory (DSL) και το Immunotech (IOT), με την εφαρμογή διαφορετικών αντισωμάτων της AMH (Nelson & La Marca, 2011). Μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες πηγές για το πρότυπο βαθμονόμησης της AMH και δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο διεθνές πρότυπο. Η δοκιμασία του IOT παράγει συγκεντρώσεις AMH ~40% υψηλότερες αυτών του DSL, καθιστώντας προβληματικές τις συνδυασμένες αναλύσεις των δοκιμών που χρησιμοποιούν διαφορετικές δοκιμασίες (Freour et al., 2007).

Το 2010 και οι δύο εταιρείες συγχωνευτήκαν υπό την Beckman Coulter, και εισήχθη μια νέα ενιαία δοκιμασία, δυο σταδίων, ενζυματικής

μικροπλάκας τύπου σάντουιτς (η δοκιμασία AMH γενιάς II). Σήμερα χρησιμοποιείται ένα πιο σταθερό αντίσωμα για δέσμευση στην ώριμη περιοχή της AMH, μαζί με ένα πρότυπο βαθμονόμησης του IOT, και τα επίπεδα της AMH μπορούν να μετρηθούν σε 20ml ορού, σε 3 ώρες (Fleming & Nelson, 2012). Η δοκιμασία γενιάς II βαθμολογείται με το παλιό πρότυπο του IOT και έτσι τα επίπεδα της AMH είναι συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα της δοκιμασίας IOT και 40% υψηλότερα αυτών της προηγούμενης DSL έκδοσης (Fleming & Nelson, 2012, Kumar et al., 2010, Wallace et al., 2011). Η δοκιμασίας γενιάς II έχει 2 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία (0.08 ng/ml) από την δοκιμασία IOT και οι διασταυρούμενες αντιδραστικότητες της ανασταλίνης A, της ακτιβίνης A, της FSH και LH ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας were (Kumar et al., 2010).

Έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες για την διερεύνηση του εύρους της δοκιμασίας γενιάς II σε κλινικές εφαρμογές. Αυτές οι μελέτες έχουν καθορίσει διάφορους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Οι ενδο/μεταξύ δοκιμασίας διαφορές, μεταξύ των εργαστηρίων και της σταθερότητας του δείγματος κατά την αποθήκευση, μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες. Όσο αναφορά την επαναληψιμότητα της νέας δοκιμασίας, σε διάφορες μελέτες οι ενδο/μεταξύ της δοκιμασίας διακυμάνσεις έχει φανεί πως είναι μικρές (<5%), όταν οι μετρήσεις γινόταν στο ίδιο εργαστήριο (Kumar et al., 2010, Rustamov et al., 2012). Ωστόσο, όταν σε 10 εργαστήρια δοκιμάστηκαν 20 δείγματα ορού με την ίδια δοκιμασία γένους II από τη Beckman Coulter, η ενδο-εργαστηριακή επαναληψιμότητα ήταν καλή, αλλά τα αποτελέσματα μεταξύ των εργαστηρίων έδειξαν ένα μεγάλο εύρος μέσων τιμών σε σχέση με την τιμή συναίνεσης. Αυτές οι διαφορές μπορεί να αντιπροσωπεύουν διαφορές στην αποθήκευση και την μεταφορά, ή διαφορές στην χρήση του εγχειριδίου της δοκιμασίας ELISA (Zuvela et al., 2013).

Όταν εξετάζεται η εντός-δείγματος σταθερότητα και επαναληψιμότητα, παρατηρούνται αντικρουόμενα αποτελέσματα που αφορούν τις διαφορές στις συνθήκες αποθήκευσης. Μια πρώτη έρευνα έδειξε ένα καλό δείγμα σταθερότητας και επαναληψιμότητας της δοκιμασίας γενιάς II, ακόμη και μετά την ψύξη και την απόψυξη (Kumar et al., 2010). Αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη έρευνα που έδειξε μια πολύ υψηλή διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων,

που ανέρχεται σε ένα συντελεστή μεταβλητότητας έως και πάνω από 60% (Rustamov et al., 2012). Η εξήγηση αυτού μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Όσο αναφορά στην αποθήκευση και στον χειρισμό των δειγμάτων, φάνηκε πως σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες, τα επίπεδα της AMH στον ορό αυξήθηκαν. Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους -20°C έδωσαν κατά μέσο όρο 23% υψηλότερες μέσες τιμές, ενώ τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους -28°C δεν έδειξαν κάποια διαφορά (Rustamov et al., 2012). Μια άλλη εξήγηση της αστάθειας του δείγματος μπορεί να είναι η επίδραση της συμπληρωματικής δέσμησης. Εξαιτίας της παρέμβασης του συμπληρώματος τα αποτελέσματα της δοκιμής μπορεί να είναι μικρότερα από τα αναμενόμενα. Αυτός ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος σε δείγματα που έχουν προσφάτως στεγνώσει. Έχει προταθεί πως αυτό μπορεί να αποφευχθεί ή να ελαττωθεί με την πρόσθεση ρυθμιστικών διαλυμάτων, και πρόσφατες μελέτες έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα με την προ-μείξη των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα για τον προσδιορισμό της σταθερότητας της AMH σε όλες τις θερμοκρασίες (συνάντηση ESHRE στο Λονδίνο, 2013). Επίσης, η εντός 5ώρου αυτόματη αναρρόφηση και φυγοκέντριση των δειγμάτων φαίνεται πως ελαττώνει την επίδραση του συμπληρώματος δέσμησης (Fleming & Nelson, 2012).

Έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα δεδομένα για την νέα Anhs Labs και picoAMH ELISA υπέρ-ευαίσθητη δοκιμασία AMH (Welsh et al., 2014). Η έδειχνα δείχνει πως η δοκιμασία αυτή έχει διαφορετική βαθμονόμηση σε σχέση με την γενιάς II, αλλά η εφαρμογή της είναι κατάλληλη για την κλινική χρήση της. Η ενισχυμένη σταθερότητα της Anhs Labs και picoAMH ELISA δοκιμασίας δίνει την δυνατότητα για την μέτρηση χαμηλών συγκεντρώσεων AMH. Ωστόσο, είναι απαραίτητες περαιτέρω μελέτες της σταθερότητας της νέας αυτής δοκιμασίας από διαφορετικά κέντρα (Welsh et al., 2014).

Συμπερασματικά, παραμένει ασαφής η σταθερότητας της δοκιμασίας AMH, ιδιαίτερα όσο αναφορά την ιδανική αποθήκευση και τις συνθήκες χειρισμού των δειγμάτων, όπως επίσης και του ρόλου της επίδρασης των συμπληρωμάτων δέσμησης στην αστάθεια του δείγματος. Μέχρι να ερευνηθούν εκτενώς αυτοί οι παράγοντες ή η δυνατότητα μιας αυτόματης δοκιμασίας, είναι απαραίτητες οι διεθνείς οδηγίες για όλα τα εργαστήρια αναφορικά με την αποθήκευση των δειγμάτων και της εκτέλεσης των

δοκιμασιών AMH κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ώστε η επίδραση της τεχνικής χειρισμού στην πρόκληση διαφορετικών αποτελεσμάτων της AMH να μην απαιτεί την κλινική διαχείριση. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός διεθνούς παρασκευάσματος αναφοράς, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα των ερευνών. Μια άλλη δυνατότητα θα μπορούσε να είναι η χρήση εναρμονισμένου δείγματος, όπου κάθε εργαστήριο να μπορεί να συγκρίνει τις δικές του μετρήσεις. Μέχρι τότε, θα πρέπει να γίνεται με προσοχή η μετάφραση των ορίων της AMH από τις μελέτες στην κλινική πράξη, καθώς δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο είναι δυνατή η άμεση μετάφραση των τιμών της AMH από τα ερευνητικά έργα στην καθημερινή πρακτική (Schipper et al., 2012).

1.4.1 Παράγοντες επηρεασμού των επιπέδων της AMH

Οι διακυμάνσεις στα επίπεδα της AMH θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τις βιολογικές διακυμάνσεις. Έχουν περιγραφεί αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφορικά με τις ενδο-και δια-κυκλικές διακυμάνσεις των επιπέδων της AMH. Κάποιες μελέτες δείχνουν πως αυτό θα πρέπει να περιοριστεί (Van Disseldorp et al., 2010) και πιθανώς να αντιπροσωπεύουν τυχαίες διακυμάνσεις, που να σχετίζονται με τις σταδιακές αλλαγές στον αριθμό των ωοθυλακίων και στις δυο ωοθήκες (Hehenkamp et al., 2006). Ωστόσο, άλλες έρευνες έχουν δείξει σημαντικές διακυμάνσεις στον έμμηνο κύκλο (Wunder et al., 2007), που συνηγορούν για την μέτρηση των επιπέδων AMH μόνο νωρίς στην ωοθυλακική φάση. Ιδιαίτερα στις νέες γυναίκες, αυτή η διακύμανση της AMH μέσα σε μια περίοδο αρκετών εβδομάδων, μπορεί να είναι αρκετά εκτεταμένη και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη εάν εφαρμόζεται σε κλινικές καταστάσεις (Overbeek et al., 2012).

Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι κλινικές καταστάσεις στις οποίες λαμβάνεται το δείγμα. Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα της AMH παραμένουν συνεχώς κάτω από την επίδραση των εξωγενών στεροειδών που χρησιμοποιούνται για αντισύλληψη (Deb et al., 2012, Li et al., 2011, Somunkiran et al., 2007, Steiner et al., 2010, Streuli et al., 2008). Σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη σε >2000 γυναίκες, φάνηκε πως τα επίπεδα της AMH ελαττώνονται με την από του στόματος χρήση αντισυλληπτικών (Dolleman et al., 2013b). Τέτοιου είδους επίδραση έχει δειχθεί και σε άλλες

έρευνες (Arbo et al., 2007, Kristensen et al., 2012, Shawet al., 2011). Η προηγούμενη χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών δεν σχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα της AMH (Dolleman et al., 2013b), και τα επίπεδα της AMH μπορεί ακόμη και να αυξηθούν μετά την διακοπή τους (van den Berg et al., 2010). Και τα δύο αυτά ευρήματα υποστηρίζουν την αναστρέψιμη κατασταλτική επίδραση των από του στόματος αντισυλληπτικών στην AMH.

Έχει επίσης αποδειχθεί πως η χορήγηση GnRH αγωνιστών κατά το μέσο του κύκλου, μπορεί να αλλάξει σημαντικά τα επίπεδα της AMH κατά τις επόμενες 4 εβδομάδες (Hagen et al., 2012a, Su et al., 2013). Αυτού του είδους οι παρατηρήσεις, προτείνουν πως αν μια ασθενής έχει λάβει αγωγή με GnRH αγωνιστές, για παράδειγμα για θεραπεία του καρκίνου, η AMH ίσως να μην αποτελεί αξιόπιστο δείκτη των ωοθηκικών αποθεμάτων (Broer et al., 2014).

Τέλος, πρόσφατα έχουν περιγραφεί διάφοροι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις απόλυτες συγκεντρώσεις της AMH, συμπεριλαμβανομένων της παχυσαρκίας (Buyuk et al., 2011, Freeman et al., 2007, Piouka et al., 2009b, Su et al., 2008), της εθνικότητας (Seifer et al., 2009), των επιπέδων της βιταμίνη D (Dennis et al., 2012, Merhi et al., 2012), των πολυμορφισμών της AMH και των υποδοχέων τους (Kevenaar et al., 2007), και γενετικών παραλλαγών του γονιδιώματος (Schuh-Huerta et al., 2012). Πρόσφατα, έχει συσχετιστεί και το κάπνισμα με χαμηλότερα επίπεδα της AMH (Dolleman et al., 2013b). Μένει να αποδειχτούν αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις.

2. Η AMH στις λειτουργίες των ωοθηκών

2.1 Δοκιμασίες ωοθηκικού αποθέματος

Οι δοκιμασίες του ωοθηκικού αποθέματος χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της αναπαραγωγικής ικανότητας ενός ατόμου, καθώς επίσης την ποσότητα και την ποιότητα των εναπομείναντων ωοκυττάρων. Τα στοιχεία δείχνουν πως η AMH για την ώρα αποτελεί την καλύτερη δοκιμασία σε όρους ευαισθησίας και ειδικότητας, σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις των AFC, FSH, E2 και ανασταλίνης B ή των διαφόρων δοκιμασιών πρόκλησης των ωοθηκών (Practic Committee ASRM, 2012). Υπάρχουν διαφορετικές περιοχές στην αναπαραγωγική ιατρική, όπου οι δοκιμασίες ωοθηκικού αποθέματος με την χρήση της AMH μπορεί να αποδειχτούν με κλινικό όφελος.

Η εξάντληση των ωοθηκικών αποθεμάτων έχει αναφερθεί σε μια ποικιλία κλινικών καταστάσεων. Γυναίκες που γεννήθηκαν μικρές για την ηλικία κύησης (Sir-Petermann et al., 2010), γυναίκες με διαβήτη τύπου I (Soto et al., 2009), γυναίκες που υποφέρουν από τη αυτό-άνοση νόσο του ερυθρελάτου (Lawrenz et al., 2011), γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε χειρουργεία των ωοθηκών (μερική ωοθηκεκτομή σε ενδομητρίωση) (Raffi et al., 2012) ή σε εμβολισμό των μητριάων αρτηριών λόγω ινομυωμάτων (Berkane & Moutafoff-Borie, 2010), διατρέχουν κίνδυνο για διάφορου βαθμού ελάττωσης των ωοθηκικών αποθεμάτων τους. Η πρόσφατη παρατήρηση των ελαττωμένων επιπέδων AMH και της σημαντικά μικρότερης ηλικίας φυσικής εμμηνόπαυσης σε ασθενείς με το γονίδιο BRCA1/2 (Titus et al., 2013) υπογραμμίζουν την ανάγκη της σημασίας των δοκιμασιών ωοθηκικού αποθέματος σε αυτές τις συγκεκριμένες ομάδες. Τέλος, τόσο τα δεδομένα γονιμότητας, όσο και τα ελαττωμένα επίπεδα AMH δείχνουν μια επιτάχυνση της γήρανσης των ωοθηκών σε ψηλές γυναίκες που αντιμετωπίστηκαν με υψηλές δόσεις οιστρογόνων κατά την εφηβεία ώστε να ελαττωθεί το ύψος τους κατά την ενηλικίωση (Hendriks et al., 2011, 2012).

Εκτός της προγνώσεως της ηλικίας εμμηνόπαυσης για τον συσχετισμό της με την διαδικασία ελάττωσης της φυσικής γονιμότητας, η πρόγνωση της εμμηνόπαυσης μπορεί γενικά να έχει επιπλοκές για την γυναικεία υγεία. Είναι γνωστό πως η ηλικία της εμμηνόπαυσης σχετίζεται με πολλές γενικές καταστάσεις υγείας, όπως είναι η οστεοπόρωση, ο καρκίνος του μαστού, οι

γνωστικές παθήσεις και η νόσος του Alzheimer, καρδιοαγγειακές παθήσεις και ισχαιμικά επεισόδια (De Vos et al., 2010). Η ικανότητα της πρόβλεψης της εμμηνόπαυσης με την εκτίμησης της AMH σε σχετικά νεαρή ηλικία μπορεί να βοηθήσει στον σχεδιασμό προγραμμάτων ελέγχου και πρόληψης με βάση το πρότυπο κινδύνου της κάθε γυναίκας ξεχωριστά. Πράγματι, για πρώτη φορά έχει πρόσφατα περιγραφεί η σχέση μεταξύ της AMH και του κινδύνου αθηροσκλήρωσης σε μοντέλα ποντικών (Arpt et al., 2012).

2.2 Πρόβλεψη της εμμηνόπαυσης

Η εμμηνόπαυση, το μόνο αξιοσημείωτο σημάδι του τέλους της γυναικείας αναπαραγωγικής ζωής, συνήθως εμφανίζεται κατά την ηλικία των 51 ετών. Ωστόσο, η ηλικία της εμμηνόπαυσης παρουσιάζει σημαντικές ατομικές διαφορές μεταξύ των ηλικιών 40 με 60 χρόνων, με ~10% των γυναικών να εμφανίζουν εμμηνόπαυση πριν από τα 45 χρόνια. Πιστεύεται η ύπαρξη μιας σταθερής σχέσης μεταξύ του τέλους της φυσικής γονιμότητας και της εμμηνόπαυσης, με το τέλος της φυσικής γονιμότητας να προβλέπει την εμμηνόπαυση έπειτα από ~10 χρόνια (Broekmans et al., 2007, te Velde & Pearson, 2002). Αυτό σημαίνει πως μια γυναίκα με εμμηνόπαυση στα 43 χρόνια φτάνει στο τέλος της φυσικής της γονιμότητας στην ηλικία των 33 ετών, χωρίς να εμφανίσει κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή, όπως θα ήταν μια ανωμαλία στον έμμηνο κύκλο. Λαμβανομένων των τρεχουσών δεδομένων της καθυστερημένης τεκνοποίησης του πρώτου παιδιού, είναι επόμενο πως ειδικά αυτές οι γυναίκες έρχονται αντιμέτωπες με την υπογονιμότητα και απαιτούν τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (assisted reproductive techniques-ART) για την επίτευξη κύησης (de Graaff et al., 2011). Έτσι γίνεται σαφής η χρησιμότητα της δυνατότητας υπολογισμού της διάρκειας των ωοθηκικών αποθεμάτων μέσα από την πρόβλεψη της ηλικίας της εμμηνόπαυσης (Stoop et al., 2011). Η ακριβής δοκιμασία των ωοθηκικών αποθεμάτων θα μπορούσε να κινητοποιήσει κάποιες από τις γυναίκες να ξεκινήσουν την οικογένεια τους σε νεαρότερη ηλικία (ή διαφορετικά να καταφύγουν σε κατάψυξη ωαρίων) ή διαφορετικά να καθησυχάσουν τους άλλους πως η μετάθεση της τεκνοποίησης δεν θα επηρεάσει τις πιθανότητες για την μετέπειτα σύλληψη (Broer et al., 2014).

Η εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45 ετών εμφανίζεται σε ένα ποσοστό ~5-14,3% των γυναικών του γενικού πληθυσμού, (Jacobsen et al., 1999, 2004, Vegetti et al., 2000), ενώ η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, που ορίζεται ως η εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 40 ετών, συμβαίνει στο 1-2% των γυναικών (Coulam et al., 1986, Vegetti et al., 2000). Σε γενικές γραμμές, οι γυναίκες δεν εμφανίζουν συμπτώματα εξαιτίας της ταχείας εξάντλησης των ωοθηκικών αποθεμάτων, εκτός από μια πιθανή ελάττωση του μήκους του έμμηνου κύκλου κατά την αναπαραγωγική ηλικία τους και την εμφάνιση υπογονιμότητας (Treloar et al., 1967).

Μέχρι σήμερα, η κληρονομικότητα της ηλικίας της εμμηνόπαυσης έχει υποδειχθεί από διάφορες μελέτες, που δείχνουν μια δυνατή συσχέτιση της εμμηνοπαυσιακής ηλικίας μεταξύ διδύμων, αδερφών, μητέρας και κόρης αντίστοιχα (Cramer et al., 1995, Morris et al., 2011, Torgerson et al., 1997, van Asselt et al., 2004, Vegetti et al., 2000). Στον γενικό πληθυσμό, οι γενετικοί παράγοντες θεωρούνται υπεύθυνοι για ~ 31–87% της ατομικής μεταβλητότητας της ηλικίας εμμηνόπαυσης (de Bruin et al., 2001, Voorhuis et al., 2011). Παρά το γεγονός πως διάφορες ειδικές, καλά-περιγραφόμενες καταστάσεις, όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η νόσος του Addison) και γενετικοί παράγοντες όπως οι διαταραχές του χρωμοσώματος X (π.χ. σύνδρομο εύθραυστου X και σύνδρομο Turner) έχουν σχετιστεί με πρόωρη ή πρώιμη εμμηνόπαυση, η πλειοψηφία των περιπτώσεων παραμένει αδιάγνωστη Although (Bentzen et al., 2012).

Σε πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί η ηλικιακή πτώση της AMH στον ορό και του AFC (de Vet et al., 2002, La Marca et al., 2010, van Disseldorp et al., 2008, Van Rooij et al., 2005, Voorhuis et al., 2011). Ο Bentzen et al. (2012), σε μια έρευνα γυναικών εργαζόμενων στην υγειονομική περίθαλψη ηλικίας 20-40 χρόνων, επιβεβαίωσε αυτήν την σχέση. Παρατήρησε μια μεγάλη μεταβλητότητα στους δείκτες του ωοθηκικού αποθέματος, αλλά παρά την μεταβλητότητα, εντοπίστηκαν σημαντικοί παράγοντες που σχετίζονταν με τους δύο κύριους δείκτες ωοθηκικού αποθέματος: την AMH και τον AFC. Ως εκ' τούτου, έδειξε πως η κατηγορία της ηλικίας της μητρικής εμμηνόπαυσης σχετιζόταν με τον ρυθμό της μείωσης των δεικτών ωοθηκικού αποθέματος, καθώς βρέθηκε μια πιο έντονη ετήσια πτώση της συγκέντρωσης της AMH

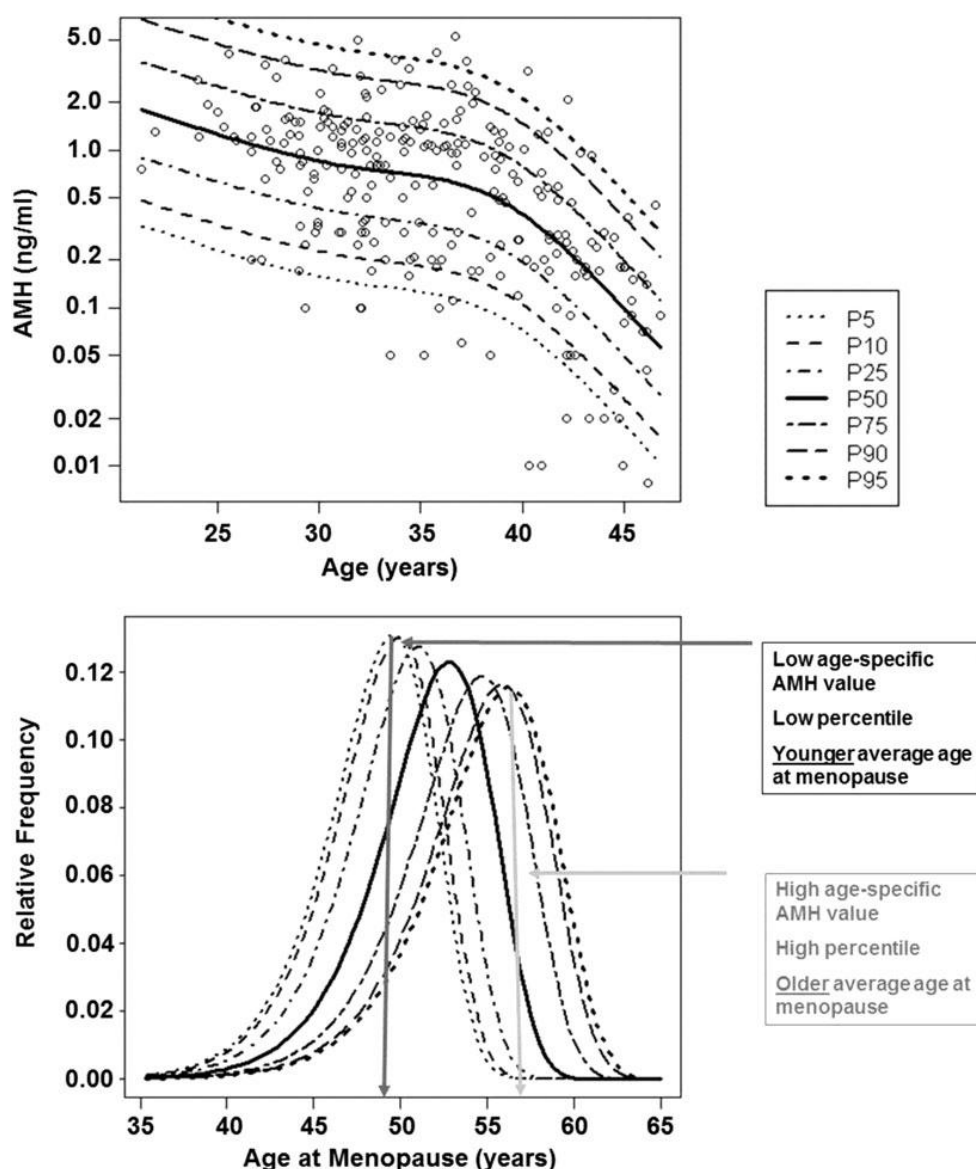
στον ορό και στον AFC στις γυναίκες με πρώιμη (≤ 45 ετών) ηλικία μητρικής εμμηνόπαυσης, σε σύγκριση με τις γυναίκες με όψιμη (≥ 55 ετών) ηλικία μητρικής εμμηνόπαυσης. Επιπρόσθετα, βρέθηκε πως το κάπνισμα της μητέρας κατά την διάρκεια της κύησης μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στα ωοθηκικά αποθέματα τους κορών τους, με όρους του AFC (Bentzen et al., 2012).

Ο Hansen et al. (2008, 2011), πρότεινε ένα συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό μείωσης των ωοθηκικών αποθεμάτων με την ηλικία. Σε μια άλλη έρευνα του Kelsey et al. (2012), καταδείχθηκε πως τα επίπεδα της AMH στον ορό σχετίζονται θετικά με τα μη αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (non-growing follicles -NGFs) σε γυναίκες ηλικίας 24.5–51 χρονών. Η ανάλυση των δεδομένων του βασίστηκε σε μια συστηματική συσσωμάτωση των δεδομένων από 8 μελέτες, στις οποίες ο συνολικός πληθυσμός των NGFs προέκυψε από την χειροκίνητη στερεολογική καταμέτρηση των NGF από ένα μικρό υποσύνολο ωοθηκικού ιστού, και σε 25 έρευνες που αναφέρονε τα κανονιστικά επίπεδα της AMH για κοορτές με περιορισμένο ηλικιακό εύρος. Λαμβανόμενα μαζί, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν πως η AMH του ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης του ωοθηκικού αποθέματος (Bentzen et al., 2012).

Μια πρώτη έρευνα σε 100 τυχαία επιλεγμένες γυναίκες ηλικίας 30-44 ετών, που επιθυμούσαν αυτόματη σύλληψη, εμφάνισε μια καλή συσχέτιση μεταξύ των αρχικών συγκεντρώσεων AMH και της φυσικής γονιμότητας κατά την διάρκεια 6μηνιας παρακολούθησης (Steiner et al., 2011). Μια τέτοιου είδους συσχέτιση δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί σε ένα συγκρίσιμο αριθμό νεότερων γυναικών μεταξύ 20 και 30 ετών (Hagen et al., 2012b). Απαιτούνται περισσότερα δεδομένα ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με την ικανότητα της AMH να προβλέπει την δυνατότητα μιας αυτόματης σύλληψης, ιδιαίτερα σε μικρότερες ηλικίες.

Έχει υποθεθεί πως υπάρχει ένα συγκεκριμένο διάστημα μεταξύ της ηλικίας της φυσικής στειρότητας και της ηλικίας της εμμηνόπαυσης (te Velde & Pearson, 2002). Το τελευταίο διάστημα, έχουν γίνει διάφορες μελέτες σχετικά με την πρόβλεψη της ηλικίας της φυσικής εμμηνόπαυσης. Σε μία μακροπρόθεσμη προοπτική μελέτη παρακολουθήθηκαν 257 γυναίκες για 11 χρόνια. Φάνηκε πως με την χρήση της ηλικίας και της AMH το εύρος της

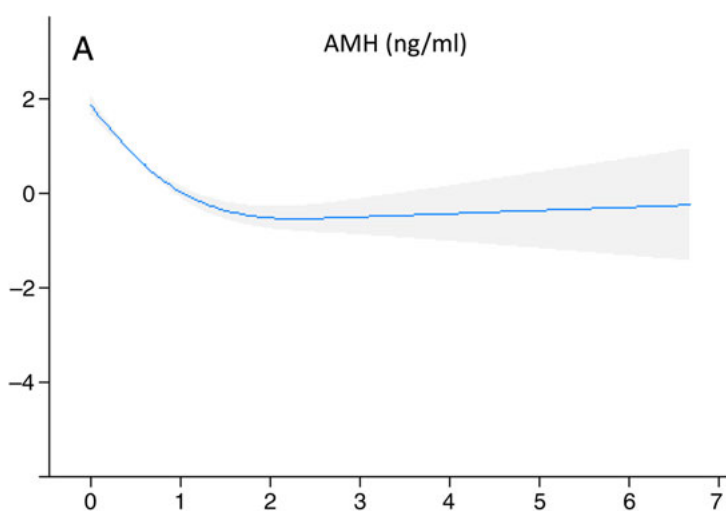
ηλικίας μέσα στην οποία θα συμβεί τελικά η εμμηνόπαυση μπορεί να υπολογιστεί εξατομικευμένα (εικόνα 5) (Broer et al., 2011).



Εικόνα 5. Διαγράμματα της σχέσης μεταξύ ηλικίας-ειδικών συγκεντρώσεων AMH και της διακύμανση της ηλικίας εμμηνόπαυσης. Τα επίπεδα της AMH μετρήθηκαν κατά την είσοδο στην έρευνα (n=257, μέσος όρος ηλικίας 35 έτη) (επάνω πάνελ) και της ηλικίας στην εμμηνόπαυση που εκτιμήθηκε 11 χρόνια αργότερα (κάτω πάνελ) (Broer et al. (2011).

Η AMH αποτελεί ορμόνη που εκκρίνεται αποκλειστικά από τα ωοθηκικά ωοθυλάκια και που έχει συστηματικά υποδειχθεί πως αντικατοπτρίζει την ηλικιακά-σχετιζόμενη μείωση των ωοθηκικών αποθεμάτων (Broekmans et al., 2006, Broekmans et al., 2007, Gruijters et al., 2003, Lee et al., 1996, van Rooij et al., 2002). Καθώς η έναρξη της εμμηνόπαυσης υποκινείται από την εξάντληση των ωοθυλακίων και λαμβανομένου πως η

AMH αντικατοπτρίζει το μέγεθος των εναπομεινάντων ωοθυλακίων, οι συγκεκριμένες ηλικιακές τιμές της AMH έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο σε προοπτικές όσο και σε αναδρομικές μελέτες, για την πρόβλεψη της ηλικίας κατά την οποία μια γυναίκα γίνεται μετα-εμμηνοπαυσιακή (Broer et al., 2011a, Dolleman et al., 2013a, Freeman et al., 2012, Tehrani et al., 2011, 2013, van Disseldorp et al., 2008). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως προσδιοριστικοί παράγοντες της εμμηνόπαυσης ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το κάπνισμα και το BMI (Dossus et al., 2012, Gold, 2011, Morris et al., 2012).



Εικόνα 6. Η σχέση μεταξύ της AMH και του κινδύνου της ηλικίας εμμηνόπαυσης (Dolleman et al., 2015).

Σε μια έρευνα του ο Dolleman et al. (2015) έδειξε πως σε σχέση με όλους τους σχετικούς προγνωστικούς παράγοντες της γονιμότητας, η ηλικία και η AMH είχαν την μεγαλύτερη συνεισφορά στην πρόγνωση της ηλικίας της εμμηνόπαυσης. Το σχήμα της σχέσης μεταξύ της AMH και της ηλικίας της εμμηνόπαυσης (εικόνα 6) δείχνει πως μια γυναίκα με AMH πάνω από 4 ng/ml ή και υψηλότερη θα έχει τον ίδιο κίνδυνο με μια γυναίκα με AMH 3 ng/ml. Ωστόσο, σε χαμηλότερα επίπεδα, κάτω των 1.5 ng/ml, η AMH εμφανίζει μια άμεση σχέση με την ηλικία της εμμηνόπαυσης, υποδεικνύοντας πως εδώ μια γυναίκα δεν είναι μόνο σε κίνδυνο, αλλά επίσης όπου τα ατομικά της επίπεδα AMH θα καθορίσουν το επίπεδο του προσωπικού της κινδύνου. Ένα άλλο εύρημα της έρευνας έδειξε πως στην περίπτωση αυτή το ποσό της

πρόσθετης αξίας της AMH ήταν πιο σημαντικό στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογικό έμμηνο κύκλο (Dolleman et al., 2015).

Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλες έρευνες (Freeman et al., 2012, Tehrani et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν ταυτοποιήσει την AMH ως έναν υποσχόμενο δείκτη πρόβλεψης της εμμηνόπαυσης, παρότι υπάρχουν ευρεία διαστήματα εμπιστοσύνης, ιδιαίτερα σε δείγματα νεότερων γυναικών. Έχουν αρχίσει πλέον να εμφανίζονται μεγάλες προοπτικές μελέτες, όπου ο προβλεπτικός ρόλος της AMH σε συνδυασμό με την ηλικία της γυναίκας και με άλλους πιθανούς παράγοντες, όπως το BMI και το κάπνισμα, θα μπορούν να παρουσιάσουν περισσότερες λεπτομέρειες (Dolleman et al., 2013a, La Marca et al., 2013).

3. AMH και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

3.1 Η πρόβλεψη σύλληψης σε υπογόνιμα ζευγάρια

Η προχωρημένη ηλικία της γυναίκας έχει εξελιχθεί σε σημαντικό ζήτημα στις κλινικές υπογονιμότητας. Οι δοκιμασίες ωοθηκικού αποθέματος μπορεί να επιτρέψουν την καλύτερη εκτίμηση της πιθανότητας γονιμοποίησης σε μια δεδομένη γυναίκα. Αυτό θα μπορούσε να επιτρέψει την κατάλληλη προσαρμογή του θεραπευτικού πλάνου, που θα μπορούσε να περιλαμβάνει και την μελλοντική αντιμετώπιση της γυναίκας με καλή πρόγνωση. Τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί πολλαπλές προσπάθειες για την ανάπτυξη ειδικών ηλικιακών διαγραμμάτων των συγκεντρώσεων της AMH, που να περιλαμβάνουν δεκάδες χιλιάδες υπογόνιμες γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (Leader et al., 2012, Nelson et al., 2011a, Seifer et al., 2011). Παρότι τα ειδικά-ηλικίας επίπεδα AMH μπορεί να έχουν την δυνατότητα μεγάλου κλινικού οφέλους, οι ανησυχητικές επιπτώσεις της ασυμφωνίας των ευρημάτων μεταξύ της AMH και της FSH (ιδιαίτερα ανώμαλες τιμές FSH που συμπίπτουν με καθησυχαστικά επίπεδα AMH συμβαίνουν σε 1 από 18 γυναίκες) παραμένουν να αντιμετωπιστούν, αλλά πιθανώς να τονίζουν την διαφορετική φύση των δύο δοκιμασιών (Leader et al., 2012, Schipper et al., 2012). Τελικά, πρέπει να λάβουν χώρα κλινικές μελέτες σε υπογόνιμα ζευγάρια που να συσχετίζουν τα μεμονωμένα επίπεδα της AMH, ανεξάρτητα από την χρονολογική ηλικία, με τα ποσοστά των ζώντων γεννήσεων, είτε μετά από φυσική σύλληψη είτε έπειτα από διάφορες θεραπείες υπογονιμότητας.

3.2 IVF

Όπως είναι γνωστό, η γυναικεία γονιμότητα ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας. Σύμφωνα με κάποια δεδομένα, η ατρησία του ωοθυλακικού αποθέματος επιταχύνεται στις γυναίκες ηλικίας 37-38 ετών. Οι αναλύσεις των αποτελεσμάτων των IVF της Αρχής Ανθρώπινης Γονιμότητας και Εμβρυολογίας (Human Fertilization and Embryology Authority-HFEA), δείχνουν πως ο αριθμός των ζώντων γεννήσεων για ηλικίες 40–42 ήταν 12.7, 5.1% για ηλικίες 43–44, και 1.5 % για γυναίκες ηλικίες 45 ή μεγαλύτερες (HFEA, 2010). Έχει αποδειχθεί πως η επιτυχία των IVF διεργασιών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικοί και

ανεξάρτητοι είναι: η ηλικία και οι συγκεντρώσεις της AMH στον ορό (Broer et al., 2009, Heidar et al., 2015, Iliodromiti et al., 2014, La Marka et al., 2010, Lukaszuk et al., 2015). Η AMH μπορεί επιτυχώς να προβλέψει την φτωχή απάντηση στην ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών. Τα δεδομένα δείχνουν ότι οι γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της AMH έχουν πιθανότητες κύησης (Lee et al., 2011).

Έχουν δημοσιευτεί πολλές έρευνες σχετικές με την πρόβλεψη της έκβασης της IVF με την χρήση δοκιμασιών ωοθηκικών αποθεμάτων, όπως η AMH. Οι έως τώρα δημοσιευμένες έρευνες που αφορούν την AMH και την ενδεχόμενη έκβαση της IVF έχουν διενεργηθεί σε ετερογενή δείγματα ασθενών. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα της AMH στην πρόβλεψη του θεραπευτικού αποτελέσματος. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα των μετρήσεων αφορά την απόκριση στην υπερδιέγερση των ωοθηκών. Η υπερδιέγερση των ωοθηκών αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της IVF και συνήθως εφαρμόζεται με ένα ομοιόμορφο τυποποιημένο τρόπο, ανεξαρτήτως των ατομικών χαρακτηριστικών του ασθενούς. Η πλειονότητα των εφαρμοζόμενων αγωγών διέγερσης είναι πολύπλοκες, χρονοβόρες και δαπανηρές. Συνήθως παρατηρείται μια ξεχωριστή ατομική μεταβλητότητα στην απόκριση των ωοθηκών στην διέγερση, που κυμαίνεται από χαμηλή ή έως και καμία απόκριση (που οδηγεί στην ακύρωση της θεραπείας ή σε πολύ φτωχά αποτελέσματα της IVF). Επιπλέον, υπάρχει σχέση μεταξύ του αριθμού των ληφθέντων ωοκυττάρων και της παρουσίας κύησης. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως μια απάντηση μεταξύ 9-13 ή 6-15 ωοκυττάρων σχετίζεται με τον υψηλότερο βαθμό κύησης ή ζώντων τοκετών (Ji et al., 2013, Sunkara et al., 2011, van der Gaast et al., 2006).

Οι ιατροί ενδιαφέρονται για την πρόγνωση της απάντησης στην υπερδιέγερση των ωοθηκών. Πρόσφατα έχουν δημοσιευτεί δυο μεμονωμένες μετα-αναλύσεις ασθενών που αφορούν την φτωχή και την υπερβολική πρόβλεψη της απόκρισης. Η πρώτη θεραπεία κύκλου IVF σε 5705 γυναίκες έδειξε πως η AMH, επιπρόσθετα της ηλικίας, προβλέπει την φτωχή απόκριση. Ακόμη πιο σημαντικό είναι το εύρημα πως από μόνο του ένα τεστ AMH καλύπτει πλήρως την πρόβλεψη της φτωχής απόκρισης με μια αποδεκτή περιοχή κάτω από την καμπύλη των λειτουργικών χαρακτηριστικών του

λήπτη (ROC) των 0.78 (Broer et al., 2013b). Τα αποτελέσματα από τον πρώτο κύκλο θεραπείας IVF σε 4700 γυναίκες ήταν διαθέσιμα για την ανάλυση της πρόβλεψης της υπερβολικής απόκρισης όπου και φάνηκε το ίδιο επίπεδο ακρίβειας (Broer et al., 2013a). Ως εκ τούτου, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα πως η AMH αποτελεί ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη της απόκρισης των ωοθηκών στην υπερδιέγερση τους.

Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν την δυνατότητα για κύηση και τοκετό σε γυναίκες με χαμηλή και πολύ χαμηλή AMH και μεγαλύτερες από 40 ετών. Ο Lee et al. (2011) δεν βρήκε καμία κλινική κύηση σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών με AMH <0.48 ng/mL. Στην έρευνα του Nelson et al. (2009), μια μικρή ομάδα 26 γυναικών με εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις AMH $\leq 0,15$ ng/ml δεν έδειξε κάποια κύηση κατά την διάρκεια των ανταγωνιστών ή της τροποποιημένης φυσικής IVF. Η ηλικία των γυναικών υπήρξε άνω των 44 ετών.

Αντίθετα, ο Weghofer et al. (2011), παρουσίασε μια αναδρομική μελέτη όπου φάνηκε ένα ποσοστό 1.7 % τοκετών ανά κύκλο για ασθενείς 42 ετών. Η τιμή αποκοπής για την AMH της έρευνας ορίστηκε ≤ 0.4 ng/ml. Οι πιθανότητες κύησης παρουσιάστηκαν επίσης από τον Łukaszuk et al. (2014), που έδειξε πως μεταξύ γυναικών με χαμηλή AMH (≤ 0.4 ng/ml) που είχαν υποβληθεί σε μακρά θεραπεία με αγωνιστή, υπήρξε ένα ποσοστό 5.6 % κλινικών κυήσεων και 2.8% ζώντων γεννήσεων σε μια ομάδα γυναικών >39 ετών.

Η αλλαγή των δόσεων γοναδοτροπίνης κατά την διάρκεια της θεραπείας διέγερσης των ωοθηκών, που συχνά εφαρμόζεται σε περιπτώσεις με φτωχή απόκριση, απέτυχε να δείξει κάποιο κλινικό όφελος (van Hooff et al., 1993). Η ικανότητα εκτίμησης της ωοθηκικής απόκρισης στην FSH πριν από την κανονική έναρξη της διέγερσης, που επιτρέπει την προσαρμογή των αρχικών δόσεων της ωοθηκικής διέγερσης, αναμένεται να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της IVF θεραπείας (Fauser et al., 2008b). Οι αρχικές μελέτες έχουν ως στόχο την ανάπτυξη αλγόριθμων για την εφαρμογή εξατομικευμένων δόσεων με βάση τα χαρακτηριστικά της ασθενούς όπως η FSH, ο AFC, ο ωοθηκικός όγκος και η ηλικία. Θα μπορούσε να υποστηριχτεί πως οι ημερήσιες δόσεις της εξωγενούς χορήγησης FSH, που κυμαίνονται μεταξύ 37 και 225 IU, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε

μεμονωμένες περιπτώσεις για την επίτευξη της επιθυμητής ωοθηκικής απόκρισης (Fauser et al., 2008a).

Άλλες μελέτες δείχνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Δύο μελέτες έδειξαν πως η αύξηση των δόσεων της FSH δεν είχε καμία επίδραση σε ασθενείς με αναμενόμενη φτωχή απόκριση (Klinkert et al., 2005, Lekomge et al., 2008), ενώ η ελάττωση της δόσης της FSH στα άτομα με αναμενόμενη υπερβολική απόκριση έδειξε υποσχόμενα αποτελέσματα (Olivennes et al., 2009). Μόνο μια RCT έρευνα έχει διεξαχθεί, που δείχνει πως η δοσολογία σε μια μεμονωμένη ομάδα ελάττωσε το ποσοστό της φτωχής ή της υπερβολικής απόκρισης (Porovic-Todorovic et al., 2003). Είναι απαραίτητη η διεξαγωγή μιας μεγάλης RCT έρευνας για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα αυτά. Επιπλέον, έως τώρα δεν έχει μελετηθεί η σχέση κόστος-αποτελεσματικότητας της εξατομικευμένης προσέγγισης της ωοθηκικής υπερδιέγερσης. Προσφάτως, διενεργήθηκε μια πολύ-κεντρική OPTIMIST έρευνα (αρ. εγγραφής: NTR2657) στην Ολλανδία, που ερευνά την επίδραση της εξατομικεύσεως της ωοθηκικής υπερδιέγερσης και της σχέσης μεταξύ κόστους-αποτελεσματικότητας (van Tilborg et al., 2012).

Προσφάτως μόνο έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι για την εξατομικευμένη δοσολογία της ωοθηκικής υπερδιέγερσης που στηρίζονται στις αρχικές συγκεντρώσεις της AMH. Αυτές οι θεραπευτικές στρατηγικές είχαν ως αποτέλεσμα την ελάττωση τόσο της υπερβολικής απόκρισης όσο και των ακυρωμένων κύκλων, ελάττωσαν τον κίνδυνο του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Ovarian Hyperstimulation Syndrome-OHSS) και αύξησαν τα ποσοστά κύησης και ζώντων γεννήσεων, επιπροσθέτως με την ελάττωση του κόστους (La Marca et al., 2012, Nelson et al., 2009, Yates et al., 2011). Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση συνόψισε τα διαθέσιμα αποδεικτικά στοιχεία της τρέχουσας κατάστασης, τα οποία υποστηρίζουν την χρήση της εξατομικευμένης υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Fleming et al., 2013, La Marca & Sunkara, 2013).

Η ικανότητα της AMH για την πρόγνωση των πιθανοτήτων κύησης είναι λιγότερο ελπιδοφόρα. Σε μια μετα-ανάλυση των δεδομένων μιας μεμονωμένης ασθενούς, αποδείχθηκε πως η AMH δεν προσθέτει τίποτα στην πρόγνωση της επερχόμενης IVF κύησης (Broer et al., 2013b). Ωστόσο, σε δύο πρόσφατες μελέτες σε εκατοντάδες γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF,

φάνηκε μια σχέση μεταξύ της AMH και των συνολικών ποσοστών ζώντων γεννήσεων. Αποδείχθηκε πως οι γυναίκες της κατηγορίας με υψηλότερη AMH είχαν υψηλότερο ποσοστό κυήσεων όπως επίσης και υψηλότερο ποσοστό γεννήσεων (Arce et al., 2013). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε μία μεγαλύτερη προοπτική έρευνα περίπου 900 γυναικών, όπου τα αυξημένα επίπεδα AMH σχετιζόταν με αυξημένα ποσοστά γεννήσεων, που παρέμεναν σημαντικά ακόμη και μετά την προσαρμογή της ηλικίας και της απόδοσης του ωαρίου (Brodin et al., 2013). Αποδείχθηκε επίσης πως όταν η ηλικία της γυναίκας και η AMH συνδυάζονταν, ήταν πιθανός ο διαχωρισμός μεταξύ ζευγαριών με καλή και κακή (La Marca et al., 2011).

3.3 Σπερματέγχυση

Η ενδομήτρια σπερματέγχυση (Intrauterine insemination-IUI) με ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση (controlled ovarian stimulation-COS) χρησιμοποιείται συχνά για την θεραπεία ζευγαριών με ανεξήγητη υπογονιμότητα (Cohlen, 2005, van Rumste et al., 2008). Παρότι η COS σε συνδυασμό με IUI (COS-IUI) έδειξε ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό κυήσεων ανά ζευγάρι σε σύγκριση με την IUI κατά την διάρκεια του φυσικού κύκλου (Verhulst et al., 2006), η COS έχει επίσης σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (ovarian hyperstimulation syndrome-OHS) (Gianaroli et al., 2012, Soares et al., 2008). Η ακύρωση ενός κύκλου εξαιτίας της υπερ-απάντησης έχει αναφερθεί σε ποσοστό 15% των θεραπειών COS-IUI (Dickey et al., 2005). Αντιθέτως, κάποιες σχετικά νεότερες γυναίκες με ελαττωμένα ωοθηκικά αποθέματα, και κάποιες γυναίκες των οποίων η γονιμότητα είναι φυσικώς ελαττωμένη λόγω της ηλικίας τους, μπορεί να έχουν χαμηλότερη απάντηση στην COS (Jayaprakasan et al., 2010). Μια ακραία απάντηση, ή αντίθετα, μια φτωχή απάντηση στην COS μπορεί να συμβεί αναπάντεχα. Ως εκ τούτου, υπάρχει πραγματική ανάγκη της εύρεσης προγνωστικών παραγόντων που να μπορούν στην καθημερινή κλινική πρακτική, εξατομικευμένα, να προβλέπουν τα αποτελέσματα της διέγερσης και της κύησης.

Σε μια μελέτη κοορτής φάνηκε πως γυναίκες με επίπεδα AMH στον ορό 2.3 ng/mL ή υψηλότερα, είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά συνέχισης της κύησης από αυτές με επίπεδα AMH κάτω του ορίου. Το εύρημα αυτό δείχνει

πως η χρήση του ορίου θα μπορούσε να έχει κλινική εφαρμογή για την εντόπιση των ζευγαριών με ανεξήγητη υπογονιμότητα που έχουν μια υψηλή πιθανότητα κύησης σε ένα IUI κύκλο (Moro et al., 2015). Βρέθηκε επίσης πως τόσο η AMH όσο και ο AFC ήταν καλύτεροι προγνωστικοί δείκτες της ωοθηκικής απάντησης στην COS απ' ότι η FSH, με παρόμοια επίδοση της πρόγνωσης μιας φτωχής ωοθηκικής απάντησης σε IUI. Αντίθετα, η ολική AFC (ωοθυλάκια 2–9 mm) και η AFC των μικρών ωοθυλακίων (≤ 6 mm) μπορεί να προβλέψει την ωοθηκική απόκριση καλύτερα από την AMH μεταξύ νέων γυναικών. Στα ίδια ευρήματα κατέληξαν κι άλλες έρευνες της θεραπείας με IVF (Jayaprakasan et al., 2010, La Marka et al., 2011).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά προηγούμενων ερευνών τόσο της IVF (La Marka et al., 2011) όσο και της IUI (Li et al. (2010). Για παράδειγμα, ο Li et al. (2010) έδειξε πως μια AUC της AMH του 0.67 (95% CI 0.59–0.75), ήταν σημαντικά καλύτερη από αυτή του AFC στην πρόγνωση του ποσοστού των γεννήσεων μετά από IUI. Αντίθετα, οι Tremellen και Kolo (2010) δεν επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα, καθώς βρήκαν πως τα επίπεδα της AMH δεν ήταν ενδεικτικά του ποσοστού των γεννήσεων. Η διαφορά αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός πως οι Tremellen και Kolo εκτίμησαν έναν ετερογενή πληθυσμό υπογόνιμων ζευγαριών με αντρικό παράγοντα στην διάγνωση και με γυναίκες ανωορρηκτικές και/ή με πολυκυστικές ωοθήκες. Η ανωορρηξία και η ανάμειξη του αντρικού παράγοντα μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην COS και στην IUI αντιμετώπιση, επηρεάζοντας την ισχύ του AFC και της AMH στην πρόγνωση είτε της ωοθηκικής απόκρισης είτε του ποσοστού κύησης μετά την COS–IUI (Guzman et al., 2013).

Ως εκ' τούτου, και οι δύο δείκτες, η AMH και ο AFC, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόγνωση της φτωχής ωοθηκικής απάντησης μεταξύ των γυναικών που υποβάλλονται σε COS για IUI. Και οι δύο δείκτες έχουν τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. Αντίθετα όμως με το AFC, η AMH δεν είναι μια κύκλο-εξαρτώμενη μεταβλητή (Elgindy et al., 2008).

3.4 Γονιμοποίηση ωαρίων και ποιότητα εμβρύων

Διάφορες έρευνες δείχνουν ότι κατά την διάρκεια της COS, τα επίπεδα της AMH στο ορό μπορεί να αντανakλούν την ποιότητα του ωοκυττάρου και

του εμβρύου (Ebner et al., 2006, Irez et al., 2011, Seifer & Maclaughlin, 2007, Silberstein et al., 2006). Έχει φανεί πως τα επίπεδα της AMH του ωοθυλακικού υγρού (follicular fluid-FF) δείχνουν έναν πιο άμεσο ρόλο της AMH ως έναν ρυθμιστή της ανθρώπινης ωοθυλακιογένεσης (Fanchin et al., 2007, Lee et al., 2008, Takahashi et al., 2008). Σε μία προοπτική μελέτη σε μεμονωμένο κυρίαρχο ωοθυλάκιο ενός συμβατικού κύκλου COS, φάνηκε πως η παραγωγή της AMH από ένα μοναδικό προ-ωορρηκτικό ωοθυλάκιο σχετιζόταν θετικά με την ποιότητα του παραγόμενου ωοκυττάρου και του εμβρύου (Kim et al., 2014). Ο Fanchin et al. (2007) μελέτησε την σχέση μεταξύ των επιπέδων της AMH του ορού και της FF AMH και της κατάληξης των ωοκυττάρων σε IVF-ET που διενεργήθηκε σε κύκλους μονό-κυρίαρχων ωοθυλακίων. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως τα επίπεδα της FFAMH του προ-ωορρηκτικού ωοθυλακίου σχετίζονταν θετικά με την εμφύτευση του εμβρύου, αλλά δεν βρήκε κάποια σημαντική διαφορά στην ποιότητα των ωοκυττάρων και των εμβρύων που να οφείλεται στην υψηλή-ή χαμηλή-παραγωγή-AMH των ωοθυλακίων. Σε μια έρευνα του Takahashi et al. (2008) φάνηκε πως τα ωοκύτταρα είναι περισσότερο πιθανό να γονιμοποιηθούν όταν τα ωοθυλάκια έχουν υψηλές συγκεντρώσεις της AMH.

Από την άλλη πλευρά, οι Cupisti et al. (2007) και Mehta et al. (2013) έδειξαν ότι τα επίπεδα της FF AMH είχαν αντίστροφη συσχέτιση με την ωρίμανση των ωοκυττάρων και με το δυναμικό ανάπτυξης όπως, η γονιμοποίηση, η ποιότητα του εμβρύου και το ποσοστό των κλινικών κυήσεων. Στις έρευνες αυτές, τα επίπεδα της AMH μετρήθηκαν στο συνολικό FF και όχι σε κάποιο συγκεκριμένο ωοθυλάκιο. Οι προσδιορισμοί του συνολικού FF μπορεί να μην αντανakλούν το μικροπεριβάλλον που περιβάλλει ένα συγκεκριμένο ωοκύτταρο (Kim et al., 2014).

Η τύχη του ωοκυττάρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υγεία των ανταποκρινόμενων ωοθυλακίων, ιδιαίτερα από τα περιβάλλοντα κύτταρα του ωοκυττάρου. Η αμοιβαία αλληλεξάρτηση της παραγόμενης AMH των κοκκιωδών και των ωοκυττάρων έχει φανεί από πολλά ευρήματα. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει πως η απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων επηρεάζει αρνητικά την αναπτυξιακή ικανότητα του ωοκυττάρου (Nakahara et al., 1997a, Zeuner et al., 2003). Τα κοκκιώδη κύτταρα στα ωοθυλάκια των ωοκυττάρων που έχουν γονιμοποιηθεί και αναπτυχθεί σε

υψηλής-ποιότητας έμβρυα, εμφανίζουν ένα σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό αποπτωτικού ρυθμού σε σχέση με τα ωκύτταρα που δεν τα κατάφεραν (Nakahara et al., 1997b). Επιπλέον, υπάρχουν πολλές ενδείξεις που δείχνουν πως τα ωκύτταρα ρυθμίζουν την έκφραση της AMH των κοκκιωδών κυττάρων (Mónsterberg & Lovell-Badge, 1991). Ο Salmon et al. (2004) έδειξε πως τα ωκύτταρα στα προ-ωορρηκτικά ωοθυλάκια επάγουν άμεσα την έκφραση της AMH των κοκκιωδών κυττάρων, σε πολύ στενή επαφή μεταξύ τους.

Αρκετές είναι οι έρευνες αναφορικά με την AMH και το ποσοστό των ζώντων γεννήσεων. Ο Gleicher et al. (2010), διενήργησε μια προοπτική έρευνα σε 295 γυναίκες (συνολικά 507 κύκλοι) όπου εκτιμήθηκαν οι γεννήσεις μετά από IVF. Η έρευνα έδειξε πως μια AMH $>1.05\text{ng/ml}$ σχετιζόταν με καλύτερες πιθανότητες ζώντων γεννήσεων. Επίσης, μια αύξηση των γεννήσεων παρατηρήθηκε μεταξύ τιμών της AMH $0.41-1.05\text{ng/ml}$ [14]. Μία έρευνα του La Marca et al. (2011) περιλάμβανε 389 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF, ηλικίας κάτω των 42 ετών. Φάνηκε πως η επιτυχία της IVF καθοριζόταν κυρίως από την AMH και την ηλικία της γυναίκας. Μία σαφής μείωση ζώντων γεννήσεων παρατηρήθηκε για τιμές AMH $<0.4\text{ng/ml}$, ανεξαρτήτως της ηλικίας της γυναίκας.

Ο Weghofer et al. (2011), σε μια προοπτική μελέτη, έδειξε ένα ποσοστό ζώντων γεννήσεων 9.4% (128 γυναίκες, 254 κύκλοι) για AMH $<0.4\text{ng/ml}$. Ο Lukaszuk et al. (2014), βρήκε 14 ζώντες γεννήσεις σε 101 γυναίκες (188 κύκλοι IVF) με επίπεδα AMH $<0.4\text{ng/ml}$. Σε μια άλλη έρευνα φάνηκε ένα ποσοστό 9.5% ζώντων γεννήσεων ανά κύκλο, σε 5087 νέους κύκλους γυναικών με επίπεδα AMH $<0.16\text{ng/ml}$ (Seifer et al., 2016). Επίσης, μια συστηματική έρευνα και μετα-ανάλυση υπέδειξε ότι η AMH, ανεξαρτήτως της ηλικίας, σχετίζεται με ζωντανές γεννήσεις μετά από υποβοηθούμενη σύλληψη, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην συμβουλευτική ζευγαριών πριν την θεραπεία της υπογονιμότητας (Iliodromiti et al., 2014).

3.5 Η χρήση της AMH στην υπογονιμότητα γυναικών με PCOS

Έως τώρα, η θεραπεία της όλιγο- ή ανωορρηκτικής υπογονιμότητας αναφέρεται ως πρόκληση ωορρηξίας. Η κιτρική κλομιφαίνη (Clomiphene citrate - CC) αποτελεί την πρώτη επιλογή για την θεραπεία της πρόκλησης

της ωορρηξίας σε γυναίκες με PCOS. Παρόλα αυτά, υπάρχει ένα ποσοστό 20-25% αυτών των γυναικών που παραμένει ανωορρηκτικό ακόμη και μετά την χορήγηση της κλομιφαίνης (Mitwally et al., 2001), και η ακριβής αιτία της αποτυχίας της παραμένει άγνωστη. Η αναγνώριση των παραγόντων που καθορίζουν την απάντηση των γυναικών με PCOS στην CC μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή των ασθενών που είναι περισσότερο πιθανό να ωφεληθούν από αυτήν τη θεραπεία, αποφεύγοντας έτσι τις περιττές θεραπείες και αυξάνοντας τα ποσοστά επιτυχίας.

Πρόσφατα, η AMH έχει χαρακτηριστεί ως ένας κλινικά υποσχόμενος δείκτης του ωοθηκικού αποθέματος και της πρόβλεψης της απάντησης στις γοναδοτροπίνες κατά την διάρκεια της (IVF) σε γυναίκες χωρίς PCOS (Broer et al., 2009, Elgindy et al., 2008, Lekamge et al., 2007). Σε γυναίκες με PCOS, βρέθηκε πως τα επίπεδα της AMH κατά την 3^η ημέρα του κύκλου διέγερσης της IVF μπορούν να προβλέψουν την ωοθηκική απάντηση στις γοναδοτροπίνες (Xi et al., 2012). Ωστόσο σε μία έρευνα, η προγνωστική σημασία της AMH ήταν διαφορετική μεταξύ γυναικών με ή χωρίς PCOS, καθώς φάνηκε πως τα επίπεδα της κυκλοφορούσας AMH είχαν αρνητική συσχέτιση στην απάντηση με γοναδοτροπίνες κατά την διάρκεια της ωοθηκικής πρόκλησης σε γυναίκες με PCOS (Amer et al., 2013). Στην ίδια έρευνα φάνηκε ότι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα AMH ήταν λιγότερο πιθανό να ανταποκριθούν στην θεραπεία κλομιφαίνης. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε το επίπεδο αποκοπής της AMH (7.77 ng/ml), πάνω από το οποίο οι πιθανότητες της ωορρηξίας έδειχναν μια σημαντική μείωση. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν πως οι υψηλές τιμές AMH αντανακλούν περισσότερο την εξασθενημένη διακοπή στην ωοθυλακιογένεση και στην λειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων.

Ωστόσο, μπορεί να φαίνεται παράδοξο το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της AMH στον ορό είναι γνωστό πως έχουν θετική πρόγνωση της ωοθηκικής απάντησης στην διέγερση με γοναδοτροπίνες κατά την διάρκεια της IVF. Για τις γυναίκες με υψηλά επίπεδα AMH θεωρείται πως προβλέπει υπερβολική ωοθηκική απάντηση στις γοναδοτροπίνες. Εντωμεταξύ, τα χαμηλά επίπεδα AMH, ενδεικτικά της ελαττωμένης ωοθηκικής απάντησης, σχετίζονται με φτωχή απόκριση (La Marka et al., 2010, Nakhuda et al., 2006). Ο Amer et al. (2013) εξήγησε πως η αντίθεση αυτή μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό

βαθμό της κυκλοφορούμενης AMH σε γυναίκες με ή χωρίς PCOS. Από την στιγμή που τα επίπεδα της AMH ήταν σημαντικά αυξημένα σε γυναίκες με PCOS, θεώρησε ότι τα επίπεδα άνω των βέλτιστων τιμών AMH σχετίζονται με φτωχή ωοθηκική απόκριση στην διέγερση. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως, σε αντίθεση με τον Amer, ο Kaya et al. (2010) και ο Xi et al. (2012) βρήκαν μια θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων της AMH στον ορό και της ωοθηκικής ανταποκρισιμότητας στις γοναδοτροπίνες κατά την διάρκεια IVF σε γυναίκες με PCOS. Στις έρευνες αυτές, καθώς τα επίπεδα της AMH του ορού αυξάνονταν, παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης την ημέρα χορήγησης της hCG και του αριθμού των ανακτώμενων ωοκυττάρων, ενώ η συνολική δόση γοναδοτροπίνης ήταν σημαντικά μειωμένη. Έτσι, υποτέθηκε πως ο προγνωστικός ρόλος της AMH είναι διαφορετικός στην ωοθηκική ανταποκρισιμότητα της ωοθηκικής πρόκλησης με κλομιφαίνη και στην ωοθηκική υπερδιέγερση με γοναδοτροπίνες στην IVF, επειδή ο στόχος της διέγερσης σε γυναίκες με ανωορρηξία είναι διαφορετικός με αυτόν των γυναικών που υποβάλλονται σε IVF (Xi et al., 2016).

Έχει υποτεθεί πως σε ανωορρηκτικές γυναίκες με PCOS, η αύξηση της FSH του ορού μπορεί να ελαττώσει την περίσσεια της AMH, ανακουφίζοντας έτσι την αναστολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης και επιτρέποντας την εμφάνιση ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου (Catteau-Jonard et al., 2007). Κατά την πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας ο στόχος πρέπει να είναι η επίτευξη της ωορρηξίας ενός μόνο ωοθυλακίου, και έτσι η κλομιφαίνη αποτελεί την πρώτη επιλογή θεραπείας των γυναικών με PCOS. Η χρόνια χαμηλή-δόση γοναδοτροπίνης (με αρχική δόση 37.5 ή 50U ημερησίως) έχει χρησιμοποιηθεί για την διέγερση της ωορρηξίας σε γυναίκες που η θεραπεία της κλομιφαίνης απέτυχε. Ωστόσο, τόσο η κλομιφαίνη όσο και η χαμηλή-δόση γοναδοτροπίνης προκαλούν μια ήπια αύξηση των επιπέδων της FSH του ορού, που μπορεί να είναι επαρκής για την ελάττωση της ενδο-ωοθηκικής AMH σε ένα επίπεδο συμβατό με της επανάληψη της ωορρηξίας σε γυναίκες με υψηλά επίπεδα AMH. Ως εκ' τούτου, όπως είναι αναμενόμενο, οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα AMH ήταν περισσότερο ανεσταλμένες και πιο πιθανό να παραμείνουν ανωορρηκτικές έπειτα από την πρόκληση της ωορρηξίας. Ωστόσο, ο σκοπός της θεραπείας με IVF, συνήθως σχεδιάζεται για την πρόκληση πολυωοθυλακικής ανάπτυξης και ως τέτοια, συνήθως απαιτεί

υψηλότερες δόσεις FSH (με αρχική δόση τουλάχιστον 112.5U ημερησίως) σε σύγκριση με τις χορηγούμενες για την πρόκληση ωορρηξίας. Όταν το «κατώφλι» των επιπέδων της FSH για την ωοθυλακική ανάπτυξη ξεπερνάτε γρήγορα και η ωοθυλακική σύλληψη εξαιτίας της αναστολής της AMH υποχωρεί, το αποτέλεσμα είναι η πρόωγη εμφάνιση της ανάπτυξης πολλαπλών κυρίαρχων ωοθυλακίων (Xi et al., 2016).

Ο Mahran et al. (2013), εκτίμησε την επίδραση της κυκλοφορούσας AMH στον βαθμό επιτυχίας της πρόκλησης ωορρηξίας με κλομιφαίνη σε 60 γυναίκες με ανωορρηκτικό PCOS που έλαβαν 187 κύκλους θεραπείας, και βρήκε πως τα κυκλοφορούντα επίπεδα της AMH είχαν αρνητική συσχέτιση με τις πιθανότητες ωορρηξίας. Παρομοίως, ο Amer et al. (2013) εκτίμησε την επίδραση της κυκλοφορούσας AMH στην έκβαση της ωοθηκικής διέγερσης σε 20 γυναίκες με ανωορρηκτικό PCOS που έλαβαν 34 κύκλους θεραπείας με γοναδοτροπίνη. Βρέθηκε πως τα επίπεδα της κυκλοφορούσας AMH σχετιζόταν αρνητικά με την ωοθηκική απάντηση στην ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη. Από την άλλη πλευρά, ο El-Halawaty et al. (2007), βρήκε πως τα επίπεδα της AMH ήταν σημαντικά υψηλότερα σε γυναίκες που απαντήσανε στην κλομιφαίνη, σε σύγκριση με αυτές που δεν απαντήσανε στην θεραπεία. Ωστόσο, τα ευρήματα του περιείχαν μια υποομάδα παχύσαρκων γυναικών με PCOS που λάμβανε υψηλές δόσης κλομιφαίνης (150 mg/d). Μόνο το 25% των συμμετεχόντων της έρευνας εμφάνισε ωορρηξία σε απάντηση της υψηλής κλομιφαίνης κατά τον πρώτο κύκλο, ποσοστό πολύ μικρότερο από την πλειοψηφία των άλλων δημοσιεύσεων που καταγράφουν ποσοστά ωορρηξίας 75–80% έπειτα από τη CC θεραπεία (Mitwally et al., 2001)

Έχει αναφερθεί ότι η AMH είναι ένας από τους τοπικούς αναστολείς της δράσης της FSH, ελαττώνοντας την ευαισθησία των κοκκιωδών κυττάρων στην FSH (Durlinger et al., 2001,2002). Η επίδραση αυτή οφειλόταν κυρίως στην αναστολή της δραστηριότητας της αρωματάσης στα κοκκιώδη κύτταρα (Grossman et al., 2008). Παρομοίως, έχει βρεθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της AMH και της οιστραδιόλης σε γυναίκες με PCOS (Cook et al., 2002). Το γεγονός πως η AMH αναστέλλει του παράγοντες που απαιτούνται για την ωοθυλακική ανάπτυξη και επομένως την διαδικασία της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Jonard et al., 2004), δεν θα πρέπει να αποτελεί

έκπληξη το γεγονός ότι η AMH είναι ένας αρνητικά προγνωστικός παράγοντας της ωοθηκικής απάντησης στην θεραπεία κλομιφαίνης σε γυναίκες με PCOS.

4. Η χρήση της AMH στον γυναικείο καρκίνο

Η θεραπεία του παιδικού καρκίνου έχει βελτιωθεί δραματικά, με τα πρόσφατα συνολικά ποσοστά επιβίωσης άνω του 90%. Για τον λόγο αυτό, οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές της θεραπείας, όπως η καταστροφή των γονάδων και η σχετιζόμενη υπογονιμότητα κερδίζουν συνεχώς την προσοχή των ερευνητών. Η AMH μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε διάφορες περιπτώσεις της θεραπείας του καρκίνου και του αποτελέσματος της. Αρχικά, η AMH φαίνεται να έχει θέση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που είναι ιδιαίτερα τοξικοί για τις ωοθήκες (Brougham et al., 2012, van Beek et al., 2007).

Επίσης, η AMH μπορεί να είναι ικανή για την ταυτοποίηση των ελαττωμένων ωοθηκικών αποθεμάτων όταν αποκαθίσταται ο ωοθηκικός κύκλος μετά την διακοπή της αντικαρκινικής θεραπείας. Τυπικά, κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας τα επίπεδα της AMH πέφτουν, με μια μερική ανάκτηση έπειτα από 3-6 μήνες. Η θεραπεία του καρκίνου με ακτινοβολία είναι γνωστή για την ιδιαίτερη τοξικότητά της στις ωοθήκες. Η AMH, τόσο πριν όσο και μετά την θεραπεία, μπορεί να καταστεί χρήσιμη στην διαχείριση νέων γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο, καθώς πολλές γυναίκες ανησυχούν για την μελλοντική γονιμότητά τους (Anderson & Cameron, 2011, Dillon et al., 2013) και μπορεί να απαιτηθεί να ληφθεί υπόψη η διατήρηση της γονιμότητας. Προσφάτως, μια μικρή έρευνα έδειξε πως επίσης σε έφηβες (ηλικίας 18 χρόνων) που λαμβάνουν αντικαρκινική θεραπεία, η AMH αποτελεί ένα δείκτη της ωοθηκικής λειτουργίας (Krawczuk-Rybak et al., 2013).

Επιπρόσθετα, η πραγματική αξία της μέτρησης των επιπέδων της AMH σε νέες γυναίκες που επιβίωσαν από καρκίνο θα μπορούσε να αφορά το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα της γονιμότητάς τους. Η πρώτη μελέτη που ασχολήθηκε με αυτό το θέμα αφορούσε μια 10χρονη παρακολούθηση επιζώντων γυναικών από παιδικό καρκίνο, που στα 30 τους έδειξαν μια ελάττωση των επιπέδων της AMH λόγω της γοναδοτοξικής επίδρασης της αντικαρκινικής θεραπείας τους. Σε γενικές γραμμές το ποσοστό των άτεκνων γυναικών αυτής της ομάδας ήταν υψηλότερο του φυσιολογικού του πληθυσμού της Δανίας, και ιδίως στην ομάδα των γυναικών που είχαν λάβει την μέγιστη γοναδοτοξική θεραπεία, τα ποσοστά των κυήσεων και του

αποτελέσματος τους ήταν πολύ φτωχά (Nielsen et al., 2013). Ωστόσο, θα πρέπει να αποδειχθεί κατά πόσο η AMH μπορεί να παίξει ρόλο στην πρόβλεψη του αναπαραγωγικού αποτελέσματος αυτών των γυναικών.

Πρόσφατα, το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Γονιμότητας (European FertiPROTEKT Network) (Lawrenz et al., 2012), δημοσίευσε δεδομένα σύγκρισης των επιπέδων AMH μεταξύ 38 γυναικών με Hodgkin λέμφωμα (HL) και Non-Hodgkin λέμφωμα (NHL) προ θεραπείας και υγιών γυναικών ελέγχου της κοινότητας. Η μέση ηλικία των όλων των γυναικών ήταν 25.5 έτη (διακύμανση 18-33), και τα χαμηλότερα επίπεδα AMH ($\text{mean} \pm \text{SD}$) παρατηρήθηκαν στις ασθενείς με λέμφωμα ($2.1 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$) παρά στην ομάδα ελέγχου ($3.2 \pm 2.2 \text{ ng/mL}$). Επίσης, ο αριθμός των ανακτηθέντων ωοκυττάρων ήταν υψηλότερος στον καρκίνο του μαστού παρά στις ασθενείς με λέμφωμα. Σημειωτέον, πως τα λεμφώματα αποτελούν τον κύριο τύπο καρκίνου που συνδέεται με τα χαμηλότερα επίπεδα σπέρματος στους άντρες (Bahadur et al., 2002, 2005). Τα ευρήματα αυτά της βιοχημικής και υπερηχογραφικής εκτίμησης των ωοθηκικών αποθεμάτων δείχνουν πως ο καρκίνος μπορεί να επηρεάζει τα ωοθηκικά αποθέματα, αλλά η επίδραση μπορεί να διαφέρει από τον τύπο του καρκίνου (Su et al., 2013).

Μέσα στο πλαίσιο της γοναδοτοξικής αντικαρκινικής θεραπείας θα μπορούσε να υπάρξει κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού. Παρότι έχει αναφερθεί η επάνοδος της ωοθηκικής λειτουργίας και η επίτευξη κυήσεων στις περιπτώσεις ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ωοθηκικού ιστού, στην μεγάλη πλειοψηφία των γυναικών τα επίπεδα της AMH παραμένουν μη ανιχνεύσιμα (Andersen et al., 2012, Janse et al., 2011). Μένει να διευκρινιστεί εάν τα μη ανιχνεύσιμα επίπεδα της AMH κάτω από τις περιστάσεις αυτές οφείλονται στην επιταχυνόμενη απώλεια των ωοθυλακίων κατά την διάρκεια της απόψυξης των κρυοσυντηρημένων ωοθηκικών ιστών, στην κακή αγγείωση του μεταμοσχευμένου ωοθηκικού ιστού ή σε άλλες αιτίες (Broer et al., 2014).

Συμπερασματικά, έχουν γίνει πολλαπλές μικρές μονό-κεντρικές έρευνες σχετικά με την AMH σε νέες γυναίκες που έχουν επιβιώσει από παιδικό καρκίνο ή σε γυναίκες που λάβανε θεραπεία για καρκίνο του μαστού. Όλες οι έρευνες δείχνουν υποσχόμενα αποτελέσματα για την AMH, αλλά απαιτείται περισσότερη έρευνα για την επιβεβαίωση αυτών των

αποτελεσμάτων και την εκτίμηση της κλινικής χρησιμότητάς τους (Broer et al., 2014).

4.1 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού στις νέες γυναίκες αποτελεί όλο και μεγαλύτερο πρόβλημα των αναπτυσσόμενων χωρών. Η πρόκληση ωοθηκικής βλάβης εξαιτίας της θεραπείας του αποτελεί συχνή και δυσμενή έκβαση της χημειοθεραπείας, που εμφανίζεται ως οξεία αμηνόρροια ακολουθούμενη μερικές φορές από μη αναστρέψιμη ωοθηκική ανεπάρκεια. Μέχρι τώρα δεν έχει αξιολογηθεί κάποιος προβλεπτικός δείκτης της ανάκτησης της ωοθηκικής λειτουργίας, και η ποσοτικοποίηση της βλάβης της χημειοθεραπείας εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Μια ακριβής και εξατομικευμένη εκτίμηση του κινδύνου υπογονιμότητας θα βοηθούσε σημαντικά στην συμβουλευτική των ασθενών και στην επιλογή αυτών των γυναικών που δύναται την διατήρηση της γονιμότητας. Οι αξιόπιστες πληροφορίες θα μπορούσαν να ανακουφίσουν το βάρος των γυναικών με χαμηλό κίνδυνο πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας ελαττώνοντας το συναισθηματικό στρες που προέρχεται από την προοπτική της υπογονιμότητας που συνοδεύει μια διάγνωση καρκίνου. Η αμηνόρροια και οι αλλαγές στον έμμηνο κύκλο αποτελούν εδώ και καιρό τις μόνες μεταβλητές, αλλά με αδύναμη προγνωστική αξία (Hamy et al., 2014).

Συνήθως η ωοθηκική λειτουργία μετά την χημειοθεραπεία εκτιμάται από το μοτίβο την εμμήνου ρύσεως. Έχει φανεί πως η πλειονότητα των νέων γυναικών βιώνουν κάποιο διάστημα αμηνόρροιας μετά την χημειοθεραπεία εξαιτίας της άμεσης καταστροφής των ωοθυλακίων (Petrek et al., 2006, Walshe et al., 2006). Μετά την χημειοθεραπεία, οι γυναίκες που έχουν εναπομείναν ωοθηκικό απόθεμα θα εμφανίσουν έμμηνο ρύση όταν αναπτυχθούν τα ωοθυλάκια και επιτευχθεί ωορρηξία, ενώ οι γυναίκες με απουσία ωοθηκικού αποθέματος δεν θα εμφανίσουν έμμηνο ρύση. Παρότι η επιστροφή της εμμήνου ρύσεως δεν ισοδυναμεί με γονιμότητα, το γεγονός αυτό ταυτοποιεί την ανάκαμψη της ωοθηκικής λειτουργίας, απαραίτητης για την γονιμότητα και σημαντική για την απόφαση της επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας. Ωστόσο, η εκτίμηση της ωοθηκικής ανάκαμψης μόνο με το πρότυπο της εμμήνου ρύσεως απαιτεί προσεκτική αναμονή, με την *εκ' των*

υστέρων διάγνωση της ανάκτησης της ωοθηκικής λειτουργίας (Su et al., 2014).

Η ηλικία και η θεραπεία του καρκίνου συνδέονται με την ανάκτηση της εμμήνου ρύσεως στις επιβιώσαντες από καρκίνο ασθενείς, υποδεικνύοντας την ιδέα πως η μετα-θεραπείας ωοθηκική λειτουργία καθορίζεται από εξωγενείς παράγοντες, όπως την τοξικότητα της θεραπείας σε συνάρτηση με την ηλικία (Byrne et al., 1992, Walshe et al., 2006), την ενδοκρινική εκτίμησης του ωοθηκικού αποθέματος πριν την θεραπεία, που μπορεί να συμβάλλουν στην πρόβλεψη της ωοθηκικής λειτουργίας μετά την θεραπεία. Τα επίπεδα της AMH μειώνονται με την ελάττωση του μεγέθους των ωοθηκικών αποθεμάτων και παραμένουν σχετικά σταθερά κατά μήκος του έμμηνου κύκλου (van Disseldorp et al., 2010, Weenen et al., 2004). Η FSH της υπόφυσης αυξάνει κατά την ελάττωση του ωοθηκικού αποθέματος, αλλά ποικίλει εντός και μεταξύ των έμμηνων κύκλων (Freeman et al., 2005, Harlow et al., 2012). Η ανασταλίνη Β των κοκκωδών κυττάρων μειώνεται καθώς ελαττώνεται το ωοθηκικό απόθεμα και κυμαίνεται κατά μήκος του έμμηνου κύκλου (Freeman et al., 2005, Harlow et al., 2012). Αυτές οι ενδοκρινικές μετρήσεις επηρεάζονται από την γοναδοτοξική θεραπεία του καρκίνου, και διάφορες έρευνες προτείνουν μια σχέση μεταξύ της προ-χημειοθεραπείας AMH και FSH και της μετά-χημειοθεραπείας ωοθηκική λειτουργία (Anders et al., 2008, Anderson et al., 2006, Brougham et al., Dillon et al., 2013, Henry et al., 2013, Lutcmann et al., 2007, Yu et al., 2010). Ωστόσο, τα δεδομένα αδυνατούν να δώσουν τον εξατομικευμένο κίνδυνο με βάση αυτούς τους βιοδείκτες. Επιπλέον, δεν έχει σχεδιαστεί καμία έρευνα για την πρόβλεψη της χρονικής επαναφοράς της ωοθηκικής λειτουργίας μετά την χημειοθεραπεία ώστε να ενημερώνει τις ασθενείς και τους ιατρούς της αναμενόμενης πορείας των ωοθηκικής ανάκαμψης και να συμβάλλει στην κλινική απόφαση που εξαρτάται από το επίπεδο της ωοθηκικής λειτουργίας (Su et al., 2014)

Πρόσφατα έχει φανεί πως σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού τα επίπεδα της AMH προ της θεραπείας αποτελούν έναν χρήσιμο δείκτη της μακροπρόθεσμης απώλειας της ωοθηκικής λειτουργίας, συνεισφέροντας σημαντικά στην έως τώρα μοναδική επιμέρους πρόγνωση με βάση την ηλικία. Η περιοχή κάτω της καμπύλης για την πρόβλεψη της αμηνόρροιας στα 2 χρόνια μετά την θεραπεία ήταν 0.90. Έτσι, οι προ της θεραπείας μετρήσεις

της AMH μπορεί να συνεισφέρουν στην λήψη αποφάσεων που αφορούν τις θεραπευτικές επιλογές και της ανάγκης εφαρμογής διεργασιών διατήρησης της γονιμότητας (Anderson & Wallace, 2013, Anderson et al., 2013).

Για τις ασθενείς με ορμονο-εξαρτώμενο καρκίνο του μαστού, έχει μεγάλη σημασία η γνώση του ακριβούς χρονικού σημείου εξάντλησης των ωοθηκικών αποθεμάτων για την απόφαση σχετικά με την βέλτιστη επικουρική ορμονική θεραπεία. Δυστυχώς, οι έως τώρα διαθέσιμες μετρήσεις καθορισμού της μετά-εμμηνοπαυσιακής κατάστασης, όπως η FSH, είναι περιορισμένης αξίας. Πρόσφατα έχει προταθεί η χρήση της AMH για αυτές τις συνθήκες. Έχει προταθεί ένας πρακτικός οδηγός, στηριζόμενος στα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα, που χρησιμοποιεί την AMH ως δείκτη, και υπάρχουν σε εξέλιξη έρευνες για την επικύρωση αυτής της κατευθυντήριας γραμμής (De Vos et al., 2012).

Οι φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 είναι σπάνιοι στον γενικό πληθυσμό (περίπου 0.1% και 0.2% αντίστοιχα (Antoniou et al., 2008), αν και είναι πιο συχνοί σε ορισμένες υποομάδες, όπως στο 1.2% και 1.5% αντίστοιχα των Εβραίων Ashkenazi (Roa et al., 1996). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, υψηλού βαθμού ορσών ωοθηκικών καρκίνων, καρκίνου των σαλπίγγων και πρωτογενών καρκίνων του περιτοναίου (Antoniou et al., 2003). Είναι λιγότερο γνωστές οι μη-σχετιζόμενες καρκινικές επιπλοκές, αλλά τα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν πως τα ωοθηκικά αποθέματα, και ως εκ' τούτου η γονιμότητα, μπορεί να ελαττωθούν στις φορείς του γονιδίου BRCA1 (Oktay et al., 2010, 2014, Pavone et al., 2014, Titus et al., 2013, Wang et al., 2014). Εάν αυτό επιβεβαιωθεί, θα μπορούσε να έχει σημαντικές συνέπειες στον προγραμματισμό της εγκυμοσύνης, της αναπαραγωγικής διάρκειας ζωής και ίσως ακόμη και στην ωοθηκική λειτουργία μετά από χημειοθεραπεία (Phillips et al., 2016).

Τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 είναι απαραίτητα για την επιδιόρθωση των σπασμάτων του δίκλωνου DNA μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, και έτσι αποτελούν σημαντικά μέλη του ATM-μεσολαβούμενου σηματοδοτικού μονοπατιού βλάβης του DNA (Jackson & Bartek, 2009). Η σημασία της αναποτελεσματικής επιδιόρθωσης του δίκλωνου DNA στην καρκινογένεση είναι επαρκώς κατανοητή, αλλά προσφάτως, η ανεπαρκής επιδιόρθωση του

DNA έχει φανεί να συνεισφέρει στην γήρανση των ωκυττάρων. Η προστατευτική λειτουργία των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA, συμπεριλαμβανομένου και του BRCA1, μειώνεται με την ηλικία, οδηγώντας στην συσσώρευση των θανατηφόρων θραυσμάτων του DNA και στην απόπτωση των ωκυττάρων (Titus et al., 2013). Τα Δεδομένα από μοντέλα ποντικών υποδεικνύουν πως η κληρονομήση του μεταλλαγμένου BRCA1 μπορεί να επιταχύνει αυτή τη διεργασία: ποντίκια με ετερόζυγη μετάλλαξη του BRCA1 έχουν μικρότερα μεγέθη απογόνων, παράγουν λιγότερα ωκύτταρα σε απόκριση της ωοθηκικής διέγερσης και τα ωκύτταρα τους συσσωρεύουν DNA βλάβες πιο γρήγορα απ' ό,τι τα ποντίκια άγριου-τύπου ή τα ποντίκια με μεταλλάξεις του BRCA2 (Titus et al., 2013).

Σε μια έρευνα της Phillips et al. (2016), βρέθηκε πως οι μεταλλάξεις του BRCA1 σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα AMH. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της AMH δεν έχει φανεί να επηρεάζουν την φυσική ικανότητα σύλληψης σε νέες γυναίκες (Hagen et al., 2012), αλλά σχετίζονται με ελαττωμένη ικανότητα σύλληψης σε γυναίκες στα 30 τους (Steiner et al., 2011). Με τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και μικρότερες έρευνες. Ο Wang et al. (2014), βρήκε χαμηλότερες συγκεντρώσεις της AMH στον ορό σε μια ομάδα φορέων μετάλλαξης BRCA1 σε σύγκριση με 54 μη-φορείς, αλλά καμία διαφορά στα επίπεδα της AMH μεταξύ 27 φορέων μετάλλαξης BRCA2 και μη-φορέων. Ο Titus et al. (2013) βρήκε επίσης παρόμοια αποτελέσματα σε μια μελέτη 15 φορέων μετάλλαξης BRCA1, 9 φορέων BRCA2 και 60 μη-φορέων. Ο Pavone et al. (2014) βρήκε ότι οι συγκεντρώσεις της AMH ήταν παρόμοιες μεταξύ 66 φορέων μετάλλαξης BRCA1 και 59 μη-φορέων, αλλά χαμηλότερες για τις φορείς μετάλλαξης BRCA1 ηλικίας 35-39 ετών. Μια άλλη έρευνα δεν έδειξε καμία διαφορά των συγκεντρώσεων της AMH μεταξύ 41 φορέων μετάλλαξης BRCA1 και BRCA2 και 324 ατόμων ελέγχου (Michaelson-Cohen et al., 2014).

Ενώ η AMH έχει κριτικές λειτουργίες στην ωοθήκη, οι υποδοχείς τύπου II της AMH εκφράζονται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε καρκινικούς ιστούς του μαστού (Segev et al., 2000). Υπάρχουν περιορισμένα εργαστηριακά δεδομένα που προτείνουν τον προστατευτικό ρόλο της AMH στην καρκινογένεση του μαστού. In vitro, η AMH αυξάνει την απόπτωση (Hoshiya et al., 2003) και ελαττώνει την ανάπτυξη των φυσιολογικών μαστικών MCF10 κυττάρων (Segev et al., 2001), όπως επίσης και των κυτταρικών γραμμών

των ER+ και ER- του καρκίνου του μαστού (Segev et al., 2000). Επιπρόσθετα, η in vivo χορήγηση της AMH σχετίστηκε με λιγότερους ψηλαφητούς όγκους στα ποντίκια, και με αυξημένη της απόπτωσης του επιθηλίου των μαστικών πόρων των ποντικών (Gupta et al., 2005, Segev et al., 2001). Ωστόσο, και στις τρεις αυτές πειραματικές μελέτες οι συγκεντρώσεις της AMH ξεπερνούσαν τα φυσιολογικά επίπεδα, και επομένως παραμένει ασαφής η δυνατότητα εφαρμογής της στην καρκινογένεση του μαστού στους ανθρώπους. Από την άλλη, το γεγονός πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της AMH σχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία εμμηνόπαυσης (Broer et al., 2011, Freeman et al., 2012, Tehrani et al., 2013, van Disseldorp et al., 2008), ένας παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του μαστού (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012), δείχνουν πως τα υψηλότερα επίπεδα της AMH μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

4.2 Καρκίνος ωοθηκών

Μεταξύ των καρκίνων του αναπαραγωγικού συστήματος των γυναικών, ο ωοθηκικός καρκίνος είναι η δεύτερη πιο κοινή και η πέμπτη αιτία θνησιμότητας από καρκίνο σε γυναίκες στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ (Siegel et al., 2012). Αν και η κατανόηση του ωοθηκικού καρκίνου έχει βελτιωθεί ικανοποιητικά, η αιτία της νόσου παραμένει άγνωστη. Επιπλέον, παρότι οι χειρουργικές επεμβάσεις εμφανίζουν μεγάλη πρόοδο και έχουν εισαχθεί νέα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας, η 5-ετής επιβίωση δεν ξεπερνάει το 45%. Η κυριότερη αιτία της εξέλιξης αυτής αποτελεί το γεγονός πως οι γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών στρέφονται σε γυναικολογική βοήθεια σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, και παρά την εισαγωγή νέων δεικτών για την ανίχνευση του ωοθηκικού καρκίνου, η χαμηλή διαγνωστική ευαισθησία τους δεν επιτρέπει την χρήση τους ως μέθοδο ελέγχου του πληθυσμού (Park et al., 2011, Walentowicz-Sadlecka et al., 2012)

Σε γυναίκες που υποβάλλονται σε ογκολογική θεραπεία η AMH θεωρείται ως ένας χρήσιμος δείκτης της βλάβης του ωοθηκικού αποθέματος (Fong et al., 2008, Giuseppe et al., 2007). Το γεγονός πως η έκφραση της AMH περιορίζεται στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκών, οδήγησε την καθιέρωση των επιπέδων της AMH ως έναν δείκτη του ορού των κοκκωδών

κυτταρικών όγκων (granulosa cell tumours - GTCs). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν μια αύξηση της συγκέντρωσης της AMH σε ένα ποσοστό 76–93% των γυναικών τόσο με πρωτογενή όσο και με υποτροπιάζων GTCs (Gustafson et al., 1992, Rey et al., 2000).

Ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών (epithelial ovarian cancers - EOC) θεωρείται πως αναπτύσσεται είτε απευθείας από το Μυλλέριου-τύπου επιθήλιο (π.χ. από της σάλπιγγες) (Dubeau, 2008), είτε προσλαμβάνει Μυλλέριου –τύπου χαρακτηριστικά κατά την διάρκεια του νεοπλασματικού μετασχηματισμού (π.χ. ορώδες EOC) (Auersperg et al., 2001, Scully, 1977).

Ο τύπος AMHRII υπερ-εκφράζεται σε κακοήθεις όγκους του ωοθηκικού ιστού (70 vs. 12 %), και μεταξύ των EOC που διερευνήθηκαν, φάνηκε ένα υψηλότερο επίπεδο της έκφρασης της AMHRII (Bakkum-Gamez et al., 2008, Song et al., 2009). Έχει φανεί πως η AMH αναστέλει την ανάπτυξη του EOC τόσο in vitro όσο και in vivo (MacLaughlin & Donahoe, 2010), την μετάσταση των in vivo όγκων (Chang et al., 2011), και επάγει την G1 φάση των βλαστικών/ωοθηκικών κυττάρων των ωοθηκικών καρκίνων (Meirelles et al., 2012). Με βάση τις ιδιότητες αυτές και με το πλεονέκτημα της ελαττωμένης τοξικότητας (εξαιτίας την υψηλής έκφρασης της λειτουργικής AMHRII στους EOCs, αλλά όχι στην πλειοψηφία των υγιών ιστών), έχει προταθεί ως υποψήφια για την επικουρική θεραπεία των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (MacLaughlin & Donahoe, 2010).

Από την στιγμή που τα κοκκώδη ωοθηκικά κύτταρα εκκρίνουν AMH, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα της AMH στον ορό για την διάγνωση και παρακολούθηση των όγκων των κοκκωδών ωοθηκικών κυττάρων. Η χρήση της AMH για την διάγνωση των όγκων των κοκκωδών κυττάρων φαίνεται να έχει θετική πρόγνωση, με την ευαισθησία να κυμαίνεται μεταξύ 76% και 93%. Μετεγχειρητικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης της αποτελεσματικότητας της επέμβασης και της υποτροπής της νόσου. Σε μία έρευνα μετεγχειρητικής παρακολούθησης 31 ασθενών για 7 χρόνια, φάνηκε πως η AMH αποτέλεσε ένα χρήσιμο εργαλείο στην διάγνωση της υποτροπής της νόσου. Αυτό επιβεβαιώθηκε από μια δεύτερη έρευνα σε 56 ασθενείς, από τις οποίες οι 36 παρακολουθούνταν μετεγχειρητικά (La Marca & Volpe, 2007, Lane et al., 1999, Long et al., 2000).

5. Λειτουργικές διαταραχές ωοθηκών

Οι γυναίκες με υποτιθέμενη ωοθηκική δυσλειτουργία που εμφανίζονται με oligomenόρρεια ή αμηνόρρεια κατηγοριοποιούνται με βάση τις συγκεντρώσεις FSH και E_2 στον ορό. Αυτή η κατηγοριοποίηση αναπτύχθηκε περισσότερο από μισό αιώνα πριν και τελικά υιοθετήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization-WHO). Εν συντομία, μπορεί να γίνει ένας διαχωρισμός μεταξύ είτε μιας κεντρικής προέλευσης (μονάδας υποθαλάμου-υπόφυσης), ωοθηκικής δυσλειτουργίας (με βάση τον WHO ομάδα 1, που χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα FSH και E_2), ανωμαλίες προερχόμενες από την ίδια την ωοθήκη (WHO ομάδα 3, υψηλά επίπεδα FSH και χαμηλά E_2), ή μια «ανισορροπία» υπόφυσης-ωοθηκών (WHO ομάδα 2, φυσιολογικά επίπεδα FSH και E_2). Η ομάδα 2, περιλαμβάνει κυρίως το σύνδρομο πολυκυστικών διαταραχών (polycystic ovary syndrome-PCOS), που παρατηρείται στο ~80% των περιπτώσεων oligo/αμηνόρρειας. Όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα, η AMH παράγεται κυρίως από τα πρώιμα και αρχικά ωοθυλάκια ανεξάρτητα από την FSH. Επομένως, η μέτρηση των συγκεντρώσεων AMH σε ανωορρηκτικές γυναίκες θα μπορούσε να παρέχει χρήσιμες επιπρόσθετες πληροφορίες αναφορικά με την δυναμική των πρώιμων ωοθυλακίων και το ωοθηκικό απόθεμα (Broer et al., 2014).

5.1 Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση αποτελεί μια κοινή γυναικολογική διαταραχή κατά την οποία το αδενικό επιθήλιο του ενδομητρίου ανευρίσκεται έξω από την ενδομήτρια κοιλότητα. Η ενδομητρίωση επηρεάζει το 6% με 10% όλων των γυναικών κατά την αναπαραγωγική ηλικία, και η μέση ηλικία κατά την διάγνωση κυμαίνεται μεταξύ 25-35 χρόνων σε ένα ποσοστό 9-50% των υπογόνιμων γυναικών (Fitz & Speroff, 2011). Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδομητρικού ιστού έξω από την ενδομήτρια κοιλότητα και ανευρίσκεται κυρίως στις ωοθήκες, στο περιτόναιο και το ορθοκολπικό διάφραγμα (D'Hooghe et al., 2012, Giudice, 2010).

Τα ωοθηκικά ενδομητρίωματα σχετίζονται με το πιο προχωρημένο στάδιο της ενδομητρίωσης και αποτελούν το πιο συχνό αίτιο χειρουργικής αφαίρεσης ωοθηκικών κυστών, και μπορεί να αφορούν το 44% των γυναικών

με ενδομητρίωση (D'Hooghe et al., 2012). Τα ωθηκικά ενδομητρίωματα συνήθως σχετίζονται με συμπτώματα όπως δυσμηνόρροια, χρόνιο πυελικό άλγος, δυσπαρεύνια, ελαττωμένη ποιότητα ζωής και υπογονιμότητα. Ο πιθανός μηχανισμός της υπογονιμότητας μεταξύ των γυναικών με ενδομητρίωση περιλαμβάνει την ανατομική παραμόρφωση λόγω συμφύσεων ή ινομυωμάτων και την γνωστή παρουσία φλεγμονωδών διαμεσολαβητών (Giudice, 2010).

Σε μια συστηματική ανασκόπηση ο Sanchez et al. (2014) πρότεινε πως η παρουσία ενός ενδομητρίωματος προκαλεί ωθηκική βλάβη ανεξαρτήτως του μεγέθους του, μέσα από το μηχανικό τέντωμα. Στην πραγματικότητα, οι καταστροφικές επιδράσεις που προκαλεί το ενδομητρίωμα αποδεικνύονται από την πληθώρα των μορφολογικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών που καθιστούν την ωθήκη διαφορετική από μια υγιή .

Η πρώτη εξήγηση για την βλάβη της φυσιολογικής ωθηκικής λειτουργίας από το ενδομητρίωμα προκύπτει από το περιεχόμενο της κύστης που εμφανίζει μια πιθανή πηγή «τοξικότητας» για τους γύρω υγιείς ιστούς. Πρώτον, οι ενδομητρίωσικές κύστεις περιέχουν υψηλά επίπεδα κυτταρικών καταστροφικών-μεσολαβητικών παραγόντων, πρωτεολυτικά ένζυμα, φλεγμονώδη μόρια, αντιδραστικές οξειδωτικές ρίζες και σίδηρο (Iizuka et al., 1998, Iwabuchi et al., 2015, Yaniaguchi et al., 2008). Το περιεχόμενο του υγρού προκαλεί αλλαγές στα περιβάλλοντα κύτταρα, που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις της έκφρασης σημαντικών γονιδίων και γενετικές αλλαγές με δυνατότητα πρόκλησης ογκογένεσης (Iwabuchi et al., 2015, Vercellini et al., 2011). Δεύτερον, υπάρχουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στον υγιή ωθηκικό φλοιό που περιβάλλει το ενδομητρίωμα σε σύγκριση με άλλες καλοήθεις κύστες (Matsuzaki & Schubert, 2010). Η αλλαγές του μεταβολισμού του οξειδωτικού στρες έχουν σχετιστεί με καταστροφικές επιδράσεις στο ωκύτταρο, στην ανάπτυξη του εμβρύου και στην έκβαση της κύησης (Das et al., 2006, Pasqualotto et al., 2004, Tamura et al., 2008). Επίσης, η ανισορροπία από το οξειδωτικό στρες έχει ενοχοποιηθεί ως πιθανός παράγοντας της απόπτωσης των ωοκυττάρων και της νέκρωσης των πρώιμων ωοθυλακίων (Zhang et al., 2006).

Η οριστική διάγνωση τίθεται με την άμεση χειρουργική όραση είτε λαπαροσκοπικά είτε με λαπαροτομία, και ιδανικά με την ιστολογική

επιβεβαίωση (Fitz & Speroff, 2011). Η επεμβατική λαπαροσκόπηση σε σύγκριση με την λαπαροτομία έχει αποδειχθεί ο χρυσός κανόνας της χειρουργικής προσέγγισης για την διάγνωση και αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης (Bulletti et al., 2010). Λαπαροσκοπικά, η διάγνωση κατηγοριοποιείται από ελάχιστη έως και σοβαρού σταδίου που περιλαμβάνει και το ωθηκικό ενδομητρίωμα (Bulletti et al., 2008, Fitz & Speroff, 2011). Οι συνηθέστερες διεργασίες για την αντιμετώπιση της ωθηκικής ενδομητρίωσης είναι είτε η εκτομή την κάψουλας της κύστης ή ο ηλεκτρο-καυτηριασμός του κυστικού τοιχώματος. Κατά την διάρκεια της εκτομής το ωθηκικό ενδομητρίωμα αναρροφάται έπειτα από τομή και αφαίρεση του κυστικού τοιχώματος από τον ωθηκικό φλοιό με την μέγιστη δυνατή διατήρηση του φυσιολογικού ωθηκικού ιστού. Ωστόσο, η ασφάλεια αυτής της επέμβασης, με όρους υπολειμματικής ωθηκικής λειτουργίας, δεν είναι σίγουρη και η διατήρηση του ωθηκικού ιστού είναι απαραίτητη σε νέες γυναίκες που επιθυμούν μελλοντική γονιμότητα (Bulletti et al., 2010).

Από την στιγμή που η ενδομητρίωση επηρεάζει απευθείας το ωθηκικό απόθεμα, που ορίζεται ως η λειτουργική δυνατότητα της ωθήκης, αντανakλά τον αριθμό και την ποιότητα των ωθυλακίων που απομένουν στην ωθήκη την δεδομένη στιγμή. Έχουν μελετηθεί διάφορες δοκιμασίες και δείκτες του ωθηκικού αποθέματος, όπως η AMH του ορού, σε διάφορες μελέτες για να δείξουν την σημαντικότητα και την επίδραση στην υπογονιμότητα σε σχέση με την ενδομητρίωση σε μήκος χρόνου (Alborzi et al., 2006). Η AMH είναι ο μόνος δείκτης ωθηκικού αποθέματος που είναι ανεξάρτητη του έμμηνου κύκλου και δεν επηρεάζεται από τα αντισυλληπτικά δισκία και τους GnRH αγωνιστές (Seifer et al., 2011).

Έρευνες έχουν δείξει πως η AMH επάγει την διακοπή και την απόπτωση του κυτταρικού κύκλου των ανθρώπινων στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου και των *in vitro* κυττάρων του ενδομητρίου. Μια έρευνα έδειξε πως η κυτταρική απόπτωση αυξήθηκε μέσω της ανακοπής της G1 φάσης και της αύξησης των κυττάρων στην υπό-G0G1 φάσης των ενδομήτριων στρωματικών κυττάρων με την χρήση της AMH για 72 ώρες (Namkung et al., 2012). Σε άλλη έρευνα φάνηκε πως η AMH επάγει την αυτοφαγία μέσω της αυξημένης έκφρασης των Beclin-1 πρωτεϊνών προώθησης-αυτοφαγίας στα κύτταρα του ενδομητρίου (Borahay et al., 2013). Τα ευρήματα αυτά συνιστούν

πως η AMH έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόπτωση του ενδομητρίου, καθώς και μια δυναμική στην θεραπευτική αντιμετώπιση της ενδομητρίωσης.

Σύμφωνα με τον Lemos et al. (Shebl et al., 2009), η ελάχιστη/ήπια ενδομητρίωση σχετίζεται με μια ελάττωση του ωθητικού αποθέματος και η AMH του ορού είναι περισσότερο ευαίσθητη από άλλους δείκτες στην εκτίμηση του ωθητικού αποθέματος, αν και η ακρίβεια της είναι περιορισμένη και δεν περικλείει όλες τις υπογόνιμες ασθενείς με ενδομητρίωση. Ο Shebl et al. (Lemos et al., 2008) ανέφερε πως τα επίπεδα της AMH ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με σοβαρή ενδομητρίωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, αλλά ο (Mostaejran et al., 2015) δεν βρήκε καμία διαφορά μεταξύ της σοβαρότητας της ενδομητρίωσης και των μέσων επιπέδων της AMH του ορού.

Άλλοι ερευνητές κατέγραψαν μια ελάττωση των επιπέδων της AMH στον ορό 1 μήνα μετά το χειρουργείο για ενδομητρίωμα από 3.9 μέχρι 3.3 ng/ml (Hirokawa et al., 2011, Mostaejran et al., 2015). Ο Hwu et al. (2011) βρήκε επίσης πως οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αμφοτερόπλευρη κυστεκτομή για ενδομητρίωμα είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της AMH 3 μήνες μετά την κυστεκτομή σε σύγκριση με ασθενείς με ετερόπλευρη κυστεκτομή, και το 1.4% των γυναικών (144 ασθενείς) είχαν ωθητική ανεπάρκεια ένα χρόνο μετά την αμφοτερόπλευρη κυστεκτομή.

Αντιθέτως, ο Ercan et al. (Ercan et al., 2010, 2011) απέδειξε πως δε υπήρχε καμία σημαντική ελάττωση στην AMH του ορού 1 μήνα έπειτα από αμφοτερόπλευρη κυστεκτομή ενδομητρίωματος. Σε άλλη έρευνά του έδειξε πως η λαπαροσκοπική κυστεκτομή σε αμφοτερόπλευρα ενδομητρίωματα εμφάνισε μια ελάττωση των επιπέδων της AMH σε σύγκριση με την προεγχειρητική περίοδο, και τα επίπεδα ελαττωνόταν ακόμη και 3 μήνες μετεγχειρητικά.

Ο Chen et al. (34), μελέτησε της επίδραση της παρουσίας ενδομητρίωματος και της λαπαροσκοπικής κυστεκτομής στο ωθητικό απόθεμα με την εκτίμηση των επιπέδων της AMH στον ορό. Πριν το χειρουργείο η ομάδα με τα ενδομητρίωματα είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα AMH σε σύγκριση με την ομάδα με άλλες καλοήθεις ωθητικές κύστες και την ομάδα υπογονιμότητας εξαιτίας σαλπιγγικών παραγόντων. Αντιθέτως, μια μεγάλη προοπτική έρευνα του Streuli et al., (2012), έδειξε πως

τόσο η ενδομητρίωση όσο και τα ενδομητρίωματα των ωοθηκών δεν ελαττώνουν τα επίπεδα της AMH. Τα επίπεδα της AMH ήταν ελαττωμένα σε γυναίκες με προηγούμενη επέμβαση ενδομητριοσικών κυστών ανεξαρτήτως της παρουσίας των παρόντων ενδομητριομάτων.

5.2 Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (Polycystic ovary syndrome -PCOS) αποτελεί την πιο συχνή ενδοκρινική διαταραχή σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, με έναν επιπολασμό περίπου 5–10 %. Το PCOS είναι η κυριότερη αιτία ανωορρηκτικής υπογονιμότητας (Norman et al., 2007). Οι πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η ανωορρηξία ως αποτέλεσμα των ωοθυλακικών ανωμαλιών σε γυναίκες με PCOS είναι διπλάσια (Jonard & Dewailly, 2004, Webber et al., 2004). Πρώτον, καθώς η πρώιμη ωοθυλακική ανάπτυξη είναι υπερβολική, οι γυναίκες με PCOS χαρακτηρίζονται από υπερβολικά μεγάλο αριθμό μικρών ωοθυλακίων (2πλάσια ή 3πλάσια από τις φυσιολογικές ωοθήκες). Δεύτερον, η επιλογή ενός ωοθυλακίου από το αυξημένο απόθεμα ωοθυλακίων και η περαιτέρω ωρίμανση του σε κυρίαρχο ωοθυλάκιο δεν λαμβάνει χώρα. Η δεύτερη αυτή ανωμαλία στην ωοθυλακιογένεση ονομάζεται ωοθυλακική σύλληψη (follicular arrest-FA) και εξηγεί την διαταραχή της ωοθυλακικής διαταραχής στο PCOS. Παρά το γεγονός πως η FA δεν έχει ακόμη κάποια σαφή και ομόφωνη εξήγηση, η AMH θεωρείται ως σημαντικός συντελεστής της ανωμαλίας αυτής (Pigny et al., 2003, 2006).

Το PCOS αποτελεί μια σύνθετη ενδοκρινική διαταραχή με τρία κύρια σημεία και συμπτώματα που περιλαμβάνουν, ακανόνιστο έμμηνο κύκλο – ολιγομηνόρροια/ αμηνόρροια (OA), βιοχημικό ή κλινικό υπερανδρογονισμό, τριχοφυΐα, ακμή, αλωπεκία (hyperandrogenism, hirsutism, acne, alopecia - HA) και πολυκυστική ωοθηκική μορφολογία (polycystic ovarian morphology - PCOM). Σύμφωνα με τα κριτήρια του Rotterdam, υπάρχουν τρεις φαινότυποι του PCOS (2004):

- PCOS I: κλασσικός φαινότυπος που πληρεί και τα τρία κριτήρια
- PCOS II: φαινότυπος με OA και HA
- PCOS III: φαινότυπος με HA και PCOM, και

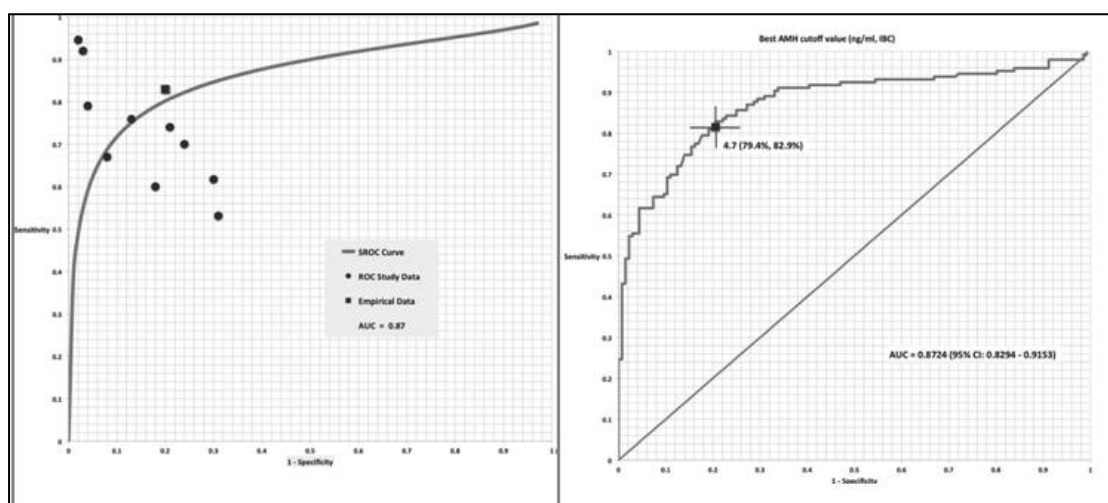
- PCOS IV: φαινότυπος με OA και PCOM

Η παθογένεση της νόσου είναι πολυπαραγοντική, συνδυάζοντας τη γενετική προδιάθεση με την επίδραση του περιβάλλοντος (McAllister et al., 2015). Οι γυναίκες με PCOS θεωρούνται ως μια ομάδα με υψηλό κίνδυνο για παχυσαρκία, διαβήτη τύπου 2, αντίσταση στην ινσουλίνη, μεταβολικά σύνδρομα, διαταραχές γονιμότητας και καρδιαγγειακές παθήσεις (Fausser et al., 2012, Foltyn et al., 2011).

Υπάρχει μια αύξηση των δεδομένων που προτείνουν ότι οι συγκεντρώσεις της AMH μπορεί να αντικαταστήσουν την PCOM εκτίμηση (Dewailly et al., 2011, 2013, Eilertsen et al., 2012), όπως επίσης τα χαρακτηριστικά του υπερανδρογονισμού ή της ανωορρηξίας (Casadei et al., 2013). Πρόσφατα, διενεργήθηκε μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση αναφορικά με την ικανότητα της AMH να διαγνώσει το PCOS. Στην μετα-ανάλυση περιλήφθηκαν 10 μελέτες και κατασκευάστηκε μια περιληπτική καμπύλη ROC. Χρησιμοποιώντας το όριο των 4.7 ng/ml η AMH εμφάνισε μια ευαισθησία και εξειδίκευση των 82.8 και 79.4%, αντίστοιχα. Η AUC ήταν 0.87, και ταυτόσημη με την περιληπτική καμπύλη ROC των 10 ερευνών (εικόνα 7) (Iliodromiti et al., 2013). Έχει υποτεθεί ότι η AMH πιθανόν να μειώνει την ευαισθησία των ωοθυλακίων στην παραγωγή της FSH και της οιστραδιόλης, εμποδίζοντας έτσι την ωοθυλακική επιλογή, έχοντας ως αποτέλεσμα της FA στην φάση των μικρών ωοθυλακίων με την αποτυχία της κυριαρχίας τους.

Η AMH του ορού σε γυναίκες με PCOS είναι υψηλότερες σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες. Αυτό πιθανώς να αντανάκλα των αριθμό των μικρών ωοθυλακίων που παρατηρούνται υπερηχογραφικά στις πολυκυστικές ωοθήκες. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η παραγωγή της AMH ανά κοκκιώδες κύτταρο, είναι κατά 75 φορές υψηλότερη σε ανωορρηκτικές γυναίκες με PCOS, και 20 φορές υψηλότερη στις ανωορρηκτικές γυναίκες με PCOS, σε σύγκριση με τις υγιείς γυναίκες της ομάδας ελέγχου (Park et al., 2010, Pellatt et al., 2007). Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί από μια μελέτη ωοθηκικού υγρού σε μια ομάδα με PCOS (Das et al., 2008). Η αιτία αυτών των υψηλών επιπέδων της AMH παραμένει άγνωστη. Οι υψηλές ποσότητες ανδρογόνων φαίνεται να αποτελούν μια εσωτερική ανωμαλία των κυττάρων της θήκης από τις πολυκυστικές ωοθήκες (Gilling-Smith et al., 1994). Επίσης έχει υποδειχθεί ότι ο υπερανδρογονισμός διεγείρει την

ανάπτυξη των μικρών ωοθυλακίων στην ωοθήκη, προκαλώντας την αύξηση της AMH (Diamanti-Kandarakis et al., 2008). Για να επιβεβαιώσει τα ευρήματα αυτά, ο Cassar et al. (2014) υπέδειξε ότι η τεστοστερόνη είναι ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της AMH συνολικά σε γυναίκες με PCOS. Επιπρόσθετα, η LH ελαττώνει την έκφραση της AMHR-II στα κοκκιώδη κύτταρα των γυναικών με φυσιολογικές ωοθήκες και σε ωορρηκτικό PCOS, αλλά δεν έχει την επίδραση αυτή σε γυναίκες με ανωορρηκτικό PCOS (Pierre et al., 2013). Οι μηχανισμοί αυτοί υποδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο της AMH στην απορρύθμιση των ωορρηξίας.



Εικόνα 7. Η AMH στην διάγνωση του PCOS. Αριστερό διάγραμμα: η περιληπτική καμπύλη ROC των χαρακτηριστικών λειτουργίας των ληπτών, με την αναφορά των τιμών ευαισθησίας και ειδικότητας των 10 ερευνών (κύκλοι), και οι τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας των ενσωματωμένων δεδομένων των ασθενών της μετα-ανάλυσης (τετράγωνα). Δεξιό διάγραμμα: η καμπύλη ROC, η βέλτιστη τιμή αποκοπής και η περιοχή κάτω από την AUC καμπύλη των ενσωματωμένων δεδομένων των ασθενών της μετα-ανάλυσης (Iliodromiti et al., 2013).

Η παρατηρούμενη ελάττωση της AMH με την αύξηση της ηλικίας σε γυναίκες με PCOS φαίνεται πως είναι σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Mulders et al., 2004). Έτσι, έχει προταθεί πως οι γυναίκες με PCOS εμφανίζουν καθυστερημένη γήρανση των ωοθηκών και της ηλικίας εμμηνόπαυσης. Ωστόσο η υπόθεση αυτή πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω στο μέλλον (Mulders et al., 2004; Piltonen et al., 2005; Tehrani et al., 2010).

5.2.1 Η AMH και οι φαινότυποι του PCOS

Τα επίπεδα του ορού της AMH φαίνεται να σχετίζονται με την βαρύτητα του PCOS — γυναίκες με τον κλασσικό φαινότυπο έχουν τα υψηλότερα επίπεδα AMH στον ορό (Piouka et al., 2009, Sahmay et al., 2013). Για την υποστήριξη των ευρημάτων αυτών, ο Tal et al. (2014) ανέφερε πως το 97% των γυναικών με AMH > 10 ng/mL εμφανίζουν PCOS και ότι η AMH σχετιζόταν θετικά με την LH, την ολική τεστοστερόνη, και την θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη. Επιπρόσθετα, η AMH έδειξε υψηλή προγνωστική ικανότητα για την ύπαρξη των διαταραχών του κύκλου. Πρόσφατα, δημοσιευμένες έρευνες έδειξαν ότι η εσωτερική απορρύθμιση των κοκκιωδών κυττάρων, υποδεικνύει την αναλογία της AMH/AFC ως πιο στενά σχετιζόμενη με την κατάσταση του έμμηνου κύκλου, απ' ότι η AMH από μόνη της. Η αναλογία AMH/AFC υπήρξε σημαντικά υψηλότερη στις oligo-αμηνορροιακές γυναίκες με PCOS, παρά σε γυναίκες με κανονική έμμηνο ρύση (Alidic et al., 2015).

5.2.2 Η AMH στην παχυσαρκία και στην αντίσταση στην ινσουλίνη

Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφορικά με την σχέση της AMH και της παχυσαρκίας σε γυναίκες με PCOS. Προσφάτως, ο Olszanecka-Glinianowicz et al. (2015), ανέφερε πως τα επίπεδα της AMH ήταν χαμηλότερα στις παχύσαρκες γυναίκες με PCOS απ' ότι σε γυναίκες με κανονικό βάρος και PCOS. Αντιστρόφως, ο Cassar et al. (2014), δεν βρήκε καμία διαφορά στα επίπεδα της AMH μεταξύ αδύνατων και παχύσαρκων γυναικών με PCOS. Σε προηγούμενες έρευνες, έχει προταθεί πως η αντίσταση στην ινσουλίνη, που σχετίζεται με παχυσαρκία, επηρεάζει την λειτουργία των κοκκιωδών κυττάρων και ελαττώνει την παραγωγή της AMH (Chen et al., 2008). Επιπλέον, η παχυσαρκία μπορεί να έχει μια ανασταλτική επίδραση στην απελευθέρωση των γοναδοτροπινών, καταστέλλοντας την LH και την ωοθυλακική ανάπτυξη, οδηγώντας στην αύξηση των συγκεντρώσεων της AMH (Grossman et al., 2008). Λαμβάνοντας υπόψη πως οι γυναίκες με PCOS έχουν συνήθως αντίσταση στην ινσουλίνη, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ της AMH και της αντίστασης στην ινσουλίνη (insulin resistance -IR). Οι έμμεσες μετρήσεις της IR έχουν σχετιστεί με την AMH είτε αρνητικά είτε θετικά, ή δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση (Olszanecka-Glinianowicz et al., 2015,

Park et al., 2010, Skalbe et al., 2011). Ο Cassar et al. (2014), εκτιμώντας την IR με μια ευγλυκαιμική-υπερινσουλιναιμική συσχέτιση, δεν βρήκε κάποια άμεση σχέση μεταξύ της AMH και της IR. Ωστόσο, η IR επηρεάζει την παραγωγή των ανδρογόνων, ρυθμίζοντας την υπέρ-έκκριση της AMH.

5.2.3 Η AMH στην διάγνωση του PCOS

Η ισχυρή ανάμειξη της AMH στην παθοφυσιολογία του PCOS έχει προκαλέσει μια ευρεία συζήτηση για το κατά πόσο η AMH μπορεί να βοηθήσει στην διάγνωση του PCOS. Τα αυξημένα επίπεδα του ορού της AMH των > 35 pmol/L (ή > 5 ng/mL) έχουν προταθεί για τον ορισμό του PCOM στην διάγνωση της PCOS, ως ένας περισσότερο ευαίσθητος και ειδικός δείκτης, παρά η χρήση της υπερηχογραφικής μέτρησης των ωοθυλακίων (Dewailly et al., 2011). Με τη τελευταία γενιά του υπερηχογραφικού εξοπλισμού, έχει προταθεί πως το όριο του αριθμού των ωοθυλακίων έχει αυξηθεί από 12 (όπως καθορίστηκε το 2003 από τα κριτήρια του Rotterdam) σε 19 ή 25 ωοθυλάκια (Dewailly et al., 2011, Lujan et al., 2013). Ο Lauritsen et al. (2014), παρατήρησε πως η αντικατάσταση του κριτηρίου των πολυκυστικών ωοθηκών άνω των 19 ωοθυλακίων ή μια AMH > 35 pmol/L, έχει ως αποτέλεσμα την επίπτωση του PCOS από 6.3 και 8.5%, αντίστοιχα, και αυτό ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με την επίπτωση του 16.6% σύμφωνα με τα κριτήρια. Επιπλέον, φάνηκε πως η διάγνωση του PCOS σε συνδυασμό με OA και/ή HA with AMH δείχνει μια ευαισθησία 83% και μια εξειδίκευση 100% σύμφωνα με τα κριτήρια Rotterdam (Sahmay et al., 2014).

Επιπλέον, το μέγεθος των αυξήσεων της AMH στο PCOS σχετίζεται με (Laven et al., 2004, Piouka et al., 2009a), με την βελτίωση της αναπαραγωγικής απόδοσης σε σχέση με την απώλεια βάρους (Thomson et al., 2009), και με την σχέση της βελτιωμένης ωορρηκτικής λειτουργίας με την ηλικία (Carmina et al., 2012). Ακόμη περισσότερο, η ανταπόκριση της ωοθηκικής λειτουργίας σε θεραπείες υπογονιμότητας με τον λαπαροσκοπικό καυτηριασμό των ωοθηκών (Elmashad, 2011) να μπορεί να προβλεφθεί από τα αρχικά επίπεδα της AMH. Η AMH μπορεί επίσης να είναι αυξημένη σε κορίτσια της προεφηβείας και της εφηβείας με προεφηβικά PCOS (Villarroel et al., 2011) και στις κόρες γυναικών με PCOS (Crisosto et al., 2007). Ως εκ

τούτου, η δοκιμασία της AMH μπορεί να επιτρέψει την πρώιμη διάγνωση της υποκλινικής νόσου σε αδερφές γυναικών με διάγνωση PCOS.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δημοσιευμένες έρευνες χρησιμοποιούν διαφορετικές δοκιμασίες μέτρησης της AMH, οι τιμές της AMH του ορού της μίας έρευνας μπορεί να μην είναι άμεσα μεταφρασμένες σε μία άλλη. Για τον λόγο αυτό, είναι αδύνατος ο καθορισμός ενός διεθνούς διαγνωστικού ορίου της AMH στον ορό. Έτσι υπάρχει η σύσταση της Androgen Excess Society Task Force να μην θεωρείται μια αυξημένη συγκέντρωση στον ορό της AMH ως ένας ενδεικτικός δείκτης του PCOM, έως ότου γίνει διαθέσιμη η τυποποιημένη δοκιμασία της AMH (Dewailly et al., 2014).

5.3 Άλλες μορφές ανωορρηξίας

Έχει φανεί ότι γυναίκες που εμφανίζουν αμηνόρροια λόγω υποθαλαμικής δυσλειτουργίας έχουν φυσιολογικά επίπεδα AMH, υποδεικνύοντας ένα φυσιολογικό μέγεθος της ανάπτυξης των πρώιμων ωοθυλακίων (Luisi et al., 2012). Συνεπώς, σε γυναίκες με νευρική ανορεξία, τα αρχικά επίπεδα της AMH προβλέπουν τις πιθανότητες της ανάκαμψης της φυσιολογικής λειτουργίας με την απώλεια βάρους (van Elburg et al., 2007). Ωστόσο, δημοσιεύτηκε ένα case-report με μια γυναίκα με υποθαλαμική αμηνόρροια, που αρχικά παρουσίαζε χαμηλά επίπεδα AMH τα οποία αυξήθηκαν έπειτα από διέγερση με γοναδοτροπίνες (Tran et al., 2011).

Αντιθέτως, στην πλειοψηφία των γυναικών που διαγιγνώσκονται με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (primary ovarian insufficiency-POI) (WHO ομάδα 3), τα επίπεδα της AMH ήταν μη ανιχνεύσιμα, υποδεικνύοντας μια πρόωρη εξάντληση των ωοθηκικών αποθεμάτων (Knauff et al., 2009). Επιπλέον, τα επίπεδα της AMH μπορεί να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την έκταση της εξάντλησης των ωοθηκικών αποθεμάτων σε γυναίκες με διάφορες καταστάσεις που μοιάζουν με την POI, όπως η αρχόμενη ωοθηκική ανεπάρκεια (Knauff et al., 2009), η ωοθηκική ανεπάρκεια εξαιτίας αυτό-άνοσης νόσου (La Marca et al., 2009) ή λόγω της απώλειας της λειτουργίας των υποδοχέων της FSH από μετάλλαξη (Kallio et al., 2012). Στο πλαίσιο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί πως τα σημερινά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της POI (όπως συγκεντρώσεις >40 IU/L) δεν στηρίζονται σε επιστημονικά δεδομένα (Broer et al., 2014).

Οι γυναίκες με (μωσαϊκό) σύνδρομο Turner θα αναπτύξουν POI σε νεαρή ηλικία. Έχει βρεθεί πως η AMH είναι υψηλότερη σε γυναίκες με σύνδρομο Turner που καταφέρνουν να βιώσουν την εφηβεία (Visser et al., 2013), και σε γυναίκες με καρύοτυπο που υποδεικνύει καλή πιθανότητα γονιμότητας (Purushothaman et al., 2010). Επιπλέον, στην περίπτωση της διατήρησης της γονιμότητας σε γυναίκες με σύνδρομο Turner, η AMH αντιπροσωπεύει έναν από τους προγνωστικούς παράγοντες για την ύπαρξη ωοθυλακίων στην βιοψία ωοθηκικού ιστού (Borgstrom et al., 2009). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της δυνατότητας της μέτρησης της AMH σε νεαρή ηλικία να μπορεί να βοηθήσει στην λήψη αποφάσεων αναφορικά με τις μελλοντικές προσπάθειες για την διατήρηση της γονιμότητας.

6. Η σχέση της AMH με την θεραπεία του καρκίνου

Είναι πολλές οι ερευνητικές προσπάθειες που έχουν επικεντρωθεί στον μοριακό μηχανισμό της δράσης της AMH (Donahoe et al., 2003, Di Clemente et al., 2003, Josso & Clemente, 2003, Teixeira et al., 2001). Ο κυριότερος στόχος αυτής της προσπάθειας είναι η μετάφραση των ευρημάτων μέσα από νέες θεραπείες ή διαγνωστικά εργαλεία για την διαχείριση των παιδιατρικών νοσημάτων που απαιτούν ιατρική παρέμβαση ή/και χειρουργική αναδόμηση. Επιπρόσθετα των κλινικών χρήσεων των μετρήσεων της AMH, έχει αποκτηθεί μια νέα γνώση από τις βασικές έρευνες της, που αφορά την χρήση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης AMH ως ένα νέο, φυσικό και δυνητικά μη τοξικό αντικαρκινικό φάρμακο, για ασθενείς που εκφράζουν κακοήθειες των υποδοχέων της AMH (Kim et al., 2014).

Καθώς έγινε σαφές ότι η AMH αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση και/ή προκαλεί απόπτωση με ένα ιδιαίτερα εξειδικευμένο τρόπο, προτάθηκε από το Scully (1970) πως η AMH θα μπορούσε να αποτελέσει έναν αναστολέα των προερχόμενων από τους πόρους του Müller καρκίνων. Οι παρατηρήσεις του σχετικά με την επανάκτηση από τους επιθηλιακούς ωθητικούς καρκίνους της εμβρυικής ιστολογίας του Müller (Scully, 1970), οδήγησε στο λογικό ερώτημα του κατά πόσο αυτές οι βλάβες μπορεί να αποτελούν στόχους της AMH. Εάν αυτό ισχύει, η χορήγηση εξωγενούς AMH θα μπορούσε να είναι ένας αποτελεσματικός, με υψηλή εξειδίκευση παράγοντας, ώστε να συμπεριληφθεί στις υπάρχουσες θεραπείες των επιθηλιακών ωθητικών καρκίνων (Berkenblit & Cannistra, 2005, Donahoe et al., 1979, Fuller et al., 1982, Masiakos et al., 1999, Stephen et al., 2002). Ωστόσο, τα αποτελέσματα πρόσφατων πειραμάτων, έχουν ταυτοποιήσει τον τραχηλικό και τον καρκίνο του ενδομητρίου ως άλλους πιθανούς στόχους (Barbie et al., 2003, Josso et al., 2005), όπως επίσης και διάφορους μη-Μυλλεριανούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων του μαστού (Gupta et al., 2005, Hoshiya et al., 2003a, 2003b), του προστάτη (Hoshiya et al., 2003a) και του οφθαλμικού μελανώματος (Parry et al., 1992).

Η συλλογιστική πως ένας φυσικά αναπτυσσόμενος αναστολέας όπως είναι η AMH θα μπορούσε να είναι μια αποτελεσματική επικουρική θεραπεία για τον καρκίνο είναι ελκυστική, επειδή η έκφραση του υποδοχέα II της AMH

είναι περιορισμένη σε τόσους λίγους ιστούς που ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ανεπιθύμητων παρενεργειών. Για τον ίδιο λόγο, η AMH θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα χορήγησης για πιο τοξικά φάρμακα, περιορίζοντας την έκθεση σε ιστούς που δεν αποτελούν στόχους (Kim et al, 2014).

6.1 Η AMH και ο καρκίνος των ωοθηκών

Η εκτίμηση της δυνατότητας της AMH ως ένα αντικαρκινικό φάρμακο, ιδιαίτερα για τους καρκίνους των ωοθηκών, έχει αποτελέσει ερευνητικό αντικείμενο πολλών εργαστηρίων, από την στιγμή που υποτέθηκε ότι ο οποιοσδήποτε καρκίνος Μυλλέριας προέλευσης μπορεί να αποτελέσει στόχο της θεραπείας με AMH (Donahoe et al., 1979, Fuller et al., 1982). Η δυνατότητα χρήσης της AMH στην αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών προβλέπεται από το γεγονός πως η ιστολογία των εμβρυονικών πόρων του Müller κατά κάποιο τρόπο αναπαράγεται στα κοινά ωοθηκικά αδενοκαρκινώματα που προέρχονται από το εξωτερικό επιθήλιο των ωοθηκών (Kim et al, 2014).

Ο καρκίνος των ωοθηκών κάθε χρόνο επηρεάζει περίπου 25.000 γυναίκες της Β. Αμερικής και αποτελεί την 5^η πιο κοινή κακοήθεια των γυναικών με πενταετή θνησιμότητα άνω του 70% (Jemal et al., 2003). Το ποσοστό της θνησιμότητας είναι σημαντικά χαμηλότερο στο στάδιο Ia και Ib της νόσου, αλλά υπάρχει πρώιμη περιτοναϊκή και μεταστατική διασπορά, καθώς σε λιγότερο από το 25% των γυναικών είναι έγκαιρη η διάγνωση σε αρχικά στάδια. Ο συνδυασμός χειρουργικής και κυτταροτοξικής θεραπείας δίνει ικανοποιητική κλινική απόκριση στο 50% με 80% των ασθενών, αλλά δυστυχώς η πλειοψηφία των γυναικών υποτροπιάζει, και γι' αυτό το λόγο καθίσταται επιτακτική η εύρεση νέων θεραπειών για τον καρκίνο των ωοθηκών (Berkenblit & Cannistra, 2005, Salom et al., 2002).

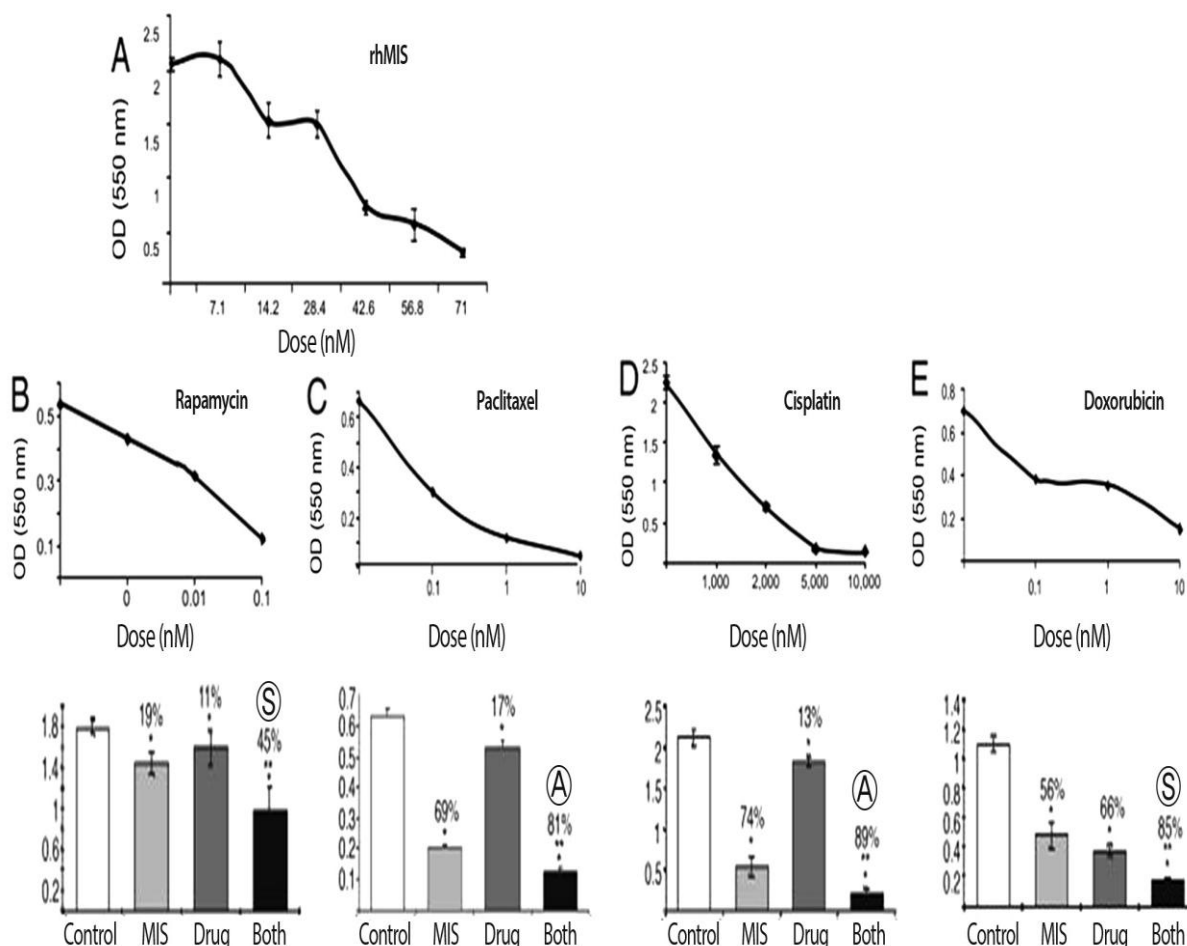
Έχουν διενεργηθεί in vitro έρευνες σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων ωοθηκικών καρκίνων (Donahoe et al., 1981, Chin et al., 1991, Fuller et al., 1982, Ha et al., 2000) ή ιστών (Fuller et al., 1985), καθώς και σειρές από ex-vivo πειράματα κυτταρικών γραμμών ανθρώπινου ωοθηκικού καρκίνου (Berkenblit & Cannistra, 2005). Επίσης, έχουν γίνει έρευνες σε ωοθηκικά καρκινικά κύτταρα δειγμάτων περιτοναίου από ασθενείς με νέα ή

υποτροπιάζουσα νόσο (Masiakos et al., 1999). Ένα σημαντικό εύρημα ήταν πως πάνω από το 50% των ασθενών με ωοθηκικό καρκίνο σταδίου III είχαν κύτταρα που δεσμεύανε την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη AMH, εκφράζανε τους τύπου II υποδοχείς της AMH και η ανάπτυξη τους αναστέλλονταν από την AMH (Masiakos et al., 1999). Δύο νεότερες έρευνες επιβεβαίωσαν και επέκτειναν τα ευρήματα σχετικά με την έκφραση των υποδοχέων καλοηθών και κακοηθών καρκίνων με Μυλλέρια προέλευση (Bakkum-Gamez et al., 2008, Song et al., 2009). Ως εκ τούτου, η συχνότητα εμφάνισης των περιπτώσεων απόκρισης στην AMH είναι επαρκώς υψηλή ώστε να δικαιολογεί περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, οι παρατηρήσεις σε νωπά χειρουργικά δείγματα και σε ασκητικό υγρό είναι πιθανώς πιο σημαντικές σήμερα, καθώς αντανakλούν την πραγματικότητα του ασθενή και όχι κυτταρικές σειρές. Η έκφραση των υποδοχέων είναι συχνή σε τυχαία δείγματα καρκίνου των ωοθηκών και οι υποδοχείς φαίνονται να είναι λειτουργικοί καθώς η AMH αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Masiakos et al., 1999).

Οι προ-κλινικές μελέτες της AMH σε καρκίνο των ωοθηκών έχουν εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη ενός νέου μοντέλου ποντικών (Connolly et al., 2003). Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τον φαινότυπο του πιο κοινού ανθρώπινου ωοθηκικού καρκίνου, το ορώδες κυσταδένωμα, με ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό (50%) των ποντικών να αναπτύσσουν καρκίνο μέσα σε λίγους μήνες από την γέννηση. Οι κυτταρικές γραμμές αυτών των όγκων, που ονομάζονται κύτταρα MOVCAR, εκφράζουν το mRNA των υποδοχέων τύπου II της AMH, αναπτύσσονται ταχέως στην καλλιέργεια, και *in vitro* ανταποκρίνονται στην AMH με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο με πάνω από 95% αναστολή της αύξησης τους (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006).

Για την *in vivo* επίδραση της AMH, εμφυτεύτηκαν στο πόδι ή στο υποδόριο λίπος των ποντικών καρκινικά κύτταρα MOVCAR κατά την 6η εβδομάδα ζωής. Οι όγκοι εμφάνισαν μια δόσο-εξαρτώμενη συμπεριφορά και στις δυο περιοχές εμφύτευσης. Όταν εμφυτεύονταν 10.000 κύτταρα ο όγκος εμφανιζόταν περίπου σε δέκα εβδομάδες. Συγκριτικά, τα 100.000 κύτταρα παρήγαγαν όγκους στις οκτώ εβδομάδες, και οι όγκοι γινόνταν ορατοί στις εννέα εβδομάδες από την εμφύτευση 3×10^6 κυττάρων, και τα 12×10^6 κύτταρα

παρήγαγαν ορμόνες σε διάστημα περίπου τεσσάρων εβδομάδων. Η ενδοπεριτοναϊκή εμφύτευση AMH στα ζώα επιμήκυνε σημαντικά το διάστημα της εμφάνισης και του μεγέθους του όγκου. Δεν καταγράφηκε καμία τοξικότητα και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως το διάστημα έκθεσης στην AMH στα ποντίκια είναι σχεδόν ισοδύναμο με περίπου 7 χρόνια συνεχούς αντικαρκινικής θεραπείας στον άνθρωπο, η AMH μπορεί να θεωρηθεί σχετικά ασφαλής. Σε ένα προκαταρκτικό πείραμα, ένας MOVCAR όγκος αφέθηκε να αναπτύσσεται για πάνω από 20 εβδομάδες στο υποδόριο λίπος ποντικών πριν την χορήγηση θεραπείας με AMH. Ο όγκος εμφάνισε πλήρη υποχώρηση έπειτα από 5 εβδομάδες από την έναρξη της θεραπείας (MacLaughlin & Donahoe, 2008).



Εικόνα 8. Απαντήσεις των *In vitro* δόσεων των κυττάρων MOVCAR7 για το ανασταλτικό υπόστρωμα της AMH και των μεμονωμένων ραπαμυκίνης, πακλιταξέλης, σισπλατίνης και δοξορουμπικίνης (Α-Ε), και κάτω αποτελέσματα του συνδυασμού θεραπειών. (S) Η ραπαμυκίνη και η δοξορουμπίνη ήταν συνεργατικές με την AMH. (A) Η πακλιταξέλη με την σισπλατίνη προσθετικές. Η AMH από μόνη της ήταν πάντα σημαντικά διαφορετική από τις συνδυασμένες θεραπείες (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006)

Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών της φάσης I, η AMH θα μπορεί να χορηγηθεί στους ασθενείς σχεδόν ταυτόχρονα με τα άλλα φάρμακα. Έτσι ήταν σημαντική η μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ της AMH και των συνήθων χρησιμοποιούμενων κυτταροτοξικών παραγόντων. Η έως τώρα έρευνα του μηχανισμού δράσης έδειξε πως τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος της AMH περιλαμβάνουν Smads, κυκλίνo-εξαρτώμενους αναστολείς κινάσης και μεταγωγικές οδούς κυτοκίνης. Επίσης, η AMH αυξάνει την έκφραση του p16, ενός αναστολέα της προόδου του κυτταρικού κύκλου, των p107 και p130, όπως επίσης της σχετιζόμενης-E2F1 πρωτεΐνης απόπτωσης (Bakkum-Gamez et al., 2008). Σε μια μετέπειτα έρευνα σε μια κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων ταυτοποιήθηκε ένας αριθμός άλλων γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται επίσης από την AMH (Nam et al., 2009).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως ο μηχανισμός δράσης της AMH είναι διαφορετικός από αυτούς που στοχεύουν οι περισσότεροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Εάν θα μπορούσαν η AMH και τα φάρμακα να δράσουν συνδυαστικά θα μπορούσε να καταστεί δυνατή η ελάττωση της απαιτούμενης δόσης του κάθε ενός παράγοντα, με πιθανή ελάττωση της τοξικότητας. Στην πραγματικότητα, οι προκαταρκτικές έρευνες με επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα *in vitro*, έδειξαν πως η συνδυασμένη θεραπεία με την AMH μπορεί πράγματι να οδηγήσει στην ελάττωση της τοξικότητας, ενώ παράλληλα θα ρυθμίζει ή θα ενισχύει την κλινική αποτελεσματικότητα (εικόνα 8) (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006). Καταγράφηκε η απόκριση από την χρήση των κυττάρων MOVICAR σε μοντέλο ποντικών στη ραπαμυκίνη (rapamycin) και σε τρία χημειοθεραπευτικά φάρμακα του καρκίνου των ωοθηκών, την πακλιταξέλη, σισπλατίνη και δοξορουμπικίνη (paclitaxel, cisplatin και doxorubicin, αντίστοιχα), και καθορίστηκε η επίδραση της πρόσθεσης της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης AMH. Οι μελέτες αυτές δείχνανε πως ο συνδυασμός ραπαμυκίνης-AMH ήταν συνεργατικός, ο AMH-πακλιταξέλη και ο AMH-σισπλατίνης ήταν προσθετικοί, και ο AMH-δοξορουμπικίνης συνεργατικός (Kim et al., 2014).

6.2 Η δράση της AMH σε άλλους Μυλλέριους ιστούς και καρκίνους

Ο φυσιολογικός τράχηλος και οι τραχηλικοί όγκοι εκφράζουν την πρωτεΐνη του υποδοχέα τύπου II της AMH με την ανοσοϊστοχημεία και το

mRNA σε RT-PCR (Jemal et al., 2003). Οι κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου καρκίνου του τραχήλου απαντούν στην AMH. Τρεις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκινώματος του τραχήλου, οι CaSki, SiHa και C33A εμφάνισαν αναστολή της ανάπτυξης τους με την πρόσθεση *in vitro* της AMH στο αναπτυσσόμενο μέσο ή AMH που παράχθηκε από τα ίδια τα κύτταρα έπειτα από πρόσκαιρη επιμόλυνση με μια μεταγραφική κωδικοποιητική βιοενεργή AMH (Song et al., 2012). Είναι γνωστό πως οι κυτταρικές σειρές των ωοθηκικών καρκίνων απορρυθμίζουν τα p16, p130, p107, και E2F1 στην κυτταρική σειρά C33A. Είναι ενδιαφέρον πως η υπερέκφραση των p16, p130, p107, ή των E2F1 αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη σε σύγκριση με άλλους φορείς (Barbie et al., 2003). Τα ευρήματα αυτά του καρκίνου του τραχήλου διευρύνουν περαιτέρω τους στόχους της AMH.

Εκτός από τον τράχηλο, οι σάλπιγγες, η ωοθηκική επένδυση και η μήτρα αποτελούν επίσης δομές του Müller. Το mRNA των υποδοχέων τύπου II της AMH εκφράζεται στους πόρους του Müller των θηλυκών εμβρύων ποντικών μεταξύ της 13-19ης ημέρας της ανάπτυξης και στο μεσέγχυμα της μήτρας κατά την διάρκεια της πρώτης ημέρας ζωής. Επίσης, κατά την ανάλυση ανευρέθηκε η πρωτεΐνη του υποδοχέα τύπου II της AMH στις καρκινικές κυτταρικές σειρές AN3CA του ανθρώπινου ενδομητρίου και στην φυσιολογική και κυοφορούσα μήτρα των ενήλικων ποντικών, αλλά όχι στο λεπτό έντερο (Renaud et al., 2005). Στους ανθρώπους, το mRNA των υποδοχέων τύπου II της AMH εντοπίστηκε στο μυομήτριο και στο ενδομήτριο σε μια μετα-εμμηνοπαυσιακή μήτρα και η πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε ενδομήτριους όγκους κατά την ανάλυση western. Και εδώ επίσης, δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές που εκφράζανε τον υποδοχέα mRNA και την πρωτεΐνη αναστάλθηκαν από την AMH (Renaud et al., 2005). Το AN3CA, μια μετάσταση του καρκινώματος του ενδομητρίου, έδειξε σημαντική αναστολή της ανάπτυξης του (αναστολή κατά 57% με 67% της AMH σε σχέση με αυτή του ελέγχου, 0%). Το KLE, μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ένα χαμηλής διαφοροποίησης ενδομήτριο καρκίνο, εμφάνισε επίσης μια σημαντική αναστολή της ανάπτυξης (44.9%) μετά από θεραπεία με AMH. Τα δεδομένα επιμόλυνσης του τραχήλου και του ενδομητρίου υποστηρίζουν το συμπέρασμα ότι οι ανασταλτικές επιδράσεις της ανάπτυξης οφείλονται στο ίδιο το μόριο της AMH παρά στον παράγοντα επιμόλυνσης της καθαρής

πρωτεΐνης του παρασκευάσματος. Σε αντίθεση με τις καρκινικές κυτταρικές της ωοθήκης και του τραχήλου, τα κύτταρα AN3CA δεν εκφράζουν τα p16 ή τα p21, αλλά η AMH επάγει τα p107, p130 και E2F1 (Renaud et al., 2005).

6.3 Η AMH και οι μη-Μυλλέριοι ιστοί και καρκίνοι

Αξίζει να σημειωθεί πως οι υποδοχείς τύπου II της AMH εκφράζονται σε διαφορετικές τοποθεσίες από αυτές των ιστών και γονάδων του Müller. Επιπρόσθετα, στο οφθαλμικό μελάνωμα οι υποδοχείς τύπου II εκφράζονται στους κινητικούς νευρώνες (Wang et al., 2005) και το φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού των αρουραίων, σε επίπεδα αντιστρόφως ανάλογα της κατάστασης πολλαπλασιασμού του ιστού (Segev et al., 2001). Σε διάφορους θετικούς και αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς του μαστού, η AMH ενίσχυε την IκB των NFκB, με αποτέλεσμα την επαγωγή του IEX-1 mRNA (Segev et al., 2001), ένα άμεσο πρώιμο γονίδιο που επάγεται από την ακτινοβολία, την γ-ιντερφερόνη και το παράγοντα-α νέκρωσης όγκων, αλλά όχι από τον TGFβ (Hoshiya et al., 2003b, Nakshatri et al., 1997, Sovak et al., 1997). Υπήρξε ενίσχυση της απόπτωσης στο επιθήλιο των θηλαστικών που είχαν ενεθεί με AMH, σε σύγκριση με τα θηλαστικά της ομάδας ελέγχου (Segev et al., 2001), και εξαιτίας αυτού ο καρκίνος του μαστού θα μπορούσε να αποτελέσει ακόμη ένα στόχο της θεραπείας με AMH.

Η θεραπεία της AMH για τον καρκίνο μπορεί να συμπεριλαμβάνει και αυτόν του προστάτη (Hoshiya et al., 2003a, Segev et al., 2002). Οι υποδοχείς τύπου II της AMH και δυο υποψήφιοι του τύπου I (Clarke et al., 2001, Gu et al., 1999, He et al., 1993, Jamin et al., 2002, Visser et al., 2001) εκφράζονται στην κυτταρική σειρά του καρκίνου του προστάτη (LNCaP) των ποντικών εξίσου καλά όσο και στους όγκους του προστάτη στους ανθρώπους (Segev et al., 2002). Η AMH μπλοκάρει την ανάπτυξη των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών του καρκίνου του προστάτη και προκαλεί το IRF1, και η γ-ιντερφερόνη ενισχύει την ανασταλτική δράση της AMH τόσο in vitro όσο και in vivo. Επιπλέον, εξαιτίας του ότι η AMH καταστέλλει την παραγωγή τεστοστερόνης (Baarends et al., 1995, Josso et al., 1975, Lee et al., 1999, Trbovich et al., 2001) θα μπορούσε πράγματι να ασκήσει μια διπλή δράση στον καρκίνο του

προσάτη, μια άμεση με αναστολή της ανάπτυξης και μια έμμεση με την επίδραση στην ελάττωση της τεστοστερόνης.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. Μέθοδοι και διαδικασίες της έρευνας

7.1 Σκοπός της έρευνας

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης αυτής διερευνήθηκαν διαφορετικές ομάδες ασθενών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, με διαφορετικό ορμονικό προφίλ και διαφορετική φαρμακευτική προσέγγιση. Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διαγνωστικής αξίας της AMH σε σχέση με την FSH, LH, τον αριθμό των ωοθυλακίων, την ποιότητα των ωαρίων και τις κυήσεις της κάθε ομάδας ασθενών. Επίσης, η μελέτη των επιπέδων AMH σε καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού και των ωοθηκών.

7.2 Υλικό και μέθοδος

Σχεδιάστηκε μια συγχρονική μελέτη που αφορούσε ασθενείς που παρακολουθούνταν στην Α Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών σε χρονικό διάστημα από 26/05/2010 έως 19/09/2014.

Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς του τμήματος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, πριν την ένταξη τους σε κάποιο πρόγραμμα. Υπήρξαν συνολικά τέσσερις ομάδες ασθενών: η ομάδα ελέγχου, η ομάδα με φτωχή απάντηση και με συνεχείς αποτυχημένες προσπάθειες, η ομάδα με καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού, και η ομάδα με καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις των ωοθηκών. Σε όλες τις γυναίκες πραγματοποιήθηκε μια αιμοληψία για τον ορμονικό προσδιορισμό πριν από την ένταξη τους σε κάποιο από τα πρωτόκολλα της εξωσωματικής γονιμοποίησης και σε μη καθορισμένη ημέρα του έμμηνου κύκλου.

Οι ορμονικοί προσδιορισμοί των δειγμάτων και η αξιολόγηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με την χρήση της AMH Gen II ELISA.

8. Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των μεταβλητών παρουσιάζονται χρησιμοποιώντας των αριθμό των συμμετεχόντων (N), τις μέσες τιμές (μ.τ), και τις τυπικές αποκλίσεις (τ.α). Στις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιούμε τις συχνότητες (v) και τα αντίστοιχα ποσοστά (%).

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων θα γίνει χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov test και το normal probability plot.

Χρησιμοποιώντας Receiver operating curve (ROC) analysis μπορούμε να εξετάσουμε την προγνωστική αξία του δείκτη AMH για την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών και την ύπαρξη υπογονιμότητας υπολογίζοντας την επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (area under the curve , AUC) και το 95% ΔΕ αυτής. Επιπλέον θα εκτιμηθούν οι δείκτες ακριβείας sensitivity, specificity, positive and negative predictive values για διαφορετικά cut-off points του δείκτη AMH.

Το πολλαπλό μοντέλο γραμμικής και λογιστικής παλινδρόμησης (linear, logistic regression model) θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των εξαρτημένων μεταβλητών με τον δείκτη AMH προσαρμοζόμενη ως προς διάφορους συγχυτικούς δημογραφικούς και κλινικούς παράγοντες.

Για την χρήση των παραπάνω μοντέλων ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις εφαρμογής τους:

- τα σφάλματα (residuals) να ακολουθούν κανονική κατανομή (γραφική παράσταση των κανονικοποιημένων σφαλμάτων),
- τα σφάλματα (residuals) να έχουν σχεδόν σταθερή διακύμανση (γραφικός έλεγχος των σφαλμάτων πρόβλεψης της εξαρτημένης Y όταν χρησιμοποιούνται όλες οι ανεξάρτητες εκτός της Xi και γραφικός έλεγχος των σφαλμάτων πρόβλεψης της ανεξάρτητης όταν χρησιμοποιούνται όλες οι ανεξάρτητες εκτός της Xi).
- οι μετρήσεις να είναι στατιστικά ανεξάρτητες (Durbin-Watson test , τιμές κοντά στο 2 δηλώνουν σφάλματα χωρίς συσχέτιση),
- να μην υπάρχει συγγραμμικότητα (collinearity) ανάμεσα στις ανεξάρτητες μεταβλητές [δείκτης VIF –variance inflation factor – τιμές πάνω από 2 δηλώνουν πρόβλημα, δείκτης Condition Index- τιμές

πάνω από 15 δηλώνουν μικρο ενώ πάνω από 30 μεγάλο πρόβλημα, δείκτης Tolerance τιμές κάτω από 0,2 δηλώνουν πρόβλημα.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Όλα τα τεστ είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Η τιμή $p\text{-value} < 0.05$ καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς .

9. Αποτελέσματα

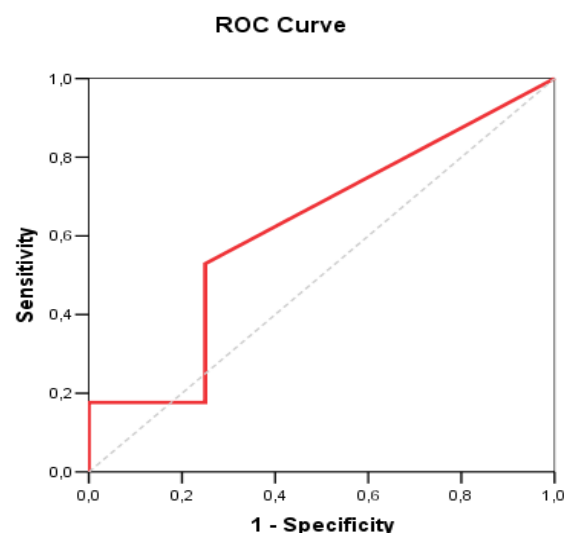
9.1 Αποτελέσματα AMH-Ca Μαστού

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως ο δείκτης της AMH (AUC:0.618; 0.30-0.93) δεν είναι στατιστικά σημαντικός εκτιμητής του καρκίνου του μαστού (πίνακας 1). Η καλύτερη τιμή cut-off η οποία μεγιστοποιεί την ευαισθησία και την ακρίβεια είναι η τιμή **AMH=0,035** με ευαισθησία 53%, ακρίβεια 75%, PPV 90% και NPV 27% (γράφημα 1).

Πίνακας 1. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού (N=25)

Variable	Area Under the Curve	95% CI		p-value
AMH	0,618	0,304	0,931	0,474

	Values	95% ΔΕ
Sensitivity	53%	28%-76%
Specificity	75%	22%-98%
PPV	90%	54%-100%
NPV	27%	7%-61%



Γράφημα 1. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού

Πίνακας 2. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου του μαστού(N=25)

	καλοήθεια		κακοήθεια		p-value
	Μέση τιμή	TA	Μέση τιμή	TA	
AMH	0,040	0,02	0,067	0,101	0,582
	Διάμεσος	IQR	Διάμεσος	IQR	
AMH	0,028	0,032	0,042	0,021	0,517

Παρατηρούμε ότι τα άτομα με κακοήθεια δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στον δείκτη AMH σε σχέση με τα άτομα με καλοήθεια με παραμετρική ($p=0,582$) και μη-παραμετρική ($p=0,517$) ανάλυση (πίνακας 2).

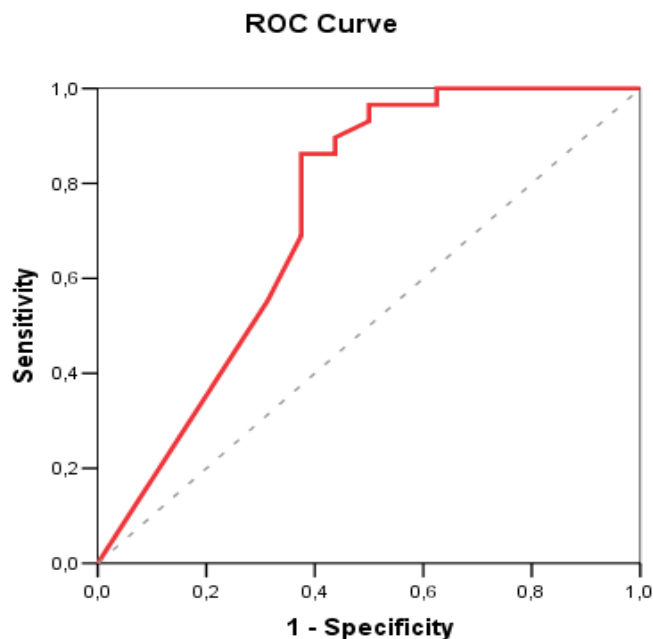
9.2 Αποτελέσματα AMH-Ca Ωοθηκών

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο δείκτης AMH (AUC: 0.732; 0.56-0.91) αποτελεί ένα καλό εκτιμητή του καρκίνου των ωοθηκών (πίνακας 3). Η καλύτερη τιμή cut-off η οποία μεγιστοποιεί την ευαισθησία και την ακρίβεια είναι η τιμή AMH=0,19 με ευαισθησία 86%, ακρίβεια 62%, PPV 81% και NPV 71% (γράφημα 2).

Πίνακας 3. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών (N=53)

Variable	Area Under the Curve	95% CI		p-value
AMH	0,732	0,558	0,905	0,011

	Values	95% ΔΕ
Sensitivity	86%	67%-95%
Specificity	62%	36%-84%
PPV	81%	62%-92%
NPV	71%	42%-90%



Γράφημα 2. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών

Πίνακας 4. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών (N=53)

	καλοήθεια		κακοήθεια		p-value
	Μέση τιμή	TA	Μέση τιμή	TA	
AMH	1,10	1,21	0,15	0,25	0,006
	Διάμεσος	IQR	Διάμεσος	IQR	
AMH	0,66	2,35	0,03	0,06	0,007

Παρατηρούμε ότι τα άτομα με κακοήθεια έχουν στατιστικά σημαντική μικρότερη τιμή του δείκτη AMH σε σχέση με τα άτομα με καλοήθεια με παραμετρική ($p=0,006$) και μη-παραμετρική ($p=0,007$) ανάλυση (πίνακας 4).

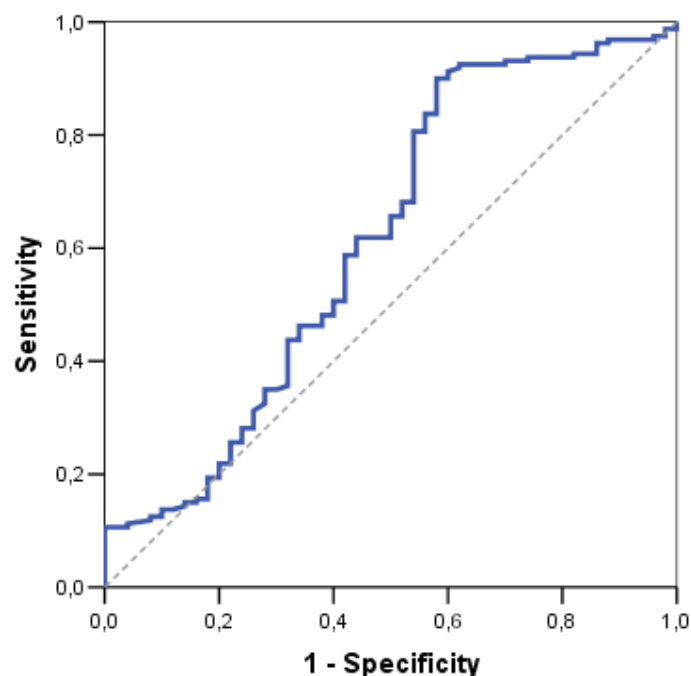
9.3 Αποτελέσματα AMH-υπογονιμότητας

Η ανάλυση έδειξε πως ο δείκτης AMH (AUC: 0.614; 0.52-0.71) αποτελεί ένα στατιστικά σημαντικό εκτιμητή της υπογονιμότητας (πίνακας 5). Η καλύτερη τιμή cut-off η οποία μεγιστοποιεί την ευαισθησία και την ακρίβεια είναι η τιμή AMH=4,18 με ευαισθησία 91%, ακρίβεια 40%, PPV 83% και NPV 57% (γράφημα 3).

Πίνακας 5. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210)

Variable	Area Under the Curve	95% CI		p-value
AMH	0,614	0,516	0,713	0,015

	Values	95% ΔΕ
Sensitivity	91%	85%-95%
Specificity	40%	27%-55%
PPV	83%	76%-88%
NPV	57%	40%-73%



Γράφημα 3. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210)

Πίνακας 6. Σύγκριση του δείκτη AMH για την εκτίμηση της υπογονιμότητας (N=210)

	Control		IVF		p-value
	Μέση τιμή	TA	Μέση τιμή	TA	
AMH	2.95	2.48	2.00	2.11	0,016
	Διάμεσος	IQR	Διάμεσος	IQR	
AMH	2,26	4.17	1.20	2.46	0,015

Παρατηρείται πως τα άτομα με IVF έχουν στατιστικά σημαντική μικρότερη τιμή του δείκτη AMH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με παραμετρική ($p=0,016$) και μη-παραμετρική ($p=0,015$) ανάλυση (πίνακας 6).

9.4 Αποτελέσματα AMH- IVF

Στον πίνακα 7 και Γράφημα 4 παρουσιάζονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης. Η μέση ηλικία ήταν τα 37,5 έτη (ελάχιστη ηλικία τα 23 έτη και μέγιστη τα 58 έτη).

Στο 36,6% των περιστατικών υπήρχε πρόβλημα στον άνδρα και στο 63,4% στην γυναίκα, το 83,9% ακολούθησε μικρό πρωτόκολλο και το 16,1% μακρύ, ενώ στο 15,2% υπήρξε επιτυχής κύησης.

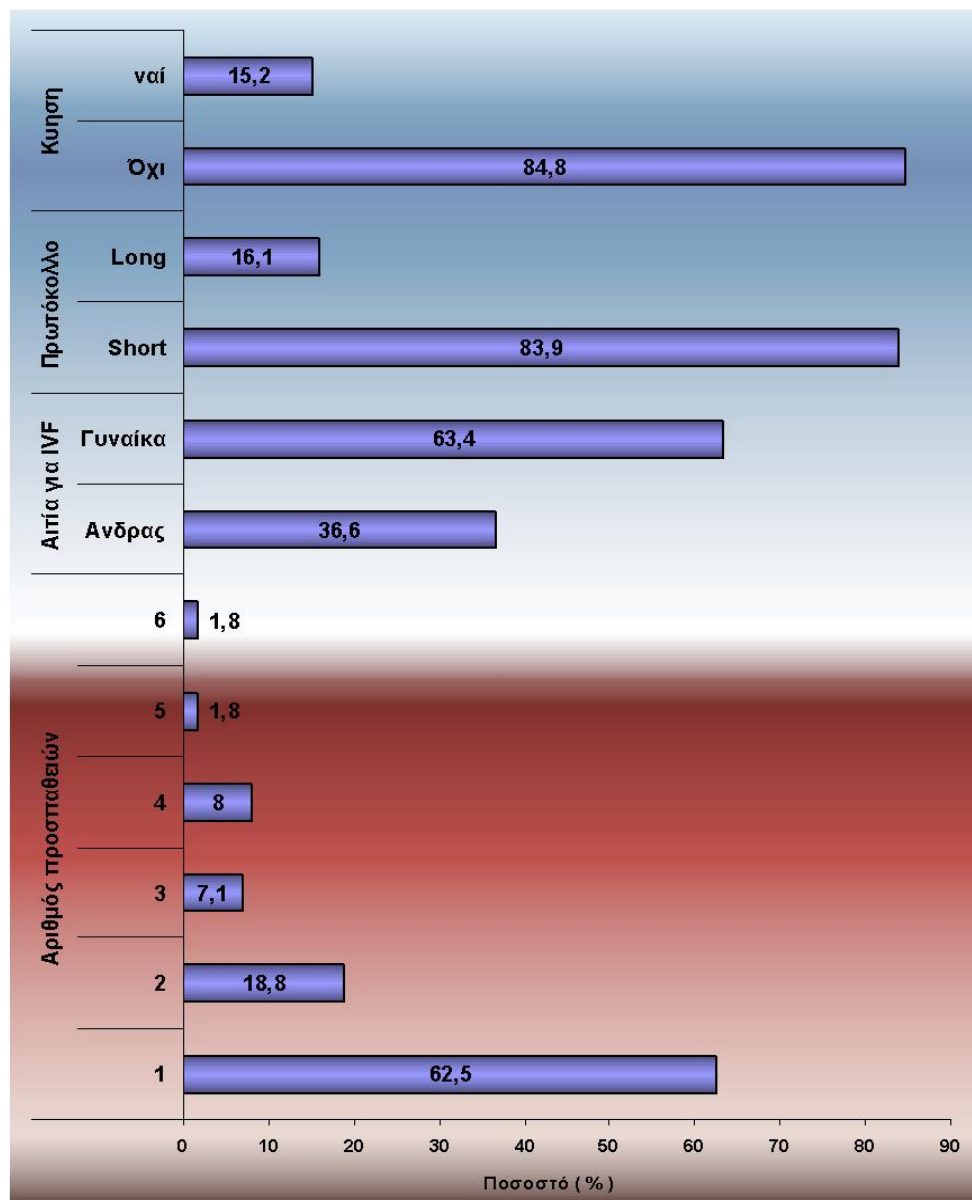
Το 62,5% έκανε 1 προσπάθεια, το 18,8% 2 προσπάθειες, το 7,1% 3 προσπάθειες και το 11,6% πάνω από 3 προσπάθειες.

Η μέση τιμή της FSH ήταν 7,85 (3,3-26,8), της LH ήταν 5,76 (1,8-21,6), της AMH ήταν 1,73 (0,03-6,12) .

Ο μέσος αριθμός ωοθυλακίων ήταν 6,62 (1-15), ωαρίων (1-15) και ποσοστού καλών ωαρίων 73,30 (50-100).

Πίνακας 7. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά

		N	%
Αριθμός προσπαθειών	1	70	62,5
	2	21	18,8
	3	8	7,1
	4	9	8,0
	5	2	1,8
	6	2	1,8
Αιτία για IVF	Άνδρας	41	36,6
	Γυναίκα	71	63,4
Πρωτόκολλο	Short	94	83,9
	Long	18	16,1
Κύηση	Όχι	95	84,8
	Ναι	17	15,2
	Μέση τιμή±TA		διάμεσος (Ελ-Μεγ)
Ηλικία	37,48±5,34		37,50(23-58)
FSH	7,85±3,56		7,00(3,3-26,8)
LH	5,76±3,16		5,10(1,8-21,6)
AMH	1,73±1,42		1,20(0,03-6,12)
Ωοθηλάκια	6,62±3,01		6,00(1-15)
Ωάρια	5,90±3,17		6,00(1-15)
Ποσοστό καλών ωαρίων	73,30±16,89		66,7(50-100)



Γράφημα 4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά

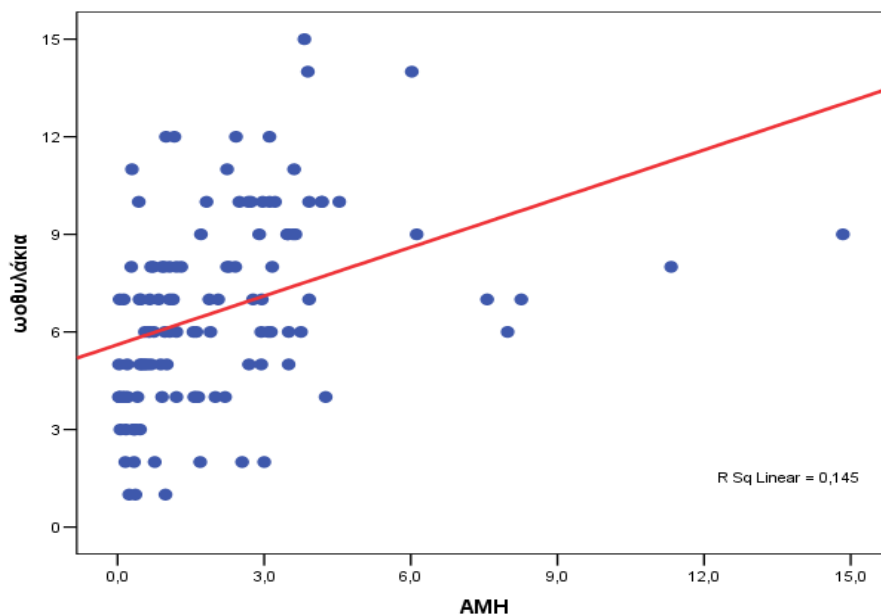
Ο Πίνακας 8 και τα γραφήματα 5,6,7 παρουσιάζουν την συσχέτιση του δείκτη AMH με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά όπως επίσης και με της μεταβλητές αξιολόγησης. Τα περιστατικά που το πρόβλημα υπάρχει στον άνδρα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη τιμή AMH ($p=0,026$) σε σχέση με τις τιμές της γυναίκας.

Πίνακας 8. Συσχέτιση Δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τον δείκτη AMH (<6,2)

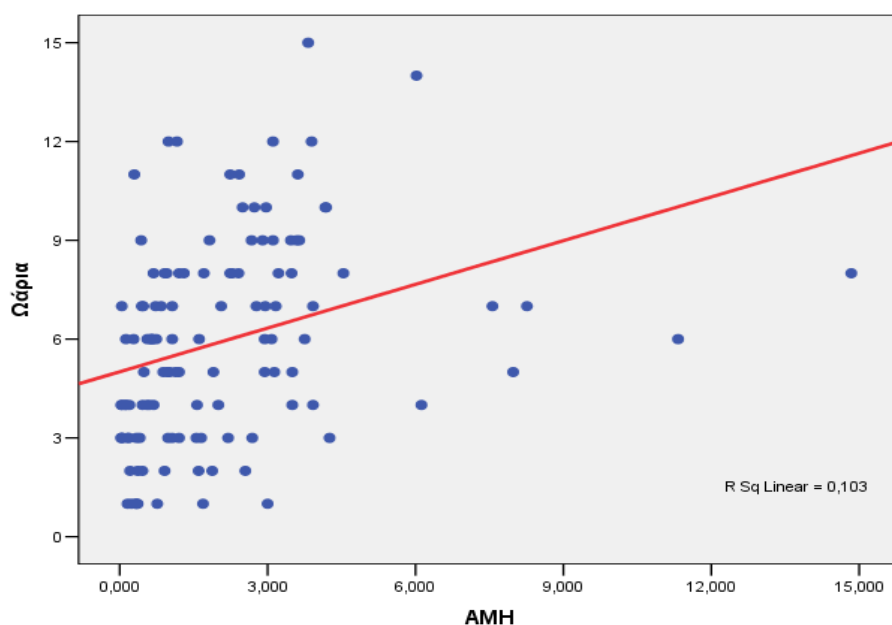
		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	p-value	
Αριθμός προσπαθειών	1	1,82	1,50	0.311	
	2	1,87	1,46		
	3+	1,31	1,03		
Αιτία για IVF	Ανδρας	2,12	1,57	0.026	
	Γυναίκα	1,51	1,28		
Πρωτόκολλο	Short	1,49	1,22	<0.001	
	Long	3,01	1,70		
Κύηση	Όχι	1,64	1,36	0.120	
	ναί	2,22	1,68		
		AMH			
		Pearson's correlation coefficient		p-value	
Ηλικία		-0,261		0,005	
Αριθμός προσπαθειών		-0,137		0,149	
FSH		-0,226		0,017	
LH		0,236		0,012	
Ωοηλάκια		0,527		<0,001	
Ωάρια		0,452		<0,001	
Ποσοστό καλών ωαρίων		-0,138		0,145	
		FSH		LH	
		Pearson's	p-value	Pearson's	p-value
Ωοηλάκια		-0,225	0,017	0,146	0,124
Ωάρια		-0,211	0,026	0,179	0,059
Ποσοστό καλών ωαρίων		0,075	0,434	-0,017	0,858

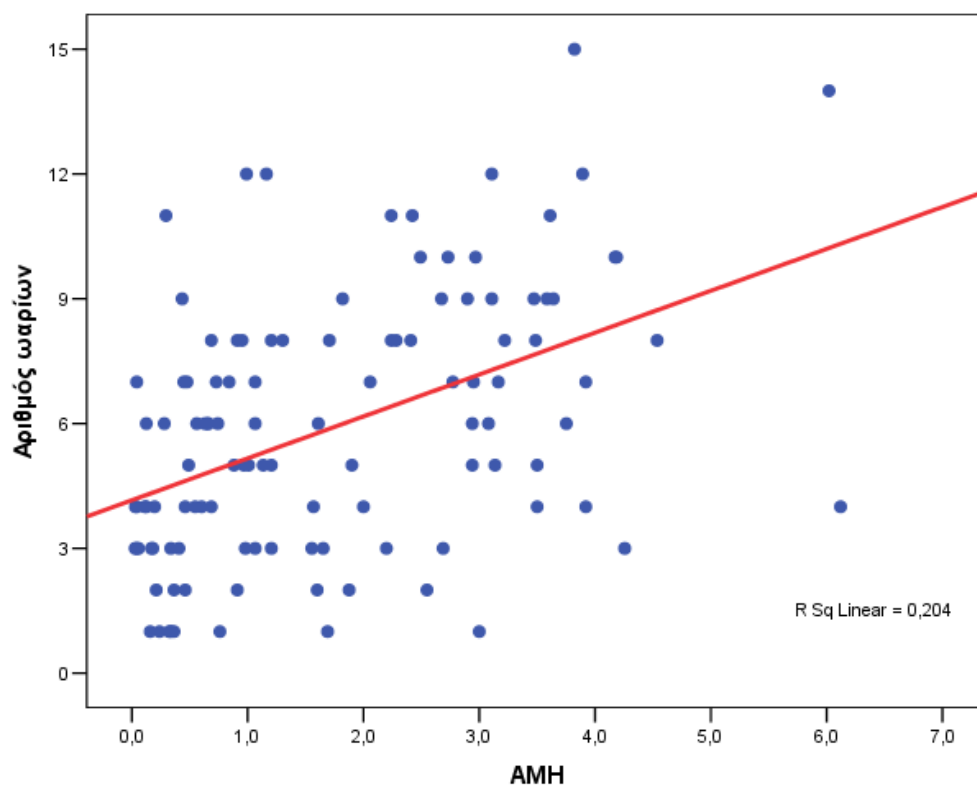
Τα περιστατικά που ακολουθούν μακρύ πρωτόκολλο παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη τιμή AMH ($p < 0,001$) σε σχέση με αυτά με μικρό. Υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του δείκτη AMH με τους δείκτες: Ηλικία ($r = -0.261$ $p = 0,005$), FSH ($r = -0.226$ $p = 0,017$), LH ($r = 0.236$ $p = 0,012$), Ωοθυλάκια ($r = 0.527$ $p < 0,001$), και Ωάρια ($r = 0.452$ $p < 0,001$).

Υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του δείκτη FSH με τους δείκτες των ωοθυλακίων ($r = -0.225$ $p = 0,017$) και των ωαρίων ($r = -0.211$ $p = 0,026$).

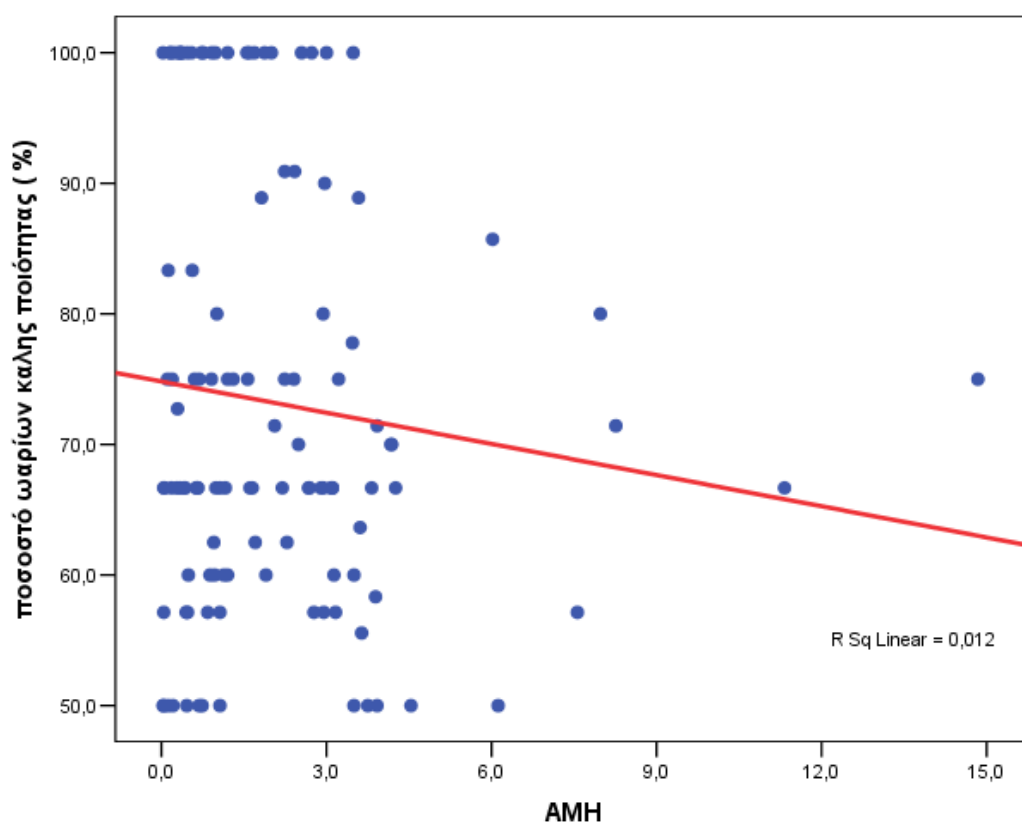


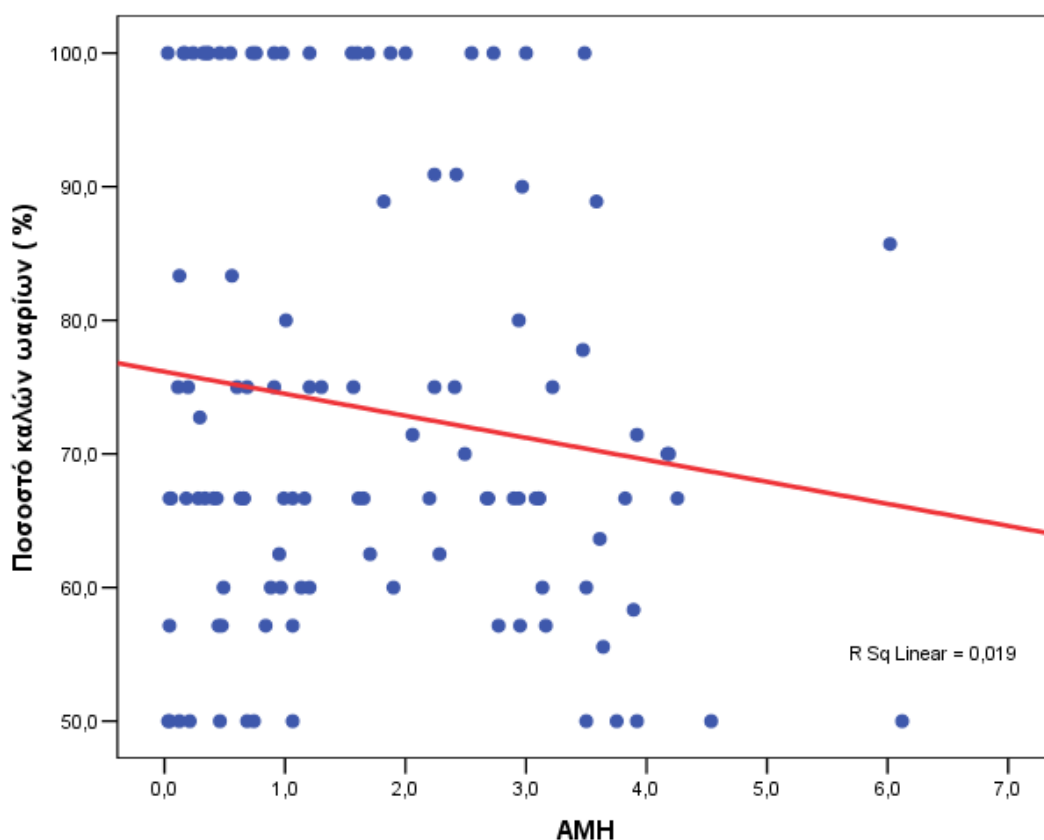
Γράφημα 5. Συσχέτιση ωοθυλακίων με τον δείκτη AMH





Γράφημα 6. Συσχέτιση ωαρίων με τον δείκτη AMH





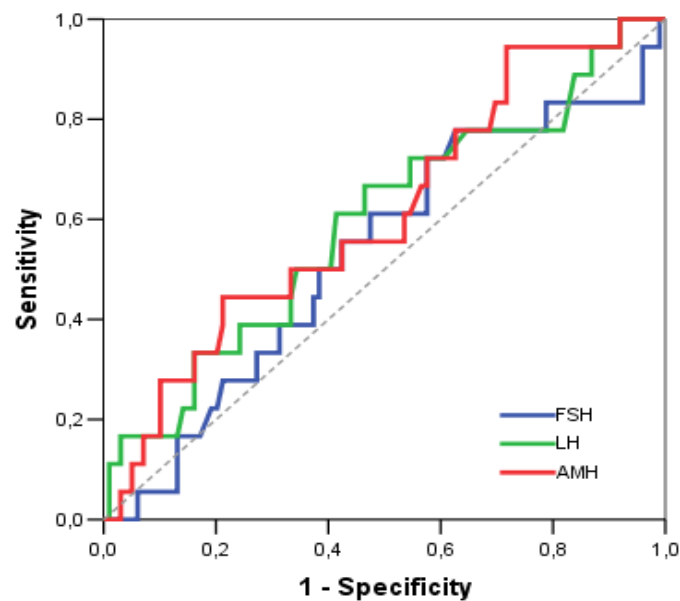
Γράφημα 7. Συσχέτιση ποσοστού ωαρίων καλής ποιότητας με τον δείκτη AMH

Πίνακας 9. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της έκβασης της κύησης

Variable	AUC	95% CI		p-value	Cut-off	Sensitivity	Specificity
FSH	0,532	0,39	0,68	0,664	5,97	78%	37%
LH	0,593	0,45	0,74	0,201	5,35	61%	59%
AMH	0,609	0,47	0,75	0,141	3,04	44%	79%

Ο δείκτης AMH (AUC: 0.609; 0.47-0.75) παρουσιάζει την μεγαλύτερη προγνωστική αξία για την κλινική κύηση χωρίς όμως την ύπαρξη στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος (πίνακας 9). Η καλύτερη τιμή cut-off η οποία

μεγιστοποιεί την ευαισθησία και την ακρίβεια είναι η τιμή AMH=3,04 με ευαισθησία 44%, ακρίβεια 79% (γράφημα 8).



Γράφημα 8. ROC analysis του δείκτη AMH για την εκτίμηση της έκβασης της κύησης

Πίνακας 10. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωοθυλακίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.

	Αριθμός Ωοθυλακίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	ΤΣ	p-value
Ηλικία	---	-0,12	0,05	0,027
Αριθμός προσπαθειών	---	0,07	0,21	0,745
Αιτία για IVF	Γυναίκα	-0,14	0,50	0,782
Πρωτόκολλο (Long)	Short	1,36	0,78	0,086
FSH	--	-0,05	0,07	0,513
LH	---	-0,01	0,08	0,921
AMH	---	0,84	0,19	<0,001

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method με σκοπό την ανίχνευση της επίδρασης των παραγόντων FSH, LH και AMH στον αριθμό ωοθυλακίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης .

Παρατηρείται πως μόνο ο παράγοντας AMH επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωοθυλακίων (βήτα±TA: 0.84±0,19 $p<0,001$), αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων. Επίσης, εμφανίζεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της ηλικίας (βήτα ± TA: -0.12±0,05 $p=0,027$) και του πρωτοκόλλου (βήτα ± TA: 1,36±0,78 $p=0,086$ οριακά) στον αριθμό ωοθυλακίων.

Πίνακας 11. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.

	Αριθμός Ωαρίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	ΤΣ	p-value
Ηλικία	---	-0,17	0,06	0,004
Αριθμός προσπαθειών	---	-0,06	0,22	0,772
Αιτία για IVF	Γυναίκα	0,02	0,54	0,970
Πρωτόκολλο (Long)	Short	1,45	0,84	0,088
FSH	--	-0,06	0,08	0,458
LH	---	0,04	0,09	0,648
AMH	---	0,63	0,21	0,003

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method με σκοπό την ανίχνευση της επίδρασης των

παραγόντων FSH, LH και AMH στον αριθμό ωαρίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης .

Παρατηρείτε ότι μόνο ο παράγοντας AMH επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωαρίων (βήτα $\pm$ TA: $0.63 \pm 0,21$ $p=0,003$), αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων. Επίσης, σημειώνεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής επίδρασης της ηλικίας (βήτα $\pm$ TA : $-0.17 \pm 0,06$ $p=0,004$) στον αριθμό ωαρίων.

Πίνακας 12. Πολυπαραγοντική ανάλυση του ποσοστού καλών ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες.

	Ποσοστό καλών ωαρίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	ΤΣ	p-value
Ηλικία	---	0,61	0,36	0,090
Αριθμός προσπαθειών	---	3,05	1,40	0,032
Αιτία για IVF	Γυναίκα	-4,86	3,38	0,154
Πρωτόκολλο (Long)	Short	5,07	5,29	0,340
FSH	--	0,20	0,50	0,692
LH	---	0,05	0,56	0,927
AMH	---	-1,48	1,30	0,256

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method για την ανίχνευση της επίδρασης των FSH, LH και AMH στο ποσοστό καλών ωαρίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται κανένας από τους 3

δείκτες δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό καλών ωαρίων, αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων.

Μπορεί να σημειωθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής επίδρασης του Αριθμού προσπαθειών (βήτα $\pm$ TA : $3,05 \pm 1,40$ $p=0,032$) στο ποσοστό καλών ωαρίων.

Πίνακας 13. Πολυπαραγοντική ανάλυση της έκβασης κύησης σε σχέση με τον δείκτη AMH (<6,2)

	Έκβαση κύησης				
	Κατηγορία αναφοράς	OR	95% ΔΕ		p-value
Ηλικία	---	0,91	0,79	1,05	0,190
Αριθμός προσπαθειών	---	0,91	0,52	1,58	0,727
Αιτία για IVF	Γυναίκα	0,88	0,27	2,88	0,830
Πρωτόκολλο (Long)	Short	2,71	0,57	12,89	0,209
FSH		1,03	0,85	1,25	0,734
LH		1,07	0,90	1,27	0,444
AMH		1,00	0,63	1,58	0,996

OR : Odds Ratio

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης –enter method για την ανίχνευση της επίδρασης των παραγόντων FSH, LH και AMH στην έκβαση της κύησης, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους 3 δείκτες δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την έκβαση της κύησης, αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων. Βρέθηκε πως κανένας από τους παράγοντες του μοντέλου δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την έκβαση της κύησης.

9.5 Αποτελέσματα (AMH-IVF φτωχή απαντήτρια) N=25 άτομα

Πίνακας 14. Συσχέτιση Δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τον δείκτη AMH

Αριθμός προσπαθειών		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	p-value	
	1	,48	,49	0.867	
	2	,56	,47		
	3+	,39	,15		
Αιτία για IVF	Ανδρας	,72	,60	0.194	
	Γυναίκα	,38	,31		
Πρωτόκολλο	Short (n=25)	,47	,43	----	
	Long	---	---		
Κύηση	Όχι (n=22)	,45	,45	0.429	
	Ναι (n=3)	,66	,19		
		AMH			
		Pearson's correlation coefficient		p-value	
Ηλικία		-0,080		0,705	
Αριθμός προσπαθειών		-0,053		0,802	
FSH		0,082		0,696	
LH		-0,026		0,901	
Ωοηλάκια		0,272		0,188	
Ωάρια		0,309		0,133	
Ποσοστό καλών ωαρίων		0,217		0,298	
		FSH		LH	
		Pearson's	p-value	Pearson's	p-value
Ωοηλάκια		-0,174	0,405	-0,239	0,250
Ωάρια		-0,172	0,411	-0,226	0,278
Ποσοστό καλών ωαρίων		-0,056	0,789	-0,309	0,133

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζεται η συσχέτιση του δείκτη AMH με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά, όπως επίσης και με τις μεταβλητές αξιολόγησης.

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μεταβλητών Αριθμός προσπαθειών ($p=0.867$), Αιτία για IVF ($p=0.194$) και Κύηση ($p=0.429$).

Υπάρχει τάση για στατιστικά σημαντική συσχέτιση του δείκτη AMH με τους δείκτες: Ωοθυλάκια ($r=0.272$ $p=0,188$), Ωάρια ($r=0.309$ $p=0,133$).

Εξαιτίας του μικρού αριθμού των κυήσεων ($N=3$) δεν ήταν δυνατή η εκτέλεση της ROC analysis.

Πίνακας 15. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωοθυλακίων σε σχέση με τον δείκτη AMH ($<6,2$) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες

	Αριθμός Ωοθυλακίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	ΤΣ	p-value
Ηλικία	---	-0,06	0,17	0,731
Αριθμός προσπαθειών	---	-0,29	0,30	0,350
Αιτία για IVF	Γυναίκα	0,85	0,97	0,396
FSH	--	-0,04	0,09	0,655
LH	---	-0,27	0,20	0,206
AMH	---	1,40	0,96	0,160

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method για την ανίχνευση της επίδρασης των παραγόντων FSH, LH και AMH στον αριθμό ωοθυλακίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την

εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης .

Παρατηρείται πως κανένας από τους 3 δείκτες δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωοθυλακίων αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων, παρόλο που ο δείκτης AMH ($p=0,160$) δείχνει τάση στο να επηρεάζει την εξαρτημένη μεταβλητή.

Σημειώνεται πως κανένας από τους παράγοντες του μοντέλου δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωοθυλακίων.

Πίνακας 16. Πολυπαραγοντική ανάλυση του αριθμού ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH ($<6,2$) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες

	Αριθμός Ωαρίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	ΤΣ	p-value
Ηλικία	---	-0,09	0,17	0,621
Αριθμός προσπαθειών	---	-0,50	0,30	0,110
Αιτία για IVF	Γυναίκα	0,93	0,97	0,353
FSH	--	-0,05	0,09	0,596
LH	---	-0,30	0,20	0,163
AMH	---	1,62	0,95	0,106

Ο πίνακας 16 παρουσιάζει το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method με σκοπό την ανίχνευση της επίδρασης των παραγόντων FSH, LH και AMH στον αριθμό ωαρίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης .

Κανένας από τους 3 δείκτες δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωοθυλακίων, αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων, παρόλο που ο δείκτης AMH ($p=0,106$) δείχνει τάση στο να επηρεάζει την εξαρτημένη μεταβλητή.

Κανένας από τους παράγοντες του μοντέλου δεν βρέθηκε να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό ωαρίων.

Πίνακας 17. Πολυπαραγοντική ανάλυση του ποσοστού καλών ωαρίων σε σχέση με τον δείκτη AMH ($<6,2$) περιλαμβάνοντας δημογραφικούς και κλινικούς δείκτες

	Ποσοστό καλών ωαρίων			
	Κατηγορία αναφοράς	Βήτα	TΣ	p-value
Ηλικία	---	0,97	1,79	0,595
Αριθμός προσπαθειών	---	5,66	3,15	0,090
Αιτία για IVF	Γυναίκα	-8,21	10,27	0,434
FSH	--	0,00	0,91	0,999
LH	---	-1,41	2,16	0,523
AMH	---	8,06	10,08	0,434

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζεται το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης –enter method με σκοπό ανίχνευση της επίδρασης των παραγόντων FSH, LH και AMH στο ποσοστό καλών ωαρίων, αφαιρώντας την επίδραση κλινικών και δημογραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο έλεγχος του μοντέλου δεν ανέδειξε καμία παραβίαση στις προϋποθέσεις του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης .

Παρατηρείτε ότι κανένας από τους 3 δείκτες δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό καλών ωαρίων αφαιρώντας την επίδραση πιθανών συγχυτικών παραγόντων.

Εμφανίστηκε μια οριακά στατιστικά σημαντική επίδραση του Αριθμός προσπαθειών (βήτα $\pm$ TA: 5,66 $\pm$ 3,15 $p=0,090$) στο ποσοστό καλών ωαρίων.

10. Συζήτηση

10.1 Η AMH σε συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού

Όπως έδειξε η έρευνα, οι τιμές της AMH ($p=0.474$) δεν βρέθηκε να έχουν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες του δείγματος, καθιστώντας την μη αξιόπιστο δείκτη της πρόγνωσης του. Επίσης, μεταξύ των γυναικών με καρκίνο του μαστού και της ομάδας ελέγχου της έρευνας δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά στις τιμές της AMH (παραμετρική: $p=0,582$, και μη-παραμετρική: $p=0,517$), ικανή για την διαφοροποίηση των δύο ομάδων.

Εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (Breast Cancer Facts & Figures 2013-14) και των μεγάλων δειγμάτων που απαιτούνται για την επίδραση της AMH προοπτικά, υπάρχουν ελάχιστα διαθέσιμα δεδομένα για την τεκμηρίωση αυτής της παρατηρούμενης κλινικής συσχέτισης, μετά την πρώτη δημοσίευση της το 2009. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δεν είναι σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες. Σε μια κλινική μελέτη 30 γυναικών ηλικίας 38 με 50 ετών που υποβλήθηκαν σε βιοψία μαστού, βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα AMH ($p=0.0009$) μεταξύ αυτών με συμπτωματικό καρκίνο (McCoy et al., 2011). Σε μια άλλη έρευνα ασθενών-μαρτύρων του 2013 ($N=108$ περιπτώσεις, 99 μάρτυρες), δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της AMH και του καρκίνου του μαστού (Su et al., 2013). Και στις δύο έρευνες, οι μετρήσεις της AMH διενεργήθηκαν ταυτόχρονα με ή μετά την διάγνωση του καρκίνου, και πιθανών να μην αντανakλούν τα σχετικά επίπεδα πριν την ανάπτυξη του όγκου.

Σε μια μελέτη του Nichols et al. (2015), μεταξύ 458 γυναικών με καρκίνο του μαστού ηλικίας 35-60 ετών και 916 της ομάδας ελέγχου, τα προ-διαγνωστικά επίπεδα της AMH του ορού σχετίζονταν θετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η θετική τάση εμφανιζόταν ισχυρότερη για τις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας με ER-θετικούς όγκους, παρότι οι δοκιμασίες αλληλεπίδρασης με την ηλικία και την ER κατάσταση δεν είχαν σημαντική συσχέτιση.

Μια επιδημιολογική μελέτη του Dorgan et al. (2009), ερευνήσε τις προ-διάγνωσης συγκεντρώσεις της AMH σε σχέση με τον κίνδυνο του καρκίνου

του μαστού, και σε αντίθεση με άλλες αναφορές παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Οι συγκεντρώσεις της AMH μετρήθηκαν από αρχειοθετημένα δείγματα αίματος (N=108 περιπτώσεις, 99 μάρτυρες) από δωρεά με μια μέση ηλικία των 45 ετών. Έπειτα από μια μέση παρακολούθηση 14 ετών, διαγνώστηκαν 105 καρκίνοι του μαστού. Οι συγγραφείς ανέφεραν μια 9,8-πλάσια αύξηση του καρκίνου κατά την σύγκριση μεταξύ 4^{ου} και 1^{ου} τεταρτημορίου του μαστού (OR=9.8; 95% CI: 3.3-28.9). Η επίδραση αυτή ήταν περισσότερο εμφανής μεταξύ των γυναικών που διαγνώστηκαν στις ηλικίες ≥ 55 ετών.

Με βάση τα εργαστηριακά μοντέλα και τις ελάχιστες μελέτες σε ανθρώπους, υποτίθεται πως η άμεση επίδραση της κυκλοφορούσας AMH στον ιστό του μαστού είναι αντι-ογκογονική, ώστε τα υψηλότερα επίπεδα της AMH σχετίζονται με ελαττωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού προ-εμμηνοπαυσιακά, ενώ τα σχετικά υψηλά επίπεδα της AMH πριν την εμμηνόπαυση έχουν θετική συσχέτιση με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού σε μεγαλύτερη ηλικία, ως ένας δείκτης της καθυστερημένης εμμηνόπαυσης. Στην δική μας ανάλυση δεν μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε αυτή την αντίστροφη σχέση, γεγονός που ίσως να οφείλεται στον μικρό αριθμό των γυναικών της έρευνας (N=25) σε σύγκριση με τους αριθμούς των υπολοίπων ερευνών, καθώς και στις διαφορετικές δοκιμασίες μετρήσεων της AMH μεταξύ των ερευνών.

10.2 Η AMH σε συσχέτιση με τον καρκίνο των ωοθηκών

Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι η AMH ($p=0.011$) αποτέλεσε έναν καλό δείκτη για την εκτίμηση του καρκίνου των ωοθηκών σε ένα δείγμα 25 γυναικών. Στην σύγκριση των επιπέδων της AMH μεταξύ καλοηθών και κακοηθών καρκίνων των ωοθηκών, τα άτομα με κακοήθεια είχαν στατιστικά σημαντική μικρότερη τιμή του δείκτη AMH σε σχέση με τα άτομα με καλοήθεια, τόσο με παραμετρική ($p=0,006$) όσο και μη-παραμετρική ($p=0,007$) ανάλυση.

Αντίθετα, σε μία μελέτη περίπτωσης, (107 περιπτώσεις, 208 μάρτυρες), οι συνολικές συγκεντρώσεις της AMH δεν εμφάνισαν συσχέτιση με τον κίνδυνο διηθητικού ορώδους καρκίνου των ωοθηκών (OR 0.93; 95% CI

0.49–1.77 για το άνω σε σχέση με το κάτω ημιμόριο του μαστού, $P_{trend} = 0.83$). Σε γυναίκες μεγαλύτερες από την μέση ηλικία του δείγματος (32,7 χρόνια), ο διπλασιασμός της AMH σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο (OR 0.69; 95 % CI 0.49–0.96), ενώ παρατηρήθηκε ένας αυξημένος κίνδυνος σε γυναίκες μικρότερης ηλικίας, $P_{homogeneity} = 0.002$ (Schock et al., 2014). Οι συγγραφείς πρότειναν πως η σχέση της κυκλοφορούσας AMH με τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών, μπορεί να διαφέρει από την ηλικία της γυναίκας κατά τον καθορισμό της AMH. Επίσης, θεωρούν πως η ανασταλτική αναπτυξιακή δράση της AMH στον κίνδυνο του EOC θα μπορούσε να είναι περισσότερο εμφανής σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, που έχουν συσσωρεύσει μεγαλύτερη γενετική βλάβη με την πάροδο του χρόνου σε σύγκριση με νεαρότερες γυναίκες, και θα μπορούσε να συμβάλλει στην επιβεβαίωση της αντίστροφης σχέσης της AMH με τον υψηλό κίνδυνο ενός διηθητικού καρκίνου των ωοθηκών μετά την ηλικία των 35 ετών. Ωστόσο, η σχέση της AMH με τον κίνδυνο δεν διαφοροποιείται από το μεσολαβούμενο χρονικό διάστημα (Schock et al., 2014).

Ο Walentowicz et al. (2013), εξέτασε τις συγκεντρώσεις της AMH σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, όπως ένας παθολογικός υπότυπος του όγκου, το στάδιο (FIGO), τον βαθμό διαφοροποίησης και την συνολική 5-ετή επιβίωση, σε 72 ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, ηλικίας 45-79 ετών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική κυτταρομείωση του όγκου. Η συνολική μέση συγκέντρωση της AMH ήταν 0.07 (0.0–0.37) ng/mL, ενώ στην ομάδα των γυναικών με θετικές τιμές AMH (≥ 0.14 ng/mL) ήταν 0.31 (0.15–0.73) ng/mL. Δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της AMH στον ορό με το στάδιο FIGO, τον ιστολογικό υπότυπο ή το βαθμό διαφοροποίησης ($P > 0.05$). Η ανάλυση της 5-ετούς επιβίωσης σε σχέση με τα επίπεδα της AMH, δεν έδειξε κάποια σημαντική στατιστική διαφορά. Επίσης δεν βρέθηκε κάποια διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης μεταξύ των ασθενών με θετικά ή αρνητικά επίπεδα AMH στον ορό. Οι συγγραφείς καταλήξανε πως η μέτρηση της AMH δεν αποτελούσε χρήσιμο δείκτη στην πρόβλεψη των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών (Walentowicz et al., 2013). Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, βρέθηκε πως η κατηγοριοποίηση κατά

FIGO I και II είχαν χαμηλότερα επίπεδα AMH από τις γυναίκες με στάδια III και IV κατά FIGO. Αντίθετα, σύμφωνα με την ιστολογική βαθμολόγηση, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές AMH σε γυναίκες με στάδιο G1 (Walentowicz et al., 2013).

Η αναζήτηση μιας εναλλακτικής θεραπείας του ωοθηκικού καρκίνου έχει οδηγήσει την έρευνα σε βιολογικά δραστικές ουσίες που δύνανται να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του όγκου. Ο Masiakos et al. (1999), υπέθεσε πως είναι δυνατόν η AMH να λειτουργήσει ως ένας τέτοιος παράγοντας, εξαιτίας της πρόκλησης της απόπτωσης και της υποστροφής των πόρων του Müller σε έμβρυα, μέσα από την μεταβολή της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν την παρουσία των υποδοχέων τύπου II της AMH στην ωοθήκη και στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών και επιβεβαίωσαν την ανασταλτική τους δράση σε διαγονιδικά ποντίκια. Επιπρόσθετα, έχουν διενεργηθεί δοκιμασίες σε κύτταρα του περιτοναϊκού υγρού ασθενών με καρκίνο ωοθηκών σταδίου κατά FIGO III/IV. Ο Masiakos et al. (1999) εκφράζει την άποψη πως ο καθορισμός της AMH και των υποδοχέων της μέσω της κυτταρομετρίας ροής θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην επιλογή των ασθενών με φτωχή πρόγνωση, αλλά το γεγονός αυτό δεν έχει ως τώρα επιβεβαιωθεί από μετέπειτα έρευνες.

Καθώς δεν υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες έρευνες που να αποδεικνύουν την χρησιμότητα του προσδιορισμού της συγκέντρωσης της AMH στον ορό των ασθενών με επιθηλιακό όγκο των ωοθηκών, δεν είναι ασφαλής η υιοθέτηση των ευρημάτων της παρούσας μελέτης ως ενδεικτικών της σημασίας της AMH. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών ώστε να καταστεί δυνατή η χρησιμότητα και η κεθίρωση της AMH ως ένας εν δυνάμει δείκτης πρόβλεψης και θεραπείας του καρκίνου των ωοθηκών.

10.3 Η AMH σε συσχέτιση με την υπογονιμότητα και την πρόγνωση της IVF

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη της AMH ($p=0,015$), και της εκτίμησης της υπογονιμότητας σε ένα σύνολο 210 γυναικών. Οι γυναίκες με IVF εμφάνισαν

μια στατιστικά σημαντική μικροτερη τιμή της AMH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (παραμετρική: $p=0,016$ και μη-παραμετρική: $p=0,015$ ανάλυση).

Αναφορικά με την έκβαση της κύησης, η έρευνα έδειξε πως η AMH (AUC: 0.609; 0.47-0.75) των γυναικών του δείγματος εμφάνισε την μεγαλύτερη προγνωστική αξία στην έκβαση της κύησης, σε σχέση με τους άλλους δύο δείκτες, την FSH και LH, χωρίς ωστόσο την παρουσία ενός στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος. Επίσης, η καλύτερη τιμή cut-off η οποία μεγιστοποιεί την ευαισθησία και την ακρίβεια ήταν η τιμή $AMH=3,04$, με μια ευαισθησία 44% και με ακρίβεια 79%.

Στην έρευνα του Kedem (2013), μεταξύ 48 κύκλων γυναικών ηλικίας >42 ετών με επίπεδα $AMH \leq 0.2 \text{ ng/ml}$, δεν παρατηρήθηκε καμία κύηση. Στην ίδια έρευνα, καταγράφηκαν 3 κυήσεις σε 192 κύκλους (1.6%) σε γυναίκες με επίπεδα AMH μεταξύ 0.2–1.0 ng/ml. Ο Bhide et al. (2013), παρουσίασε δεδομένα που δείχνουν λογικά αποτελέσματα πιθανότητας κύησης σε γυναίκες άνω των 40 ετών, των 5/54 (9.3%), όταν η AMH ήταν κάτω των 10.28 pmol/l. Επιπλέον, δεν ορίστηκε καμία τιμή αποκοπής της AMH κάτω από την οποία αποκλειόταν η κύηση. Ο Reichman et al. (2014) βρήκε ένα ποσοστό 3.9% κλινικών κυήσεων σε γυναίκες με $AMH < 0.17 \text{ ng/ml}$ και >42 ετών. Ο Seifer et al. (2015), διενήργησε την μεγαλύτερη έρευνα αναλύοντας συγκεντρώσεις της AMH σε πάνω από 5000 κύκλους. Σύμφωνα με τα δεδομένα που συγκέντρωσε, οι κύκλοι των γυναικών με συγκεντρώσεις AMH χαμηλότερες των 0.16 ng/mL είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο ακύρωσης.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών θα μπορούσαν εν μέρει να αποδοθούν στις διαφορετικές δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν στα διαφορετικά χρόνια των ερευνών (Seifer et al., 2015). Επιπλέον, ακόμη και οι παρόμοιες δοκιμασίες κατέγραψαν υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές κατά την ίδια περίοδο. Η AMH μπορεί να διαφέρει ακόμη και μέσα στον ίδιο τον έμμηνο κύκλο. Έτσι, η απλή σύγκριση των αποτελεσμάτων των διαφόρων ερευνών μπορεί να έχει σοβαρά λάθη. Φαίνεται πως σήμερα η μόνη πλήρως αυτοματοποιημένες δοκιμασίες όπως η Roche Elecsys παρέχουν δεδομένα που μπορούν να δώσουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, οι πιθανότητες κύησης σε γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας με χαμηλή AMH, και ιδιαίτερα σε γυναίκες άνω των 42 ετών είναι πολύ χαμηλές, αλλά για την ώρα, η

διαθέσιμες μέθοδοι αποτυγχάνουν να προβλέψουν ποια γυναίκα θα καταστεί έγκυος.

Η δυνατότητα της πρόγνωσης των αποτελεσμάτων της IVF έχει υπάρξει ένας μακροχρόνιος στόχος των ερευνητών (van Loendersloot et al., 2014). Με βασικό στοιχείο την ηλικία της γυναίκας (Bhattacharya et al., 2013, Nelson & Lawlor, 2011, van Loendersloot et al., 2013), έχουν προταθεί μια ποικιλία από μοντέλα (Bhattacharya et al., 2013, Choi et al., 2013, Nelson & Lawlor, 2011, Smith et al., 2015, te Velde et al., 2014, van Loendersloot et al., 2013, 2014) που δείχνουν την μείωση της κλινικής κύησης και των ποσοστών ζώντων γεννήσεων με την αύξηση της ηλικίας (Sunderam et al., 2015). Ως εκ τούτου, επιβεβαιώνεται η άποψη του te Velde et al. (2014) πως η κατασκευή ενός μοντέλου πρόβλεψης των αποτελεσμάτων της IVF οφείλει να λαμβάνει υπόψη τις αλλαγές στα αποτελέσματα από την αύξηση της ηλικίας.

Ωστόσο, η ηλικία δεν αποτελεί την μοναδική πρόγνωση των εκβάσεων των IVF. Το λειτουργικό απόθεμα των ωοθηκών (Functional ovarian reserve - FOR), ένας όρος που αντανakλά το αναπτυσσόμενο ωοθηκικό απόθεμα, και συνεπώς τα ωοκύτταρα και τον αριθμό των εμβρύων, εμπλέκεται επίσης στενά με τα αποτελέσματα της IVF. Ένα ασυνήθιστα χαμηλό FOR (low FOR-LFOR) ορίζεται από την ανώμαλη αύξηση της FSH (Barad et al., 2007) και/ή την ελαττωμένη AMH (Barad et al., 2011), καθώς και οι δύο αντανakλούν την ελάττωση του αριθμού των ωαρίων και των εμβρύων, και συνεπώς τον περιορισμό των πιθανοτήτων της κύησης και των ζώντων γεννήσεων (Lukaszuk et al., 2013).

Σε μία αναδρομική μελέτη ο Gleicher et al. (2016), ερεύνησε την επίδραση της FOR στα αποτελέσματα της IVF, με βάση τον αριθμό των εμβρύων που παρήχθησαν σε ένα δεδομένο κύκλο IVF και με δυο υποψήφια μοντέλα που χρησιμοποιούν την FSH και την AMH. Αυτή η πολυεστιακή εκτίμηση της FOR αποδείχθηκε επιτυχής, δεδομένου ότι, με βάση τα όρια των κλινικών κυήσεων και των ποσοστών ζώντων γεννήσεων, επιτρέπει την διαφοροποίηση της κάθε ηλικιακής κατηγορίας των ασθενών με καλή, ενδιάμεση και κακή πρόγνωση. Με βάση την κλινική κύηση ως το τελικό αποτέλεσμα, οι γυναίκες ≥ 43 δεν μπορούν να οριστούν πλέον με καλή πρόγνωση. Χρησιμοποιώντας τα μέγιστα επίπεδα FSH ως υποκατάστατο της FOR, φάνηκε πως τα ποσοστά της κύησης και των ζώντων γεννήσεων

μειώθηκαν με την αύξηση της FSH και της ηλικίας (Gleicher et al., 2016). Ωστόσο, το μοντέλο αυτό έδειξε ένα εκπληκτικά στενό εύρος καλής-πρόγνωσης: σε γυναίκες <36 years, μόνο η τιμή της FSH ≤ 7.5 mIU/mL, και σε ηλικίες 36–37, μόνο η τιμή FSH ≤ 2.5 mIU/mL αναγνωρίστηκαν ως καλή-πρόγνωση της αναφερόμενης κύησης, ενώ με βάση τις τελικές γεννήσεις, μόνο η ηλικία <36 αναγνωρίστηκε ως καλός προγνωστικό παράγοντας. Ακόμη και η ενδιάμεση πρόγνωση έγινε σπάνια μετά την ηλικία των 40 ετών, και απαιτούνταν επίπεδα FSH <5.0 mIU/mL, ενώ μόνο κακή πρόγνωση έδειξαν οι ασθενείς ≥ 43 ετών. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την σημασία της χρήσης ειδικών της ηλικίας επιπέδων FSH στην εκτίμηση των υπογόνιμων γυναικών (Gleicher et al., 2016).

Ακόμη πιο εντυπωσιακά υπήρξαν τα αποτελέσματα που στηριζόταν στο μοντέλο της AMH (Gleicher et al., 2016). Σε αντίθεση με τα μοντέλα των εμβρύων και της FSH, βρέθηκε ένα τυπικό κωδωνοειδές πρότυπο. Τα χειρότερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις ακραίες τιμές της AMH: η «καλύτερη» AMH ήταν λίγο επάνω από το μέσο. Στα ποσοστά κύησης, το πρότυπο αυτό δεν είχε καλή πρόγνωση για τις ασθενείς ≥ 43 years.

Σε μία έρευνα του Cerra et al. (2016), εξετάστηκε η σχέση μεταξύ δύο πολυμορφισμών της AMH (AMH c.146G>T,p.(Ile49Ser) και AMHR2- 482A>G) με την ωθητική απάντηση γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF. Επίσης, συμπεριλήφθηκε ως μέτρηση του κλινικού αποτελέσματος το ποσοστό των ζώντων κυήσεων. Η έρευνα δεν έδειξε κάποια στατιστική σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) στον δείκτη του ωθητικού αποθέματος και των αποτελεσμάτων της θεραπείας, συμπεριλαμβανομένων του αριθμού των ωκυττάρων που λήφθηκαν και του ποσοστού των ζώντων κυήσεων μεταξύ γυναικών με διαφορετική AMH ή AMHR2 γενότυπου, μετά και την προσαρμογή της ηλικίας, του πρωτοκόλλου διέγερσης και s-AMH ζώνης που χρησιμοποιήθηκε για την κατανομή της θεραπείας.

Παρόμοια ευρήματα κατέδειξε ο Hanevik et al. (2010) καθώς δεν βρήκε κάποια σχέση μεταξύ της AMH και των AMHR2 πολυμορφισμών με την χαμηλή ή υψηλή απάντηση στην διέγερση των ωθητικών. Αντίθετα, ο Peluso et al. (2015), στην μελέτη του σε 186 γυναίκες βρήκε πως οι πολυμορφισμοί της AMH σχετίζονταν με τον αριθμό των παραγόμενων εμβρύων και οι AMHR2 πολυμορφισμοί με τους δείκτες του ωθητικού αποθέματος (AMH,

FSH και AFC). Ωστόσο, δεν διευκρίνισε εάν είχε γίνει κάποια προσαρμογή στο μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης, και έτσι η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη.

Η παρούσα έρευνα έχει δείξει μια σημαντική σχέση της FSH των γυναικών του δείγματος με τους δείκτες των ωοθυλακίων ($r=-0.225$ $p=0,017$) και των ωαρίων ($r=-0.211$ $p=0,026$). Επίσης φάνηκε να υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ της FSH ($r=-0.226$ $p=0,017$) με τον δείκτη της AMH σε ότι αφορούσε την υπογονιμότητα. Σημαντική υπήρξε και η σχέση της AMH με την παρουσία της LH ($r=0.236$ $p=0,012$).

Έχει αποδειχθεί πως τα επίπεδα της FSH του ορού εμφανίζουν έντονη μεταβλητότητα μέσα στον έμμηνο κύκλο ή μεταξύ των κύκλων, γεγονός που έχει περιορίσει την αξιοπιστία του ως ένα δείκτη του ωοθηκικού αποθέματος (Jayaprakasan et al., 2008, Kwee et al., 2004, Scott et al., 1990). Ωστόσο, σε έρευνες όπου έχει χρησιμοποιηθεί ο βαθμός cut-off της FSH των ≥ 10 IU/L, η ειδικότητα έφτασε στο 83% με 100% στην πρόγνωση της φτωχής απάντησης σε COS (3 ή λιγότερα ωοθυλάκια ή 4 ή λιγότερα ωοκύτταρα) (Esposito et al., 2002), παρότι τα επίπεδα της FSH έχουν δείξει μια χαμηλότερη ευαισθησία στην πρόγνωση της φτωχής απόκρισης. Ο Scott et al. (2008) αναφέρει πως δεν βρέθηκαν ζωντανές γεννήσεις σε ασθενείς με επίπεδα FSH που ξεπερνούσαν τα 18 IU/L. Έτσι, τα βασικά επίπεδα της FSH μπορεί να καταστούν χρήσιμα ως μέτρο εκτίμησης του ωοθηκικού αποθέματος στην διάγνωση των γνήσιων φτωχών απαντήσεων. Αναφορικά με τους συνδυασμούς της AMH με την FSH και LH, η επιτροπή ASRM αναφέρει ότι ο συνδυασμός των δεικτών του ωοθηκικού αποθέματος για την πρόβλεψη κύησης μπορεί να είναι κλινικά έγκυρη εξαιτίας της σοβαρής ανομοιογένειας των μετρήσεων, και ότι η προγνωστική αξία ενός τέτοιου είδους συνδυασμού δεν θα είναι μεγαλύτερη απ'ότι ένας δείκτης από μόνος του (Massie et al., 2008).

Ωστόσο, έχει βρεθεί πως τα αυξημένα βασικά επίπεδα FSH δεν σχετίζονται με αύξηση της ανευπλοειδίας σε κλινική κύηση έπειτα από ART (Massie et al., 2008, Thum et al., 2008]. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα FSH σε γυναίκες μικρότερες των 40 ετών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικός δείκτης για την πρόβλεψη της φτωχής απάντησης και της πιθανότητας κλινικής κύησης κατά την COS (Roberts et al., 2005). Γενικά, εάν

η πρόγνωση του ωοθηκικού αποθέματος και της επίτευξης κύησης στηριχτούν μόνο στα βασικά επίπεδα FSH σε γυναίκες με χαμηλό κίνδυνο μειωμένης ωοθηκικής απάντησης (decreased ovarian response - DOR), είναι πιθανό να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Είναι σήμερα ευρέως διαδεδομένη η γνώμη πως η AMH αντανakλά γραμμικά τόσο την ποιότητα όσο και την ποσότητα των ωαρίων, τα οποία μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας της γυναίκας (Nelson et al., 2015, Tal et al., 2015).

Στην περίπτωση της παρούσας εργασίας, βρέθηκε πως η AMH είχε σημαντικό στατιστικό ρόλο στον αριθμό των ωοκυττάρων των γυναικών του δείγματος (βήτα $\pm$ TA : 0.84 ± 0.19 $p < 0.001$), καθώς και στον αριθμό των ωοθυλακίων (βήτα $\pm$ TA: 0.63 ± 0.21 $p = 0.003$). Στον αριθμό των ωοθυλακίων υπήρξε στατιστικά σημαντική η επίδραση τόσο της ηλικίας των γυναικών (βήτα $\pm$ TA: -0.12 ± 0.05 $p = 0.027$) όσο και του πρωτοκόλλου διέγερσης (βήτα $\pm$ TA: 1.36 ± 0.78 $p = 0.086$ οριακά). Βρέθηκε επίσης σημαντική επίδραση της ηλικίας της γυναίκας (βήτα $\pm$ TA: -0.17 ± 0.06 $p = 0.004$) στον αριθμό ωαρίων.

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας. Σύμφωνα με τον Hazout et al. (2004), τα επίπεδα του ορού της AMH έδειξαν μια σημαντική θετική συσχέτιση με τον αριθμό των ωοκυττάρων μετάφασης II που ανακτήθηκαν κατά την διάρκεια COS-IVF κύκλων ($r = 0.38$, $p < 0.05$). Επιπλέον, ο αριθμός των εμβρύων που παρατηρήθηκαν είχαν επίσης σημαντική θετική σχέση με τα επίπεδα της AMH του ορού ($r = 0.34$, $p < 0.05$). Σε μελέτες εκτίμησης της ποιότητας των εμβρύων, οι Smeenk et al. (2007) και Takahashi et al. (2008) δεν ανέφεραν κάποια σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων της AMH στον ορό και της ποιότητας των εμβρύων. Ο Ebner et al. (2006) έδειξε πως η υψηλότερη ποιότητα ωοκυττάρων παρατηρήθηκε σε ασθενείς με επίπεδα AMH του ορού κυμαινόμενα μεταξύ 1.66 ng/mL και 4.52 ng/mL, αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά στην απόκτηση εμβρύων υψηλής ποιότητας μεταξύ των ασθενών που ταξινομήθηκαν με επίπεδα AMH. Ο Silberstein et al. (2006) βρήκε πως η περιοχή κάτω της AUC των επιπέδων της AMH ήταν 0.647 (κακή) στην πρόβλεψη επίτευξης εμβρύων υψηλής ποιότητας, και υποστήριξε πως αντανakλά την κακή κλινική εφαρμοσιμότητα των επιπέδων της AMH.

Αναφορικά με το ποσοστό της κλινικής κύησης, ο Gnoth et al. (2008) (n=132) ανέφερε την απουσία κάποιας σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ασθενών με υψηλά επίπεδα AMH και αυτών με χαμηλά, βασισμένα σε μια τιμή cut-off των 1.26 ng/mL. Ο Silberstein et al. (2006) (n=257) παρατήρησε μια σημαντική διαφορά στον βαθμό εμφύτευσης (28.0% vs. 16.8%, $p<0.001$), αλλά καμία σημαντική διαφορά στο ποσοστό των επίτευξης κύησης (46.4% vs. 34.9%, $p=0.084$) μεταξύ των ομάδων με υψηλό και χαμηλό AMH, με cut-off value των 2.7 ng/mL. Σε μία μετα-ανάλυση του 2013 (περιλάμβανε 28 έρευνες, n=5,705) προτάθηκε πως η AUC των επιπέδων της AMH του ορού ήταν 0.55 (αποτυχία) για την πρόβλεψη μιας κλινικής κύησης (Broer et al., 2013). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση (Tal et al., 2015) (19 έρευνες, n=5,373), τα επίπεδα της AMH είχαν μια AUC των 0.634 (κακή) για την πρόγνωση κλινικής κύησης. Συλλογικά τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα AMH ορού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης της κλινικής κύησης σε ασθενείς με φυσιολογική ωοθηκική απάντηση.

Στις 25 γυναίκες της έρευνας που ανήκαν στην κατηγορία IVF με φτωχή απάντηση, δεν βρήκαμε κάποια σχέση μεταξύ του αριθμού των προσπαθειών ($p=0.867$), της αιτίας για IVF ($p=0.194$) και της κύησης ($p=0.429$). Εμφανίστηκε μόνο μια τάση για συσχέτιση μεταξύ της AMH και των ωοθηλακίων ($r=0.272$ $p=0,188$) και των ωαρίων ($r=0.309$ $p=0,133$).

Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά, σε μια έρευνα εστιασμένη στο ποσοστό ακύρωσης των IVF κύκλων, ο Penarrubia et al. (2005) ανέφερε μια ειδικότητα 96% για τιμές cut-off της AMH των 0.7 ng/mL, εποδεικνύοντας έτσι πως τα επίπεδα της AMH εμφανίζονται υποσχόμενα ως προγνωστικός δείκτης. Ο Muttukrishna et al. (2004), διενήργησε μια προοπτική έρευνα σε γυναίκες με βασικά επίπεδα FSH >10 IU/L ή ηλικίας >38 ετών, και ανέφερε σημαντικές διαφορές των επιπέδων AMH ορού σε ασθενείς των οποίων οι κύκλοι IVF ακυρώθηκαν εξαιτίας της φτωχής απάντησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (0.175 ± 0.04 ng/mL vs. 1.13 ± 0.2 ng/mL, $p<0.05$). Ο McIlveen et al. (2007) ανέφερε ότι η τιμή AUC των επιπέδων AMH ήταν 0.78 (αποδεκτή) στην πρόγνωση της ακύρωσης των IVF κύκλων φτωχής απάντησης, επικυρώνοντας έτσι τα επίπεδα AMH ορού ως έναν δείκτη πρόβλεψης της ακύρωσης των IVF κύκλων.

Σε μία έρευνα εκτίμησης της ποιότητας των εμβρύων, ο Kanoussi et al. (2015) αναφέρει πως, ανεξαρτήτως της ηλικίας, τα χαμηλά επίπεδα AMH ορού ($<1\text{ ng/mL}$) σχετιζόταν με μια σημαντική χαμηλή διαθεσιμότητα υψηλής-ποιότητας βλαστοκυττάρων για κρυοσυντήρηση, σε σχέση με αυτά που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα AMH ($1\text{--}4\text{ ng/mL}$) σε IVF κύκλους.

Όσο αναφορά το ποσοστό της κλινικής κύησης, ο McIlveen et al. (2007) ανέφερε ότι τα επίπεδα ορού της AMH δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης της κλινικής κύησης κατά την διάρκεια ART σε γυναίκες ηλικίας ≥ 39 ετών ή σε κακές ωοθηκικές απαντήτριες. Τόνισε πως τα επίπεδα AMH σχετίζονται με τις μετρήσεις της ποιότητας των ωοκυττάρων, παρά με την ποιότητα τους. Αντίθετα, ο Wang et al. (2015), βρήκε μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της AMH και των ποσοστών κλινικής κύησης σε γυναίκες ηλικίας μεταξύ 34 και 41 ετών. Επίσης, σημείωσαν πως σε γυναίκες ≥ 42 ετών, τα ποσοστά κλινικής κύησης ήταν σημαντικά χαμηλότερα (3%) σε ασθενείς με επίπεδα AMH $\leq 0.29\text{ ng/mL}$, σε σύγκριση με το $\geq 17\%$ σε ασθενείς με επίπεδα ορού που υπερβαίνουν τα 0.3 ng/mL . Σύμφωνα με μια πρόσφατη μετα-ανάλυση του 2015, τα επίπεδα AMH ορού είχαν μια συνολική AUC των 0.696 (95% CI, 0.641–0.751) (σχεδόν καλή), μια συνολική ευαισθησία 69.9% (95% CI, 61.0%–77.9%), και μια συνολική ειδικότητα των 64.7% (95% CI, 60.9%–68.3%) στην πρόγνωση κλινικής κύησης σε φτωχές απαντήτριες ($n=615$), υποδηλώνοντας πως τα επίπεδα AMH ορού μπορεί να αποτελούν έναν αδύναμο δείκτη πρόγνωσης της κλινικής κύησης σε γυναίκες με φτωχή απάντηση (Tal et al., 2015).

11. Συμπεράσματα

Η παρούσα έρευνα έδειξε ότι η AMH εμφανίζεται ως σημαντικός προγνωστικός δείκτης του καρκίνου των ωοθηκών, της υπογονιμότητας και την πρόγνωσης της IVF. Αντίθετα δεν αποδείχθηκε καλός δείκτης πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού. Καθώς το δείγμα της έρευνας είναι μικρό σε σύγκριση με αντίστοιχες έρευνες, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας της AMH. Επιπλέον, καθώς οι εως τώρα έρευνες δεν εμφανίζουν ομοιομορφία αναφορικά με τις δοκιμασίες της AMH, η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι αμφισβητούμενη και καθιστά την ανάγκη καθιέρωσης ενός ευρέως αποδεκτού δείκτη της AMH.

Παραπομπές

1. Abduljabbar M, Taheini K, Picard JY, Cate RL & Josso N. (2012). Mutations of the AMH type II receptor in two extended families with persistent Mullerian duct syndrome: lack of phenotype/genotype correlation. *Horm Res Paediatr* 77:291–297.
2. Alborzi S, Zarei A, Alborzi M & Alborzi M. (2006). Mangement of ovarian endometrioma. *Clin Obstet Gynecol* 49:480-91.
3. Alebić MŠ, Stojanović N & Duhamel A, et al. (2015). The phenotypic diversity in per-follicle anti-Müllerian hormone production in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 30(8): 1927–1933
4. Al Qahtani A, Muttukrishna S, Appasamy M, Johns J, Cranfield M, Visser JA, Themmen AP & Groome NP. (2005). Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Mullerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:267–273
5. Amer SA, Mahran A, Abdelmaged A, El-Adawy AR, Eissa MK & Shaw RW. (2013). The influence of circulating anti-Müllerian hormone on ovarian responsiveness to ovulation induction with gonadotrophins in women with polycystic ovarian syndrome: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol.* 11:115.
6. Andersen CY, Kristensen SG, Greve T & Schmidt KT. (2012). Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in young female oncological patients. *Future Oncol* 8:595–608.
7. Anderson RA & Cameron DA. (2011). Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1336–1343.
8. Anderson RA & Wallace WH. (2013). Antimullerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer. *Fertil Steril* 99:1469–1475

9. Anderson RA, Hindmarsh PC & Wallace WH. (2013). Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue in a patient previously treated for Ewing sarcoma. *Eur J Cancer* 49:2960–2961
10. Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP & Cameron DA. (2006). The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod*. 21:2583–2592. [PubMed: 16820385]
11. Anders C, Marcom PK & Peterson B et al. (2008). A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. *Cancer Invest*. 26:286–295.
12. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O & Borg A et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117–1130.
13. Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, Evans DG, Lalloo F, Narod SA, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL & Southey MC et al. . (2008) The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *Br J Cancer* 98:1457–1466.
14. Appt SE, Chen H, Clarkson TB & Kaplan JR. (2012). Premenopausal antimullerian hormone concentration is associated with subsequent atherosclerosis. *Menopause* 19:1353–1359.
15. Arbo E, Vetori DV, Jimenez MF, Freitas FM, Lemos N & Cunha-Filho JS. (2007). Serum anti-mullerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. *Hum Reprod* 22:3192–3196.
16. Arce JC, La MA, Mirner KB, Nyboe AA & Fleming R. (2013). Antimullerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertil Steril* 99:1644–1653.
17. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK & Leung PC. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22(2):255–288

18. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG & Parvinen M, et al. (1995). Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 136:5614-22.
19. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP & Grootegoed JA. (1995) Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, 136, 4951–4962.
20. Bahadur G, Ozturk O, Muneer A, Wafa R, Ashraf A, Jaman N, Patel S, Oyede AW & Ralph DJ. (2005). Semen quality before and after gonadotoxic treatment. *Hum Reprod.* 20(3):774–781. [PubMed: 15689346]
21. Bahadur G, Ling KL, Hart R, Ralph D, Wafa R, Ashraf A, Jaman N, Mahmud S & Oyede AW. (2002). Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum Reprod.* 17(12):3157–3161. [PubMed: 12456617]
22. Bakkum-Gamez JN, Aletti G, Lewis KA, Keeney GL, Thomas BM, & Navarro-Teulon I, et al. (2008). Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 108:141-8.
23. Barad DH, Weghofer A & Gleicher N. (2007). Age-specific levels for basal folliclestimulating hormone assessment of ovarian function. *Obstet Gynecol.* 109(6):1404–10.
24. Barad DH, Weghofer A & Gleicher N. (2011). Utility of age-specific serum anti-Müllerian hormone concentrations. *Reprod Biomed Online.* 22(3):284–91.
25. Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S & Donahoe PK. (2003). Müllerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15601-6.

26. Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S & Donahoe PK. (2003). Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15601-6.
27. Barfield WD. (2015). Assisted Reproductive Technology Surveillance—United States, 2012. *MMWR Surveill Summ.* 64(Suppl 6):1–29.
28. Behringer RR, Finegold MJ & Cate RL. (1994) Müllerianinhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*, 79, 415–425.
29. Belville C, Marechal JD, Pennetier S, Carmillo P, Masgrau L, Messika-Zeitoun L, Galey J, Machado G, Treton D & Gonzales J et al. (2009). Natural mutations of the anti-Mullerian hormone type II receptor found in persistent Mullerian duct syndrome affect ligand binding, signal transduction and cellular transport. *Hum Mol Genet* 18:3002–3013.
30. Bentzen JG, Forman JL, Larsen EC, Pinborg A, Johannsen TH, Schmidt L, Friis-Hansen L & Nyboe Andersen A. (2012). Maternal menopause as a predictor of anti-Mullerian hormone level and antral follicle count in daughters during reproductive age *Human Reproduction* 0 (0):1–9
31. Bentzen JG, Forman JL, Johannsen TH, Pinborg A, Larsen EC & Andersen AN. (2013). Ovarian antral follicle subclasses and anti-mullerian hormone during normal reproductive aging. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1602–1611.
32. Berkane N & Moutafoff-Borie C. (2010). Impact of previous uterine artery embolization on fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 22:242–247.
33. Berkenblit A & Cannistra SA. (2005). Advances in the management of epithelial ovarian cancer. *J Reprod Med* 50:426-38.
34. Bhattacharya S, Maheshwari A & Mollison J. (2013). Factors associated with failed treatment: an analysis of 121,744 women embarking on their first IVF cycles. *PLoS ONE.* 8(12):e82249.
35. Bhide P, Gudi A, Shah A, Timms P, Grayson K & Homburg R. (2013). Anti-Mullerian hormone as a predictor of pregnancy following IVF. *Reprod BioMed Online* 26:247–252
36. Blockeel C, Jenkins J, Lunenfeld B & Platteau P et al. (2013). Can anti-Mullerian hormone concentrations be used to determine gonadotrophin

- dose and treatment protocol for ovarian stimulation? *Reprod Biomed Online* 26:431–439.
37. Borahay MA, Lu F, Ozpolat B, Tekedereli I, Gurates B & Karipcin S, et al. (2013). Mullerian inhibiting substance suppresses proliferation and induces apoptosis and autophagy in endometriosis cells in vitro. *ISRN Obstet Gynecol* 361489.
 38. Borgstrom B, Hreinsson J, Rasmussen C, Sheikhi M, Fried G, Keros V, Fridstrom M & Hovatta O. (2009). Fertility preservation in girls with turner syndrome: prognostic signs of the presence of ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 94:74–80.
 - Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW & Lambalk CB. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 12:685–718.
 39. Breast Cancer Facts & Figures 2013-14. American Cancer Society; Atlanta:
 40. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS & Fauser BC. (2007). Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 18:58–65.
 41. Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M & Holte J. (2013). Antimullerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1107–1114.
 42. Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van Rooij I, de Vet A, Themmen AP, Laven JS, de Jong FH, te Velde ER & Fauser BC et al. (2011). Anti-Mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2532–2539.
 43. Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE & Fauser BCJM. (2014). Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Human Reproduction Update* (20) 5:688–701
 44. Broekmans FJ, Soules MR & Fauser BC. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 30:465–493.
 45. Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van R I, de VA, Themmen AP, Laven JS, de Jong FH, te Velde ER & Fauser BC et al. (2011). Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2532–2539

46. Broer SL, Dolleman M, van DJ, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PM, Eijkemans MJ, Mol BW & Broekmans FJ. (2013a). Prediction of an excessive response in in vitro fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril* 100:420–429.
47. Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D & Broekmans FJM (2009). Role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 91(3):705–714
48. Broer SL, van DJ, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, Eijkemans MJ, Mol BW & Broekmans FJ. (2013b). Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update* 19:26–36
49. Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA & Wallace WH. (2012). Anti-Mullerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2059–2067.
50. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S & Borini A. (2010). Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 27:441-7.
51. Bulletti C, Panzini I, Borini A, Coccia E, Setti PL & Palagiano A. (2008). Pelvic Factor infertility diagnosis and prognosis of various procedures. *Ann N Y Acad Sci* 1127:73-82.
52. Buyuk E, Seifer DB, Illions E, GraziRV & Lieman H. (2011). Elevated body mass index is associated with lower serum anti-mullerian hormone levels in infertile women with diminished ovarian reserve but not with normal ovarian reserve. *Fertil Steril* 95:2364–2368.
53. Buzi F, Pilotta A, Dordoni D, Lombardi A, Zaglio S & Adlard P. (1998). Pelvic ultrasonography in normal girls and in girls with pubertal precocity. *Acta Paediatr* 87:1138–1145.
54. Byrne J, Fears TR & Gail MH et al. (1992). Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol.* 166:788–793. [PubMed: 1550144]
55. Carmina E, Campagna AM, Mansuet P, Vitale G, Kort D & Lobo R. (2012). Does the level of serum antimullerian hormone predict ovulatory

- function in women with polycystic ovary syndrome with aging? *Fertil Steril* 98:1043–1046.
56. Casadei L, Madrigale A, Puca F, Manicuti C, Emidi E, Piccione E & Dewailly D. (2013). The role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) in the hormonal diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 29:545–550.
 57. Cassar S, Teede HJ & Moran LJ, et al. (2014). Polycystic ovary syndrome and anti- Müllerian hormone: role of insulin resistance, androgens, obesity and gonadotrophins. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 81(6): 899–906
 58. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT & Donahoe PK. (1986) Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 45, 685–698.
 59. Catteau-Jonard S, Pigny P, Reyss AC, Decanter C, Poncelet E & Dewailly D. (2007). Changes in serum anti-Müllerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome *J Clin Endocrinol Metab*. 92:4138–43.
 60. Cerra C, Newman WG, Tohlob D, Byers H, Horne G, Roberts SA & Mohiyiddeen L. (2016). AMH type II receptor and AMH gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve, response, or outcomes in ovarian stimulation *Assist Reprod Genet* 33:1085–1091
 61. Chang HM, Klausen C & Leung PC. (2013). Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertil Steril*. 100(2):585–92.
 62. Chang HL, Pieretti-Vanmarcke R & Nicolaou F et al. (2011). Müllerian inhibiting substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 120(1):128–134
 63. Chen Y, Pei H, Chang Y et al., (2014). The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on ovarian reserve and the exploration of

- related factors assessed by serum anti-Mullerian hormone: a prospective cohort study. *J Ovarian Res*, 7:108
64. Chen MJ, Yang WS & Chen CL, et al. (2008). The relationship between anti-Mullerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 23(4): 952–957
 65. Chin TW, Parry RL & Donahoe PK. (1991). Human mullerian inhibiting substance inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2101-6.
 66. Choi B, Bosch E, Lannon BM, Leveille MC, Wong WH, Leader A, Pellicer A, Penzias AS & Yao MW. (2013). Personalized prediction of first-cycle in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 99(7):1905–11.
 67. Clarke TR, Hoshiya Y, Yi SE, Liu X, Lyons KM & Donahoe PK. (2001) Müllerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. *Molecular Endocrinology*, 15, 946–959.
 68. Cohen-Haguenauer O, Picard Mattei JY, Mattei MG, Serero S, Nguyen VC, de Tand MF, Guerrier D, Hors-Cayla MC, Josso N & Frezal, J. (1987) Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44, 2–6.
 69. Cohlen BJ. (2005). Should we continue performing intrauterine insemination in the year 2004? *Gynecol Obstet Invest* 59(1):3–13.
 70. Connolly DC, Bao R, Nikitin AY, Stephens KC, Poole TW & Hua X, et al. (2003). Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 63:1389-97.
 71. Cramer DW, Xu H & Harlow BL. (1995). Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril* 64:740–745.
 72. Crisosto N, Codner E, Maliqueo M, Echiburu B, Sanchez F, Cassorla F & Sir-Petermann T. (2007). Anti-Mullerian hormone levels in peripubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2739–2743.
 73. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117

- epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 13:1141–1151. [PubMed: 23084519]
74. Cook CL, Siow Y, Brenner AG & Fallat ME. (2002). Relationship between serum Mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril.* 77:141–6.
 75. Coulam CB, Adamson SC & Annegers JF. (1986). Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67:604–606.
 76. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, Beckmann MW & Strissel P. (2007). Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res* 12: 604-8.
 77. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN & Caudhuri K. (2006). Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* 21:2403-7
 78. Das M, Gillott DJ & Saridogan E, et al. (2008). Anti-Mullerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 23(9): 2122–2126
 79. Deb S, Campbell BK, Pincott-Allen C, Clewes JS, Cumberpatch G & Raine-Fenning NJ. (2012). Quantifying effect of combined oral contraceptive pill on functional ovarian reserve as measured by serum anti-Mullerian hormone and small antral follicle count using three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 39:574–580.
 80. de Bruin JP, Bovenhuis H, van Noord PA, Pearson PL, van Arendonk JA, te Velde ER, Kuurman WW & Dorland M. (2001). The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum Reprod* 16:2014–2018.
 81. de Graaff AA, Land JA, Kessels AG & Evers JL. (2011). Demographic age shift toward later conception results in an increased age in the subfertile population and an increased demand for medical care. *Fertil Steril* 95:61–63
 82. Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K & McLennan IS. (2012). The level of serum anti-Mullerian hormone correlates with

- vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab* 97:2450–2455.
83. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen A & Fauser BCJM. (2002). Anti-Mullerian Hormone serum levels: A putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77:357–362.
 84. De Vos M, Devroey P & Fauser BC. (2010). Primary ovarian insufficiency. *Lancet* 376:911–921.
 85. De Vos FY, van Laarhoven HW, Laven JS, Themmen AP, Beex LV, Sweep CG, Seynaeve C & Jager A. (2012). Menopausal status and adjuvant hormonal therapy for breast cancer patients: a practical guideline. *Crit Rev Oncol Hematol* 84:252–260.
 86. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A & Catteau-Jonard S. (2011). Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 26:3123–3129
 87. Dewailly D, Lujan ME & Carmina E, et al. (2014). Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 20(3): 334–352
 88. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD & Kandaraki E, et al. (2008). Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 10(2): e3–212
 89. Dickey RP, Taylor SN, Lu PY, Sartor BM, Rye PH & Pyrzak R. (2005). Risk factors for high-order multiple pregnancy and multiple birth after controlled ovarian hyperstimulation: results of 4,062 intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 83(3):671–83.
 90. di Clemente N, Goxe B, Rémy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B & Salesse R. (1994) Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine*, 2, 553–558.
 91. di Clemente N, Josso N, Gouedard L & Belville C. (2003) Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 211, 9–14.

92. D'Hooghe TM, Vercammen E & Hill JA. (2012). *Endometriosis*. In: Berek and Novak's Gynecology, 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press
93. Dillon KE, Sammel MD, Prewitt M, Ginsberg JP, Walker D, Mersereau JE, Gosiengfiao Y & Gracia CR. (2013). Pretreatment antimüllerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy. *Fertil Steril* 99:477–483.
94. Dolleman M, Faddy MJ, van DJ, van der Schouw YT, Messow CM, Leader B, Peeters PH, McConnachie A, Nelson SM & Broekmans FJ. (2013). The relationship between anti-Müllerian hormone in women receiving fertility assessments and age at menopause in subfertile women: evidence from large population studies. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1446–1453.
95. Dolleman M, Verschuren WMM, Eijkemans MJC, Broekmans FJM & van der Schouw YT. (2015). Added value of anti-Müllerian hormone in prediction of menopause: results from a large prospective cohort study *Human Reproduction*, 30(8):1974–1981, Morreale HF. (2014). Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update* 20:334–352.
96. Dolleman M, Faddy MJ, van DJ, van der Schouw YT, Messow CM, Leader B, Peeters PH, McConnachie A, Nelson SM & Broekmans FJ. (2013a). The relationship between anti-Müllerian hormone in women receiving fertility assessments and age at menopause in subfertile women: evidence from large population studies. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1946–1953.
97. Dolleman M, Verschuren WM, Eijkemans MJ, Dolle ME, Jansen EH, Broekmans FJ & van der Schouw YT. (2013b). Reproductive and lifestyle determinants of anti-Müllerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2106–2115.
98. Donahoe PK, Clarke T, Teixeira J, Maheswaran S & MacLaughlin DT. (2003). Enhanced purification and production of Müllerian inhibiting substance for therapeutic applications. *Mol Cell Endocrinol* 211:37–42.

99. Donahoe PK, Fuller AF Jr, Scully RE, Guy SR & Budzik GP. (1981). Mullerian inhibiting substance inhibits growth of a human ovarian cancer in nude mice. *Ann Surg* 194:472-80
100. Donahoe PK & Maheswaran S. (2000) Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem* 275:28371–28379.
101. Donahoe PK, Swann DA, Hayashi A & Sullivan MD. (1979). Mullerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. *Science* 205:913-5.
102. Dorgan JF, Stanczyk FZ, Eggleston BL, Kahle LL, Shaw CM & Spittle CS, et al. (2009). Prospective case-control study of serum mullerian inhibiting substance and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 101:1501–9. [PubMed: 19820206]
103. Dossus L, Kvaskoff M, Bijon A, Fervers B, Boutron-Ruault MC, Mesrine S & Clavel-Chapelon F. (2012). Determinants of age at menarche and time to menstrual cycle regularity in the French E3N cohort. *Ann Epidemiol* 22:723–730.
104. Dubeau L. (2008). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol* 9(12):1191–1197
105. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen AP. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140:5789–5796.
106. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT & Grootegoed JA et al. (2001). Anti-mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142:4891–4899.
107. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen AP. (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143, 1076–1084.
108. Durlinger AL, Visser JA & Themmen AP. (2002). Regulation of ovarian function: the role of Anti-Mullerian hormone. *Reproduction*. 124:601–9.

109. Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E & Tews G. (2006). Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 21: 2022-6.
110. Elgindy EA, El-Haieg DO & El-Sebaey A. (2008). Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 89(6):1670–6.
111. El-Halawaty S, Rizk A, Kamal M, Aboulhassan M, Al-Sawah H & Noah O, et al. (2007). Clinical significance of serum concentration of anti-Müllerian hormone in obese women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 15:495–9.
112. Elmashad AI. (2011). Impact of laparoscopic ovarian drilling on anti-Mullerian hormone levels and ovarian stromal blood flow using three-dimensional power Doppler in women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 95:2342-6, 2346.
113. Eilertsen TB, Vanky E & Carlsen SM. (2012). Anti-Mullerian hormone in the diagnosis of polycystic ovary syndrome: can morphologic description be replaced? *Hum Reprod* 27:2494–2502.
114. Ercan CM, Sakinci M, Duru NK, Alanbay I, Karasahin KE & Baser I. (2010). Antimullerian hormone levels after laparoscopic endometrioma stripping surgery. *Gynecol Endocrinol* 26:468-7.
115. Ercan CM, Duru NK, Karasahin KE, Coksuer H, Dede M & Baser I. (2011). Ultra sonographic evaluation and antimullerian hormone levels after laparoscopic stripping of unilateral endometriomas. *Eur J Obstet Gyencol Reprod Biol* 158:280-4.
116. Esposito MA, Coutifaris C & Barnhart KT. (2002). A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod* 17:118-23. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R & Taieb J. (2007). Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1796-802.

117. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R & Taieb J. (2003). Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 18:328–332.
118. Fauser BC & Van Heusden AM. (1997). Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 18:71–106.
119. Fauser BC, Diedrich K & Devroey P. (2008a). Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 14:1–14.
120. Fauser BC, Diedrich K & Devroey P. (2008b). Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 14:1–14.
121. Fauser BC, Tarlatzis BC & Rebar RW, et al. (2012). Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 97(1): 28–38.e25
122. Firtz CM & Speroff L. (2011). *Endometriosis diagnosis and suitable treatment for the individual patient*. In: Firtz CM, Speroff L, editors. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press
123. Fleming R & Nelson SM. (2012). Reproducibility of AMH. *Hum Reprod* 27:3639–3641.
124. Fleming R, Broekmans F, Calhaz-Jorge C, Dracea L, Alexander H, Nyboe AA,
125. Fong SL, Lugtenburg PJ & Schipper I et al. (2008). "Anti-m"ullerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies," *Human Reproduction*, 23(3):674–678
126. Freeman EW, Sammel MD & Gracia CR et al. (2005). Follicular phase hormone levels and menstrual bleeding status in the approach to menopause. *Fertil Steril*. 83:383–392. [PubMed: 15705379]
127. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC & Strauss JF III. (2007). Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril* 87:101–106.

128. Freeman EW, Sammel MD, Lin H & Gracia CR. (2012). Anti-mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women. *J Clin Endocrinol Metab* 97:1673–1680.
129. Freour T, Mirallie S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barriere P & Masson D. (2007). Measurement of serum anti-Mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). *Clin Chim Acta* 375:162–164.
130. Foltyn W, Strzelczyk J & Marek B, et al. (2011). Selected markers of endothelial dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol.* 62(3): 243–248
131. Fuller AF Jr, Guy S, Budzik GP & Donahoe PK. (1982). Mullerian inhibiting substance inhibits colony growth of a human ovarian carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1051-5.
132. Fuller AF Jr, Krane IM, Budzik GP & Donahoe PK. (1985). Mullerian inhibiting substance reduction of colony growth of human gynecologic cancers in a stem cell assay. *Gynecol Oncol* 22:135-48.
133. Gianaroli L, Racowsky C, Geraedts J, Cedars M, Makrigiannakis A & Lobo R. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Hum Reprod* 27(12):3365–79.
134. Gigli I, Cushman RA, Wahl CM & Fortune JE. (2005) Evidence for a role for anti-Müllerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 480–488.
135. Gilling-Smith C, Willis DS & Beard RW, et al. (1994). Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 79(4): 1158–1165
136. Giudice IL. (2010). Clinical practice Endometriosis. *N Engl J Med* 362:2389-98.
137. Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, Loredana G, Cristina L & Vincenzo L. (2007). “Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD),” *Hematology* 12(2):141–147, 2007.
138. Gleicher N, Kushnir VA, Sen A, Darmon SK, Weghofer A, WuYG, Wang Q, Zhang L, Albertini DF, Barad DH & Gleicher B et al. (2016)

- Definition by FSH, AMH and embryo numbers of good-, intermediate and poor-prognosis patients suggests previously unknown IVF outcome-determining factor associated with AMH *J Transl Med* 14:172
139. Gleicher N, Weghofer A & Barad DH. (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 94(7):2824–7
 140. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P & Godehardt E. (2008). Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 23:1359-65.
 141. Gold EB. (2011). The timing of the age at which natural menopause occurs. *Obstet Gynecol Clin North Am* 38:425–440.
 142. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME & Siow Y. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril*. 89(5 Suppl):1364–70.
 143. Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL & Themmen AP. (2003). Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 211:85–90.
 144. Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I, Josso N, Massagué J. & di Clemente N. (2000) Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 27973–27978.
 145. Grossman MP, Nakajima ST & Fallat ME, et al. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril*. 89(5 Suppl): 1364–1370
 146. Gougeon A. (1984). Caracteres qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l’ovaire humaine adulte. *Contracept Fertil Sex* 12:527–535.
 147. Gupta V, Carey JL, Kawakubo H, Muzikansky A, Green JE & Donahoe PK et al. (2005). Mullerian inhibiting substance suppresses tumor growth in the C3(1)T antigen transgenic mouse mammary carcinoma model. *Proc Natl Acad Sci* 102:3219–3224. [PubMed: 15728372]

148. Gustafson ML, Lee MM & Scully RE et al. (1992). "Müllerian inhibiting substance as a marker for ovarian sex cord tumor," *The New England Journal of Medicine*, 326:1820–1826
149. Gu Z, Reynolds EM, Song J, Lei H, Feijen A & Yu L, et al. (1999). The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126:2551-61.
150. Guzman L, Ortega-Hrepich C, Polyzos NP, Anckaert E, Verheyen G & Coucke W, et al. (2013). A prediction model to select PCOS patients suitable for IVM treatment based on anti- Müllerian hormone and antral follicle count. *Hum Reprod* 28(5):1261–6.
151. Hagen CP, Aksglaede L, Sorensen K, Main KM, Boas M, Cleemann L, Holm K, Gravholt CH, Andersson AM & Pedersen AT et al. (2010). Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 95:5003–5010
152. Hagen CP, Sorensen K, Anderson RA & Juul A. (2012a). Serum levels of antimüllerian hormone in early maturing girls before, during, and after suppression with GnRH agonist. *Fertil Steril* 98:1326–1330.
153. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebaek NE, Andersson AM, Main KM, Hjollund NH, Ernst E, Bonde JP & Anderson RA et al. (2012b). Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 98:1602–1608.
154. Hamy A-S et al. (2014). Ovarian reserve in breast cancer: assessment with anti-Müllerian hormone, *Reproductive BioMedicine* doi: [10.1016/j.rbmo.2014.07.008](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.008)
155. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T & Kahn JA. (2010). Single nucleotide polymorphisms in the anti-Müllerian hormone signalling pathway do not determine high or low response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 21(5):616–23.
156. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N & Craig LB. (2011). Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril* 95:170–175

157. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR & Klein NA. (2008). A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* 23:699–708.
158. Harlow SD, Gass M & Hall JE et al. (2012). Executive summary of the stages of reproductive aging workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 97:1159–1168. [PubMed: 22344196]
159. Ha TU, Segev DL, Barbie D, Masiakos PT, Tran TT & Dombkowski D, et al. (2000). Mullerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism. *J Biol Chem* 275:37101-9.
160. Hazel B. Nichols HB, Donna D. Baird DD, Frank Z. Stanczyk FZ, Anne Z. Steiner AZ, Melissa A. Troester MA, Kristina W. Whitworth KW & and Dale P. Sandler DP. (2015). Anti-Müllerian Hormone Concentrations in Premenopausal Women and Breast Cancer Risk Department *Cancer Prev Res (Phila)*. 8(6): 528–534.
161. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM & Cohen-Bacrie P. (2004). Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 82:1323-9.
162. Hehenkamp WJ, LoomanCW, Themmen AP, de Jong FH & te Velde ER, Broekmans FJ. (2006). Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4057–4063.
163. Heidar Z, Bakhtiyari M, Mirzamoradi M, Zadehmodarres S, Sarfjoo FS & Mansournia MA. (2015). Prediction of different ovarian responses using anti-Móllerian hormone following a long agonist treatment protocol for IVF. *J Endocrinol Investig* 38(9):1007–1015
164. Hendriks AE, Laven JS, Valkenburg O, Fong SL, Fauser BC, de Ridder MA, de Jong FH, Visser JA, van GinnekenAM & BootAMet al. (2011). Fertility and ovarian function in high-dose estrogen-treated tall women. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1098–1105

165. Hendriks AE, Drop SL, Laven JS & Boot AM. (2012). Fertility of tall girls treated with high-dose estrogen, a dose-response relationship. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3107–3114
166. Henry NL, Xia R, Schott AF, McConnell D, Banerjee M & Hayes DF. (2013). Prediction of Post- Chemotherapy Ovarian Function Using Markers of Ovarian Reserve. *Oncologist*.
167. He WW, Gustafson ML, Hirobe S & Donahoe PK. (1993). Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor-beta type II receptor family. *Dev Dyn* 196:133-42.
168. Hirobe S, He WW, Gustafson ML, MacLaughlin DT & Donahoe PK. (1994) Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. *Biological Reproduction*, 50, 1238–1243.
169. Hirokawa W, Iwase A, Goto M, Takikawa S, Nagatomo Y & Nakahara T *et al.* (2011). The post-operative decline in serum anti mullerian hormone correlates with bilaterality and severity of endometriosis. *Hum Reprod* 26:904-10.
170. Hoshiya Y, Gupta V, Segev DL, Hoshiya M, Carey JL & Sasur LM, *et al.* (2003a). Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 211:43-9.
171. Hoshiya Y, Gupta V, Kawakubo H, Brachtel E, Carey JL & Sasur L *et al.* (2003b). Mullerian inhibiting substance promotes interferon gamma-induced gene expression and apoptosis in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 278:51703–51712. [PubMed: 14532292]
172. Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB & MacLaughlin DT.(1990). An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab* 70:16–22.
173. Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA). (2010). Fertility treatment in 2010: trends and figures. HFEA 2010, London. www.hfea.gov.uk/104.html

174. Hutson J, Ikawa H & Donahoe PK. (1981) The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. *J Pediatr Surg* 16:822–827.
175. Hwu YM, Wu FS, Li SH, Sun FJ, Lin MH & Lee RK. (2011). The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on serum anti-mullerian hormone levels. *Reprod Biol Endocrinol* 9:80.
176. Iizuka M, Igarashi M, Abe Y, Ibuki Y, Koyasu Y, Ikuma K. (1998). Chemical assay of iron in ovarian cysts: a new diagnostic method to evaluate endometriotic systems. *Gynecol Obstet Invest* 46:58-60
177. Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA & Nelson SM. (2013) Can anti-mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *J Clin Endocrinol Metab* 98:3332–3340
178. Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA & Nelson SM. (2014). The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Hum Reprod Update* 20:560–570
179. Imbeaud, S., Faure, E., Lamarre, I., Mattei, M.G., di Clemente, N., Tizard, R., Carré-Eusèbe, D., Belville, C., Tragethon, L., Tonkin, C., Nelson, J., McAuliffe, M., Bidart, J.M., Lababidi, A., Josso, N., Cate, R.L. & Picard, J.Y. (1995) Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nature Genetics*, 11, 382–388.
180. Imbeaud, S., Carre-Eusebe, D., Rey, R., Belville, C., Josso, N. & Picard, J.Y. (1994) Molecular genetics of the persistent müllerian duct syndrome: a study of 19 families. *Human Molecular Genetics*, 3, 125–131.
181. Ingraham, H.A., Hirokawa, Y., Roberts, L.M., Mellon, S.H., McGee, E., Nachtigal, M.W. & Visser, J.A. (2000) Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 55, 53–67.
182. Irez T, Ocal P, Guralp O, Cetin M, Aydogan B & Sahmay S. (2011). Different serum anti-Müllerian hormone concentrations are associated

- with oocyte quality, embryo development parameters and IVF-ICSI outcomes. *Arch Gynecol Obstet* 284: 1295-301
183. Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H & Kobayashi H. (2015). Oxidative stress and antioxidant defence in endometriosis and its malignant transformation. *Oxid Med Cell Longev* 2015:848595
 184. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC & Behringer RR. (2002) Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nature Genetics*, **32**, 408–410.
 185. Jackson SP & Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078.
 186. Jacobsen BK, Knutsen SF & Fraser GE. (1999). Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study. *J Clin Epidemiol* 52:303–307.
 187. Jacobsen BK, Heuch I & Kvale G. (2004). Age at natural menopause and stroke mortality: cohort study with 3561 stroke deaths during 37-year follow-up. *Stroke* 35:1548–1551.
 188. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC & Behringer RR. (2002). Requirement of Bmpr1a for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 32:408-10.
 189. Janse F, Donnez J, Anckaert E, de Jong FH, Fauser BC & Dolmans MM. (2011) Limited value of ovarian function markers following orthotopic transplantation of ovarian tissue after gonadotoxic treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1136–1144.
 190. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Clewes J, Johnson I & Raine-Fenning N. (2008). Establishing the intercycle variability of three-dimensional ultrasonographic predictors of ovarian reserve. *Fertil Steril* 90:2126-32.
 191. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I & Raine-Fenning N. (2010). A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 93(3):855–64.
 192. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E & Thun MJ. (2003). Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53:5-26.

193. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG & Jayaprakasan K et al. (2013). Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Mol Hum Reprod*. 19(8):519–27.
194. Ji J, Liu Y, Tong XH, Luo L, Ma J & Chen Z. (2013) The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China. *Hum Reprod* 28:2728–2734.
195. Jonard S & Dewailly D. (2004). The follicular excess in polycystic ovaries due to intraovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprzod Update*. 10:107–17.
196. Josso N & Clemente Nd. (2004). Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF beta family. *Trends Endocrinol Metab* 14:91-7.
197. Josso N, di Clemente N & Gouedard L. (2001) Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179, 25–32.
198. Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL & Brauner R. (1990) An enzyme linked immunoassay for anti-mullerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab* 70:23–27.
199. Josso N, Belville C, di CN & Picard JY. (2005) AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome. *Hum Reprod Update* 11:351–356.
200. Josso N, Forest MG & Picard JY. (1975). Mullerian-inhibiting activity of calf fetal testes: relationship to testosterone and protein synthesis. *Biol Reprod* 13:163-7.
201. Kallio S, Aittomaki K, Piltonen T, Veijola R, Liakka A, Vaskivuo TE, Dunkel L & Tapanainen JS. (2012) Anti-Mullerian hormone as a predictor of follicular reserve in ovarian insufficiency: special emphasis on FSH-resistant ovaries. *Hum Reprod* 27:854–860.
202. Kavoussi SK, Odenwald KC, Boehnlein LM, Summers-Colquitt RB, Pool TB & Swain JE, et al. (2015). Antimullerian hormone as a predictor of good-quality supernumerary blastocyst cryopreservation among women with levels <1 ng/mL versus 1-4 ng/mL. *Fertil Steril* 104:633-6.

203. Kaya C, Pabuccu R & Satiroglu H. (2010). Serum antimullerian hormone concentrations on day 3 of the in vitro fertilization stimulation cycle are predictive of the fertilization, implantation, and pregnancy in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*. 94:2202–7.
204. Kedem A, Haas J, Geva LL, Yerushalmi G, Gilboa Y, Kanety H, Hanochi M, Maman E & Hourvitz A. (2013). Ongoing pregnancy rates in women with low and extremely low AMH levels. A multivariate analysis of 769 cycles. *PLoS ONE* 8(12):e81629
205. Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, Nelson SM & Wallace WH. (2012). Data-driven assessment of the human ovarian reserve. *Mol Hum Reprod* 18:79–87.
206. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA & Wallace WH. (2011) A validated model of serum anti-mullerian hormone from conception to menopause. *PLoS One* 6:e22024.
207. Kevenaar ME, Laven JS, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong F, Themmen APN & Visser JA. (2008). A functional anti-mullerian hormone gene polymorphism is associated with follicle number and androgen levels in polycystic ovary syndrome patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1310–1316
208. Kevenaar ME, Themmen APN, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, de Jong FH, Pols HA, Simoni M & Visser JA. (2007). Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum. Reprod.* 22, 1547–1554.
209. Kevenaar ME, Themmen AP, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Laven JS, van Schoor NM, Lips P, Pols HA & Visser JA. (2007) A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod* 22:2382–2388.
210. Kim JH, Lee JR, Chang HJ, Jee BC, Suh CS & Kim SH. (2014). Anti-Müllerian Hormone Levels in the Follicular Fluid of the Preovulatory Follicle: A Predictor for Oocyte Fertilization and Quality of Embryo Korean *Med Sci* 29: 1266-1270

211. Kim JH, MacLaughlin DT & Donahoe PD. (2014). Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors *Obstet Gynecol Sci* 57(5):343-357
212. Kim JH, Seibel MM, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Ransil BJ, Hametz PA & Richards CJ (1992) The inhibitory effects of Müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 75, 911–917.
213. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD & te Velde ER. (2005) Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 20:611–615.
214. Knauff EA, Eijkemans MJ, Lambalk CB, Ten Kate-Booij MJ, Hoek A, Beerendonk CC, Laven JS, Goverde AJ, Broekmans FJ & Themmen AP et al. (2009) Anti-Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 94:786–792.
215. Krawczuk-Rybak M, Leszczynska E, Poznanska M, Zelazowska-Rutkowska B & Wysocka J. (2013) Anti-müllerian hormone as a sensitive marker of ovarian function in young cancer survivors. *Int J Endocrinol* 2013:125080.
216. Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Andersen CY, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP, Vested A & Toft G. (2012) The association between circulating levels of Antimüllerian hormone and follicle number, androgens, and menstrual cycle characteristics in young women. *Fertil Steril* 97:779–785.
217. Kumar A, Kalra B, Patel A, McDavid L & Roudebush WE. (2010) Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA. *J Immunol Methods* 362:51–59.
218. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB & Schoemaker J. (2004). Intercycle variability of ovarian reserve tests: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 19:590-5.
219. La Marca A & Sunkara SK. (2014) Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 20:124–140.

220. La Marca A, Volpe A. (2006). Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology* 64, 603–610
221. La Marca A & Volpe A. (2007) The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod Update* 13:265–273.
222. La Marca A, Marzotti S, Brozzetti A, Stabile G, Artenisio AC, Bini V, Giordano R, DeBA, Volpe A & Falorni A. (2009) Primary ovarian insufficiency due to steroidogenic cell autoimmunity is associated with a preserved pool of functioning follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3816–3823
223. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D & D'Amico R et al. (2011) Anti-Mullerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 4:341–349.
224. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, Argento C, Giulini S & Volpe A. (2012) Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG* 119:1171–1179.
225. La Marca A, Sighinolfi G, Giulini S, Traglia M, Argento C, Sala C, Masciullo C, Volpe A & Toniolo D. (2010). Normal serum concentrations of anti-Mullerian hormone in women with regular menstrual cycles. *Reprod Biomed Online* 21:463–469.
226. La Marca A, Sighinolfi G, Papaleo E, Cagnacci A, Volpe A & Faddy MJ. (2013) Prediction of age at menopause from assessment of ovarian reserve may be improved by using body mass index and smoking status. *PLoS One* 8:e57005.
227. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G. & Volpe A. (2010). Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 16(2):113–130
228. Lane AH, Lee MM, Fuller AF Jr, Kehas DJ, Donahoe PK & MacLaughlin DT. (1999) Diagnostic utility of Mullerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol* 73:51–55.

229. Lauritsen MP, Bentzen JG & Pinborg A, et al. (2014). The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone. *Hum Reprod.* 29(4): 791–801
230. Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH & Fauser BC. (2004) Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 89:318–323.
231. Lawrenz B, Fehm T, von Wolff M, Soekler M, Huebner S, Henes J & Henes M. (2012). Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma-evaluation by using antimullerian hormone and retrieved oocytes. *Fertil Steril.*
232. Lawrenz B, Henes J, Henes M, Neunhoeffer E, Schmalzing M, Fehm T & Kitter I. (2011) Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus* 20:1193–1197.
233. Leader B, Hegde A, Baca Q, Stone K, Lannon B, Seifer DB, Broekmans F & Baker VL. (2012) High frequency of discordance between antimullerian hormone and follicle-stimulating hormone levels in serum from estradiol-confirmed days 2 to 4 of the menstrual cycle from 5,354 women in U.S. fertility centers. *Fertil Steril* 98:1037–1042.
234. Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, Jamin SP, Picard JY, Marret S & Laudénbach V et al. (2008) Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 121:3357–3365.
235. Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG & Moon SY. (2008). Follicular fluid anti-Müllerian hormone and inhibin B concentrations: comparison between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist cycles. *Fertil Steril* 89: 860-7.
236. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D & MacLaughlin DT. (1996). Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 81:571–576.

237. Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC & MacLaughlin DT. (1997) Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med* 336:1480–1486.
238. Lee MM, Seah CC, Masiakos PT, Sottas CM, Preffer FI & Donahoe PK, et al. (1999). Mullerian-inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells. *Endocrinology* 140:2819-27.
239. Lekamge DN, Barry M, Kolo M, Lane M, Gilchrist RB & Tremellen KP. (2007). Anti-Mullerian hormone as a predictor of IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 14:602–10.
240. Lekamge DN, Lane M, Gilchrist RB & Tremellen KP. (2008) Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve. *J Assist Reprod Genet* 25:515–521.
241. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V & Cunha-Filho JS. (2008). Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* 89:1064-8.
242. Li HW, Wong CY, Yeung WS, Ho PC & Ng EH. (2011) Serum anti-mullerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptives. *Contraception* 83:582–585.
243. Li HW, Yeung WS, Lau EY, Ho PC & Ng EH. (2010). Evaluating the performance of serum antimüllerian hormone concentration in predicting the live birth rate of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril* 94(6):2177–81.
244. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Roes EM, Peters WH, Hokken-Koelega AC & Fauser BC et al. (2012) Serum anti-mullerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 97:4650–4655.
245. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, Lhomme C, Picard JY, Bidart JM & Rey R. (2000) Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with

- ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 85:540–544.
246. Łukaszuk K, Kunicki M, Kulwikowska P, Liss J, Pastuszek E, Jaszczołt M, Męczekalski B & Skowronski K. (2015). The impact of the presence of antithyroid antibodies on pregnancy outcome following intracytoplasmatic sperm injection-ICSI and embryo transfer in women with normal thyreotropine levels. *J Endocrinol Investig* 38:1335–1343
 247. Łukaszuk K, Kunicki M, Liss J, Łukaszuk M & Jakiel G. (2013). Use of ovarian reserve parameters for predicting live births in women undergoing in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 168(2):173–7.
 248. Łukaszuk K, Kunicki M, Liss J, Bednarowska A & Jakiel G. (2014). Probability of live birth in women with extremely low anti-Müllerian hormone concentrations. *Reprod Biomed Online* 28(1):64–69
 249. Luisi S, Ciani V, Podfigurna-Stopa A, Lazzeri L, De PF, Meczekalski B & Petraglia F. Serum anti-Mullerian hormone, inhibin B, and total inhibin levels in women with hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa. *Gynecol Endocrinol* 28:34–38.
 250. Lutchman Singh K, Muttukrishna S & Stein RC et al. (2007). Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. *Br J Cancer.* 96:1808–1816. [PubMed: 17533402]
 251. MacLaughlin DT & Donahoe PK. (2010). Mullerian inhibiting substance/anti-mullerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers. *Future Oncol* 6(3):391–405
 252. Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF Jr & Shah PC, et al. (1999). Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin Cancer Res* 5:3488-99.
 253. Massie JA, Burney RO, Milki AA, Westphal LM & Lathi RB. (2008). Basal follicle-stimulating hormone as a predictor of fetal aneuploidy. *Fertil Steril* 90:2351-5.
 254. Matsuzaki S & Schubert B. (2010). Oxidative stress in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis. *Fertile Steril* 93:2431-2

255. McAllister JM, Legro RS & Modi BP, et al. (2015). Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 26(3): 118–124,
256. McCoy AC, Kliethermes B, Zhang K, Qin W, Sticca R & Bouton M et al. (2011). Serum Mullerian inhibiting substance levels are lower in premenopausal women with breast precancer and cancer. *BMC Res Notes.* 4:152. [PubMed: 21615907]
257. McGee EA & Hsueh AJ. (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21:200–214.
258. MacLaughlin DT & Donahoe PK. (2008). *Mullerian inhibiting substance: a potential nontoxic, naturally occurring therapeutic agent for certain human cancers*. In: Jakowlew SB, editor. Transforming growth factor-[beta] in cancer therapy. 1st ed. Totowa: Humana Press 333-54.
259. Mahran A, Abdelmeged A, El-Adawy AR, Eissa MK, Shaw RW & Amer SA. (2013). The predictive value of circulating anti-müllerian hormone in women with polycystic ovarian syndrome receiving clomiphene citrate: A prospective observational study. *J Clin Endocrinol Metab.* 98:4170–5.
260. McIlveen M, Skull JD & Ledger WL. (2007). Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod* 22:778-85.
261. Mehta BN, Chimote MN, Chimote NN, Nath NM & Chimote NM. (2013). Follicular-fluid anti-Mullerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Hum Reprod Sci* 6: 99-105.
262. Meirelles K, Benedict LA & Dombkowski D et al. (2012). Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(7):2358–2363
263. Merhi ZO, Seifer DB, Weedon J, Adeyemi O, Holman S, Anastos K, Golub ET, Young M, Karim R & Greenblatt R et al. (2012) Circulating vitamin D correlates with serum antimullerian hormone levels in late-reproductive-aged women: Women’s Interagency HIV Study. *Fertil Steril* 98:228–234.

264. Michaelson-Cohen R, Mor P, Srebnik N, Beller U, Levy-Lahad E & Eldar-Geva T. (2014). BRCA mutation carriers do not have compromised ovarian reserve. *Int J Gynecol Cancer* 24:233–237.
265. Mitwally MF & Casper RF. (2001). Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril*. 75:305–9.
266. Moro F, et al. (2015). Anti-Müllerian hormone concentrations and antral follicle counts for the prediction of pregnancy outcomes after intrauterine insemination *Int J Gynecol Obstet*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.08.021>
267. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A & Swerdlow AJ. (2011). Familial concordance for age at natural menopause: results from the Breakthrough Generations Study. *Menopause* 18:956–961.
268. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, McFadden E, Ashworth A & Swerdlow AJ. (2012). Body mass index, exercise, and other lifestyle factors in relation to age at natural menopause: analyses from the breakthrough generations study. *Am J Epidemiol* 175:998–1005.
269. Mostaejeran F, Hamoush Z & Rouholamin S. (2015). Evaluation of antimüllerian hormone levels before and after laparoscopic management of endometriosis. *Adv Biomed Res* 4:182.
270. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen AP & Fauser BC. (2004) Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Hum Reprod* 19:2036–2042.
271. Münsterberg A & Lovell-Badge R. (1991). Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-24.
272. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H & Sathanandan M. (2004). Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 111:1248-53.
273. Nakhuda GS, Chu MC, Wang JG, Sauer MV & Lobo RA. (2006). Elevated serum müllerian-inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 85:1541–3.

274. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr & Sledge GW Jr. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 17:3629-39.
275. Nam SW, Jo YS, Eun JW, Song JY, Ryu KS & Lee JY, et al. (2009). Identification of large-scale characteristic genes of Mullerian inhibiting substance in human ovarian cancer cells. *Int J Mol Med* 23:589-96.
276. Namkung J, Song JY, Jo HH, Kim MR, Lew YO & Donahoe PK, et al. (2012). Mullerian inhibiting substance induces apoptosis of human endometrial stromal cells in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3224-30.
277. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N, Tezuka N, Hiroi M & Watanabe H. (1997). Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 67: 302-8.
278. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T & Hiroi M. (1997). The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 68: 312-7.
279. Nelson SM & La Marca A. (2011) The journey from the old to the newAMHassay: how to avoid getting lost in the values. *Reprod Biomed Online* 23:411–420.
280. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P & Fleming R. (2009) Anti-Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod* 24:867–875.
281. Nelson SM & Lawlor DA. (2011). Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilization: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Med.* 8(1):e10000386.
282. Nelson SM, Messow MC, McConnachie A, Wallace H, Kelsey T, Fleming R, Anderson RA & Leader B. (2011a) External validation of nomogram for the decline in serum anti-Mullerian hormone in women: a population study of 15,834 infertility patients. *Reprod Biomed Online* 23:204–206.

283. Nelson SM, Messow MC, Wallace AM, Fleming R & McConnachie A. (2011b) Nomogram for the decline in serum antimüllerian hormone: a population study of 9,601 infertility patients. *Fertil Steril* 95:736–741.
284. Nielsen ME, Rasmussen IA, Fukuda M, Westergaard LG & Andersen CY. (2010). Concentrations of anti-Müllerian hormone in fluid from small human antral follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 16(9):637–43.
285. Nielsen SN, Andersen AN, Schmidt KT, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Bentzen JG & Larsen EC. (2013) A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer. *Reprod Biomed Online* 27:192–200.
286. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS & Hickey TE. (2007). Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 370:685–97.
287. Oktay K, Kim JY, Barad D & Babayev SN. (2010). Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 28:240–244.
288. Oktay K, Moy F, Titus S, Stobezki R, Turan V, Dickler M & Goswami S. (2014). Age-related decline in DNA repair function explains diminished ovarian reserve, earlier menopause, and possible oocyte vulnerability to chemotherapy in women with BRCA mutations. *J Clin Oncol* 32:1093–1094.
289. Olivennes F, Howles CM, Borini A, Germond M, Trew G, Wikland M, Zegers-Hochschild F, Saunders H & Alam V. (2009) Individualizing FSH dose for assisted reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study. *Reprod Biomed Online* 18:195–204.
290. Olszanecka-Glinianowicz M, Madej P & Owczarek A, et al. (2015). Circulating anti-Müllerian hormone levels in relation to nutritional status and selected adipokines levels in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 83(1): 98–104
291. Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, Wijdeveld ME, van DJ, van Dulmen-den BE & Lambalk CB. (2012) Intra-cycle fluctuations of

- anti-Mullerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reprod Biomed Online* 24:664–669.
292. Park AS, Lawson MA & Chuan SS, et al. (2010). Serum anti-mullerian hormone concentrations are elevated in oligomenorrheic girls without evidence of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(4): 1786–1792
 293. Park Y, Lee J-H, Hong DJ, Lee EY & Kim H-S. (2011). “Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases,” *Clinical Biochemistry* 44(10-11): 884–888
 294. Parry RL, Chin TW, Epstein J, Hudson PL, Powell DM & Donahoe PK. (1992). Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits human ocular melanoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res* 52:1182-6.
 295. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK et al. (2004). Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 81:973-6
 296. Pavone ME, Mittal N, Smith K & Giordano SB. (2014). Amh values in reproductive aged women with and without the brca1 mutation. *Fertil Steril* 102:e156.
 297. Peluso C, Fonseca FL, Gastaldo GG, Christofolini DM, Cordts EB, Barbosa CP & Bianco B. (2015). AMH and AMHR2 polymorphisms and AMH serum level can predict assisted reproduction outcomes: A cross-sectional study. *Cell. Physiol. Biochem.* 35, 1401–1412
 298. Pellatt L, Hanna L & Brincat M, et al. (2007). Granulosa cell production of anti- Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(1): 240–245
 299. Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G & Casamitjana R, et al. (2005). Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian 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* 20:915-22.

300. Petrek JA, Naughton MJ & Case LD et al. (2006). Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *J Clin Oncol*. 24:1045–1051. [PubMed: 16476708] Phillips K-A, Collins IA, Milne RL, McLachlan SAM, Friedlander MF, Hickey M,
301. Pieretti-Vanmarcke R, Donahoe PK, Szotek P, Manganaro T, Lorenzen MK & Lorenzen J, et al. (2006). Recombinant human Mullerian inhibiting substance inhibits long-term growth of MIS type II receptor-directed transgenic mouse ovarian cancers in vivo. *Clin Cancer Res* 12:1593-8.
302. Pieretti-Vanmarcke R, Donahoe PK, Szotek P, Manganaro T, Lorenzen MK, & Lorenzen J, et al. (2006). Recombinant human Mullerian inhibiting substance inhibits long-term growth of MIS type II receptor-directed transgenic mouse ovarian cancers in vivo. *Clin Cancer Res* 12:1593-8.
303. Pierre A, Peigné M & Grynberg M, et al. (2013). Loss of LH-induced down-regulation of anti-Müllerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 28(3): 762–769
304. Pigny P, Jonard S, Robert Y & Dewailly D. (2006). Serum anti-Mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:941–5.
305. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C & Jonard S, et al. (2003). Elevated serum level of anti-Mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 88:5957–62.
306. Piouka A, Farmakiotis D & Katsikis I, et al. (2009). Anti-Mullerian hormone levels reflect severity of PCOS but are negatively influenced by obesity: relationship with increased luteinizing hormone levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296(2): E238–E243
307. Rey R, Sabourin JC & Venara M et al. (2000). “Anti-Müllerian hormone is specific marker of sertoli -and granulose-cell origin in gonadal tumors,” *Human Pathology* 31:1202–1203
308. Roberts JE, Spandorfer S, Fasouliotis SJ, Kashyap S & Rosenwaks Z. (2005). Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril* 83:37-41.

309. 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(1): 41–47
310. Salmon NA, Handyside AH & Joyce IM. (2004). Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol* 266: 201-8.
311. Piltonen T, Morin-Papunen L, Koivunen R, Perheentupa A, Ruukonen A & Tapanainen JS. (2005) Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 20:1820–1826.
312. Piouka A, Farmakiotis D, Katsikis I, Macut D, Gerou S & Panidis D. (2009a) Anti-Müllerian hormone levels reflect severity of PCOS but are negatively influenced by obesity: relationship with increased luteinizing hormone levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E238–E243.
313. Piouka A, Farmakiotis D, Katsikis I, Macut D, Gerou S & Panidis D. (2009b) Anti-Müllerian hormone levels reflect severity of PCOS but are negatively influenced by obesity: relationship with increased luteinizing hormone levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E238–E243.
314. Popovic-Todorovic B, Loft A, Bredkjaer HE, Bangsboll S, Nielsen IK & Andersen AN. (2003) A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a 'standard' dose of 150 IU/day in 'standard' patients undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 18:2275–2282.
315. Practice Committee ASRM. (2012) Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 98:1407–1415.
316. Purushothaman R, Lazareva O, Oktay K & Ten S. (2010) Markers of ovarian reserve in young girls with Turner's syndrome. *Fertil Steril* 94:1557–1559.
317. Raffi F, Metwally M & Amer S. (2012) The impact of excision of ovarian endometrioma on ovarian reserve: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3146–3154.

318. Reichman DE, Goldschlag D & Rosenwaks Z. (2014). Value of antimullerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 10:1012–1018
319. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL & Skakkebaek NE. (1999) Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3836–3844.
320. Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR & Donahoe PK. (2005). Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:111-6.
321. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C & Bedecarras P. (2003) AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 15, 21–31.
322. Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, Zeller WP, Duvillard P, Chemes H & Bidart JM. (2000) Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Human Pathology*, 31, 1202–1208.
323. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, Nardo LG & Pemberton PW. (2012) Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum Reprod* 27:3085–3091.
324. Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S & Antonio La Marca A. (2016). The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH *Assist Reprod Genet* 33:95–100
325. Sahmay S, Atakul N & Oncul M, et al. (2013). Serum anti-Mullerian hormone levels in the main phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 170(1): 157–161
326. Sahmay S, Aydin Y & Oncul M, et al. (2014). Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome: AMH in combination with clinical symptoms. *J Assist Reprod Genet.* 31(2): 213–220

327. Salmon NA, Handyside AH & Joyce IM. (2004) Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology*, 266, 201–208.
328. Salhi I, Cambon-Roques S, Lamarre I, Laune D, Molina F, Pugniere M, Pourquier D, Gutowski M, Picard JY & Xavier F et al. (2004) The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Biochem J* 379:785–793.
329. Salom E, Almeida Z & Mirhashemi R. (2002). Management of recurrent ovarian cancer: evidence-based decisions. *Curr Opin Oncol* 14:519-27.
330. Sanchez AM, Vigano P, Somigliana E, Panina-Bordignon P, Vercellini P & Candiani M. (2014). The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. *Hum Reprod Update* 20:217-30
331. Schipper I, Visser JA, Themmen AP & Laven JS. (2012) Limitations and pitfalls of Antimullerian hormone measurements. *Fertil Steril* 98:823–824.
332. Schock H, Lundin E, Vaˆaˆraˆsmaˆki M, Grankvist K, Fry A, Dorgan JF, Pukkala E, Lehtinen M, Surcel HN & Lukanova A. (2014). Anti-Mullerian hormone and risk of invasive serous ovarian cancer *Cancer Causes Control* 25:583–589
333. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI & Reijo Pera RA. (2012) Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women. *Hum Reprod* 27:594–608.
334. Scott RT Jr, Elkind-Hirsch KE, Styne-Gross A, Miller KA & Frattarelli JL. (2008). The predictive value for in vitro fertility delivery rates is greatly impacted by the method used to select the threshold between normal and elevated basal follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 89:868-78.
335. Scott RT Jr, Hofmann GE, Oehninger S & Muasher SJ. (1990). Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54:297-302.

336. Scully RE. (1970). Recent progress in ovarian cancer. *Hum Pathol* 1970;1:73-98.
337. Scully RE. (1977). Ovarian tumors. A review. *Am J Pathol* 87(3):686–720
338. Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P & Jung M et al. (2000). Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem*. 275:28371–28379. [PubMed: 10874041]
339. Segev DL, Hoshiya Y, Stephen AE, Hoshiya M, Tran TT & MacLaughlin DT et al. (2001). Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells in vivo. *J Biol Chem*. 276:26799–26806. [PubMed: 11356848]
340. Segev DL, Hoshiya Y, Hoshiya M, Tran TT, Carey JL & Stephen AE, et al. (2002). Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:239-44.
341. Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts DH, Cohen MH, Karim R, Young MA & Minkoff H et al. (2009) Variations in serum Mullerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women. *Fertil Steril* 92:1674–1678.
342. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, Behrman HR, Asmundson L, Donahoe PK, Haning RVJ & Flynn SD. (1993) Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76, 711–714.
343. Seifer DB, Baker VL & Leader B. (2011) Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril* 95:747–750.
344. Seifer DB, Tal O, Wantman E, Edul P & Baker VL. (2015). Prognostic indicators of assisted reproduction technology outcomes of cycles with ultralow serum antimóllerian hormone: a multivariate analysis of over 5000 autologous cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System database for 2012–2013. *Fertil Steril* S0015–0282(15):02011–02017

345. Shaw CM, Stanczyk FZ, Egleston BL, Kahle LL, Spittle CS, Godwin AK, Brinton LA & Dorgan JF. (2011) Serum antimullerian hormone in healthy premenopausal women. *Fertil Steril* 95:2718–2721.
346. Shebl O, Ebner T, Summergruber M, Sir A & Tews G. (2009). Anti-Mullerian Hormone serum levels in women with endometriosis: A case-control study. *Gynecol Endocrinol* 25:713-6.
347. Siegel R, Naishadham D & Jemal A. (2012). “Cancer statistics, 2012,” *CA Cancer Journal for Clinicians*, 62(1):10–29
348. Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL & Blazar AS. (2006). Mullerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 21: 159-63.
349. Sir-Petermann T, Marquez L, Carcamo M, Hitschfeld C, Codner E, Maliqueo M, Echiburu B, Aranda P, Crisosto N & Cassorla F. (2010) Effects of birth weight on anti-mullerian hormone serum concentrations in infant girls. *J Clin Endocrinol Metab* 95:903–910.
350. Skalba P, Cygal A & Madej P, et al. (2011). Is the plasma anti-Müllerian hormone (AMH) level associated with body weight and metabolic, and hormonal disturbances in women with and without polycystic ovary syndrome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 158(2): 254–259
351. Smeenk JM, Sweep FC, Zielhuis GA, Kremer JA, Thomas CM & Braat DD. (2007). Antimullerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 87:223-6.
352. Smith AD, Tilling K, Lawlor DA & Nelson SM. (2015). External validation and calibration of IVF predict: a national prospective cohort study of 130,960 in vitro fertilization cycles. *PLoS ONE*. 10(4):e0121357.
353. Soares SR, Gómez R, Simón C, García-Velasco JA & Pellicer A. (2008). Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update* 14(4):321–33.

354. Somunkiran A, Yavuz T, Yucel O & Ozdemir I. (2007) Anti-Mullerian hormone levels during hormonal contraception in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 134:196–201.
355. Song JY, Chen KY, Kim SY, Kim MR, Ryu KS & Cha JH, et al. (2009). The expression of Mullerian inhibiting substance/anti- Mullerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia. *Int J Oncol* 34:1583-91.
356. Song JY, Jo HH, Kim MR, Lew YO, Ryu KS & Cha JH, et al. (2012). Expression of Mullerian inhibiting substance type II receptor and antiproliferative effects of MIS on human cervical cancer. *Int J Oncol* 40:2013-21.
357. Soto N, Iniguez G, Lopez P, Larenas G, Mujica V, Rey RA & Codner E. (2009) Anti-Mullerian hormone and inhibin B levels as markers of premature ovarian aging and transition to menopause in type 1 diabetes mellitus. *Hum Reprod* 24:2838–2844.
358. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE & Traish AM, et al. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 100:2952-60.
359. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S & Edelman A. (2010) Antimullerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. *Contraception* 81:245–248.
360. Steiner AZ, Herring AH, Kesner JS, Meadows JW, Stanczyk FZ, Hoberman S & Baird DD. (2011) Antimullerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30–42 years. *Obstet Gynecol* 117:798–804.
361. Stephen AE, Pearsall LA, Christian BP, Donahoe PK, Vacanti JP & MacLaughlin DT. (2002). Highly purified mullerian inhibiting substance inhibits human ovarian cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 8:2640-6.
362. Stern C, Hopper JL, Fisher R, Kannemeyer G, Picken S, Smith CD, Kelsey TW & Anderson RA. (2016). Anti-Mullerian hormone serum concentrations of women with germline BRCA1 or BRCA2 mutations *Human Reproduction*, 31(5):1126–1132, 2016

363. Streuli I, de Ziegler D, Gayet et al. (2012). In women with endometriosis anti-Mullerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery. *Hum Reprod*. 27:3294-303
364. Stoop D, Nekkebroeck J & Devroey P. (2011). A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age. *Hum Reprod* 26:655–661.
365. Streuli I, Fraise T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P & de Ziegler D. (2008) Serum Antimullerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril* 90:395–400.
366. Su HI, Haunschild C, Chung K, Komrokian S, Boles S, Sammel MD & DeMichele A. (2014). Pre-chemotherapy anti-mullerian hormone, age and body size predict timing of return of ovarian function in young breast cancer patients *Cancer*. 120(23): 3691–3698.
367. Su HI, Flatt SW, Natarajan L, DeMichele A & Steiner AZ. (2013). Impact of breast cancer on anti-Mullerian hormone levels in young women. *Breast Cancer Res Treat*. 137(2): 571–577
368. Su HI, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, DeBlasis T & Gracia CR. (2008) Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women. *Menopause* 15:857–861.
369. Su HI, Maas K, Sluss P, Chang RJ, Hall JE & Joffe H. (2013) The impact of depot GnRH agonist on AMH levels in healthy reproductive-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1961–6.
370. Sunderam S, Kissin DM, Crawford SB, Folger SG, Jamieson DJ, Warner L &
371. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J & Coomarasamy A. (2011) Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 26:1768–1774.
372. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H & Isaka K. (2008). Anti- Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 89:586-91.

373. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H & Isaka K. (2008). Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 89: 586-91.
374. Tal R, Seifer DB & Khanimov M, et al. (2014). Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. *Am J Obstet Gynecol*. 211(1): 59.e1–59.e8,
375. Tal R, Tal O, Seifer BJ & Seifer DB. (2015). Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 103: 119-30.e3.
376. Tamura H, Takasaki A & Miwal I et al. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improve fertilization rate. *J Pineal Res* 44:280-7
377. Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Hedayati M & Azizi F. (2010) Is polycystic ovary syndrome an exception for reproductive aging? *Hum Reprod* 25:1775–1781.
378. Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Gohari MR & Azizi F. (2013). Modeling age at menopause using serum concentration of anti-müllerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 98:729–735.
379. Tehrani FR, Shakeri N, Solaymani-Dodaran M & Azizi F. (2011) Predicting age at menopause from serum antimüllerian hormone concentration. *Menopause* 18:766–770.
380. Teixeira J, Maheswaran S & Donahoe PK. (2001) Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 22:657–674
381. te Velde ER, Nieboer D, Lintsen AM, Braat DD, Eijkemans MJ, Habbema JD & Vergouwe Y. (2014). Comparison of two models predicting IVF success; the effect of time trends on model performance. *Hum Reprod*. 29(1):57–64.
382. te Velde ER & Pearson PL. (2002) The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 8:141–154.

383. Thomson RL, Buckley JD, Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ & Brinkworth GD. (2009) The effect of weight loss on anti-Mullerian hormone levels in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome and reproductive impairment. *Hum Reprod* 24:1976–1981.
384. Thum MY, Abdalla HI & Taylor D. (2008). Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 90: 315-21.
385. Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, Dickler M, Robson M, Moy F & Goswami S et al. (2013) Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med* 5:172ra21.
386. Torgerson DJ, Thomas RE & Reid DM. (1997). Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 74:63–66.
387. Tran ND, Cedars MI & Rosen MP. (2011) The role of anti-mullerian hormone (AMH) in assessing ovarian reserve. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3609–3614.
388. Trbovich AM, Sluss PM, Laurich VM, O'Neill FH, MacLaughlin DT & Donahoe PK, et al. (2001). Mullerian Inhibiting Substance lowers testosterone in luteinizing hormone-stimulated rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3393-7.
389. Treloar AE, Boynton RE, Behn BG & Brown BW. (1967). Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil* 12:77–126.
390. Tremellen K & Kolo M. (2010). Serum anti-Mullerian hormone is a useful measure of quantitative ovarian reserve but does not predict the chances of live-birth pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 50(6):568–72.
391. Ueno S, Kuroda T, MacLaughlin DT, Ragin RC, Manganaro TF & Donahoe PK. (1989) Müllerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology*, 125, 1060–1066.

392. Ueno S, Manganaro TF & Donahoe PK. (1988) Human recombinant Müllerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor in vitro. *Endocrinology*, 123, 1652–1659.
393. Ueno, S., Kuroda T., MacLaughlin, D.T., Ragin, R.C., Manganaro, T.F. & Donahoe, P.K. (1989) Müllerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology*, 125, 1060–1066.
394. Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA & Veldhuis JD. (1991). Follicle stimulating hormone increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 128(4):2000–7.
395. van Asselt KM, Kok HS, Pearson PL, Dubas JS, Peeters PH, te Velde ER & van Noord PA. (2004). Heritability of menopausal age in mothers and daughters. *Fertil Steril* 82:1348–1351
396. van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG, van den BC, van den BH, Pieters R & de Muinck Keizer-Schrama SM. (2007) Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3869–3874.
397. van den Berg MH, van Dulmen-den BE, Overbeek A, Twisk JW, Schats R, van Leeuwen FE, Kaspers GJ & Lambalk CB. (2010) Comparison of ovarian function markers in users of hormonal contraceptives during the hormone-free interval and subsequent natural early follicular phases. *Hum Reprod* 25:1520–1527.
398. van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC & Macklon NS. (2006) Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online* 13:476–480.
399. Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC & Broekmans FJ. (2010) Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod* 25:221–227.

400. van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT & Broekmans FJ. (2008). Relationship of serum anti-Mullerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2129–2134.
401. van Elburg AA, Eijkemans MJ, Kas MJ, Themmen AP, de Jong FH, van EH & Fauser BC. (2007) Predictors of recovery of ovarian function during weight gain in anorexia nervosa. *Fertil Steril* 87:902–908.
402. van Hooff MH, AlberdaAT, Huisman GJ, Zeilmaker GH & Learentveld RA. (1993) Doubling the human menopausal gonadotrophin dose in the course of an in-vitro fertilization treatment cycle in low responders: a randomized study. *Hum Reprod* 8:369–373.
403. Van Loendersloot LL, van Wely M, Repping S, Sossuyt PM & van der Veen F. (2013). Individualized decision making in IVF: calculating the chances of pregnancy. *Hum Reprod*. 28(11):2972–80.
404. van Rooij I, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP & te Velde ER. (2005). Serum anti-Mullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 83:979–987.
405. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, Jong FH & Themmen AP. (2002) Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 17:3065–3071.
406. van Rumste MM, Custers IM, van der Veen F, vanWely M, Evers JL & Mol BW. (2008). The influence of the number of follicles on pregnancy rates in intrauterine insemination with ovarian stimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 14(6):563–70.
407. van Tilborg TC, Eijkemans MJ, Laven JS, Koks CA, de Bruin JP, Scheffer GJ, van Golde RJ, Fleischer K, Hoek A & Nap AW et al. (2012) The OPTIMIST study: optimisation of cost effectiveness through individualised FSH stimulation dosages for IVF treatment. A randomised controlled trial. *BMC Womens Health* 12:29.
408. Vegetti W, Marozzi A, Manfredini E, Testa G, Alagna F, Nicolosi A, Caliari I, Taborelli M, Tibiletti MG & Dalpra L et al. (2000). Premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 161:53–57.

409. Vercellini P, Crosignani P & Somigliana E et al. (2011). The incessant menstruation hypothesis: a mechanistic ovarian cancer model with implications from prevention. *Hum Reprod* 26:2262-73
410. Verhulst SM, Cohlen BJ, Hughes E, Te Velde E & Heineman MJ. (2006). Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 18(4), CD001838.
411. Villarroel C, Merino PM, Lopez P, Eyzaguirre FC, Van VA, Iniguez G & Codner E. (2011) Polycystic ovarian morphology in adolescents with regular menstrual cycles is associated with elevated anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod* 26:2861–2868.
412. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH & Themmen AP. (2007) Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 148:2301–2308.
413. Visser JA, Hokken-Koelega AC, Zandwijken GR, Limacher A, Ranke MB & Fluck CE. (2013) Anti-Müllerian hormone levels in girls and adolescents with Turner syndrome are related to karyotype, pubertal development and growth hormone treatment. *Hum Reprod* 28:1899–1907.
414. Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP & Ingraham HA. (2001) The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Molecular Endocrinology*, 15, 936–945.
415. Voorhuis M, Broekmans FJ, Fauser BC, Onland-Moret NC & van der Schouw YT. (2011). Genes involved in initial follicle recruitment may be associated with age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E473–E479.
416. Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, Matteson KJ & Miller WL. (1986). Hormonal regulation of P450scc (20,22-desmolase) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 63(1):202–7.
417. Walentowicz P, Sadlecki P, Krintus M, Sypniewska G, Mankowska-Cyl A, Grabiec M & Walentowicz-Sadlecka M. (2013). Serum Anti-Müllerian

418. Walentowicz-Sadlecka M, Grabiec M & Sadlecki P et al. (2012). "Sypniewska G. 25(OH)D3 in patients with ovarian cancer and its correlation with survival," *Clinical Biochemistry* 45,1568–1572
419. Wallace AM, Faye SA, Fleming R & Nelson SM. (2011) A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-Mullerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *Ann Clin Biochem* 48:370–373.
420. Walshe JM, Denduluri N & Swain SM. (2006). Amenorrhea in premenopausal women after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 24:5769–5779. [PubMed: 17130515]
421. Wang J, Dicken C, Lustbader JW & Tortoriello DV. (2009) Evidence for a Mullerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil Steril* 91:1195–1203.
422. Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, Park SJ & Thornton MH, et al. (2010). The association between anti-Mullerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reprod Biomed Online* 21:757-61.
423. Wang PY, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT & Donahoe PK, et al. (2005). Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16421-5.
424. Wang ET, Pisarska MD, Bresee C, Chen YD, Lester J, Afshar Y, Alexander C & Karlan BY. (2014). BRCA1 germline mutations may be associated with reduced ovarian reserve. *Fertil Steril* 102:1723–1728
425. Weghofer A, Dietrich W, Barad DH & Gleicher N. (2011). Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Mullerian hormone levels. *Hum Reprod* 26(7):1905–1909
426. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R & Hardy K, et al. (2003). Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*. 27:1017–21.
427. Weenen C, Laven JS & Von Bergh AR et al. (2004). Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 10:77–83. [PubMed: 14742691]

428. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC & Themmen AP. (2004) Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 10:77–83.
429. Weghofer A, Dietrich W, Barad DH & Gleicher N. (2011). Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Müllerian hormone levels. *Hum Reprod* 26(7):1905–9.
430. Welsh P, Smith K & Nelson SM. (2014) A single-centre evaluation of two new anti-Mullerian hormone assays and comparison with the current clinical standard assay. *Hum Reprod* 29:1035–1041.
431. Wilson JD, George FW & Griffin JE. (1981) The hormonal control of sexual development. *Science* 211:1278–1284.
432. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R & Birkhauser MH. (2008) Statistically significant changes of antimullerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 89:927–933.
433. Xi W, Gong F & Lu G. (2012). Correlation of serum Anti-Mullerian hormone concentrations on day 3 of the in vitro fertilization stimulation cycle with assisted reproduction outcome in polycystic ovary syndrome patients. *J Assist Reprod Genet.* 29:397–402.
434. Xi W, Yang Y, Mao H, Zhao X, Liu M & Fu S. (2016). Circulating anti-mullerian hormone as predictor of ovarian response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome *Journal of Ovarian Research* 9:3
435. Yamaguchi K., Mandai M, Toyokuni S et al. (2008). Contests of endometriotic cysts: especially the high concentration of free iron, are the possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res* 14:32-40
436. Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HY, Pemberton PW, Smith A & Nardo LG. (2011) Anti-Mullerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod* 26:2353–2362.
437. Yong EL, Hillier SG, Turner M, Baird DT, Ng SC & Bongso A et al. (1994). Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage

- (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotropins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J Mol Endocrinol.* 12(2):239–49.
438. Yu B, Douglas N & Ferin MJ et al. (2010). Changes in markers of ovarian reserve and endocrine function in young women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *Cancer.* 116:2099– 2105. [PubMed: 20187091]
439. Zeuner A, Müller K, Reguszyński K & Jewgenow K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 59: 1421-33.
440. Zhang X, Li XH, Ma X, Wang ZH, Lu S & Guo YL. (2006). Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *J Soc Gynecol Invest* 13:451-8
441. Zuvela E, Walls M & Matson P. (2013) Within-laboratory and between-laboratory variability in the measurement of anti-müllerian hormone determined within an external quality assurance scheme. *Reprod Biol* 13:255–257