

**Uniwersytet im. A. Mickiewicza
w Poznaniu**

Małgorzata Jusiakowska-Piputa

**Zmienność stężenia hormonu anty-Müllerowskiego
i hormonu folikulotropowego u kobiet w wieku rozrodczym
w zależności od prawidłowej lub zaburzonej funkcji jajników**

**Praca doktorska wykonana
w Instytucie Biologii i Ewolucji Człowieka
UAM w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Kaczmarek**

Poznań 2020

Pani Prof. dr hab. Marii Kaczmarek

*za umożliwienie realizacji pracy,
wszelką pomoc, cenne wskazówki i życzliwość
składam serdeczne podziękowania*

STRESZCZENIE

Wobec narastającego problemu związanego z zaburzeniami płodności i niepłodnością, w pracy podjęto próbę wyjaśnienia luki poznawczej dotyczącej zmienności markerów rezerwy jajnikowej z wiekiem u kobiet z zespołami przedwczesnego wygaszania jajników i policystycznych jajników w odniesieniu do kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników. Wybrane jednostki kliniczne są w różnym stopniu sprzężone z niepłodnością.

Analizowano dwa hormony kluczowe dla procesu folikulogenezy: anty-Müllerowski i folikulotropowy. Wyniki badań potwierdziły zakładaną hipotezę, że u kobiet z POF stężenie AMH było zdecydowanie niższe niż w grupie kontrolnej natomiast poziom FSH był wyższy od poziomu FSH u kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników jedynie w grupie 36-46 lat. Wśród kobiet 23-35 lat poziom FSH nie różnił się istotnie od grupy kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami ($p < 0,05$). Wykorzystanie markera AMH podnosi efektywność wykrycia POF u kobiet w wieku rozrodczym 23-35 lat podczas gdy standardowo używany w diagnostyce zaburzeń płodności marker FSH nie różnił się w porównaniu do grupy kontrolnej, a tym samym jego wartość predykcyjna dla POF nie jest wysoka.

Stężenie AMH w grupie kobiet z PCOS było zdecydowanie wyższe niż u kobiet z prawidłową funkcją jajnika natomiast standardowo wykorzystywany marker FSH nie różnił się istotnie statystycznie w porównaniu do kontroli u kobiet 23-30 oraz 36-46 lat. Oznacza to, że wartość predykcyjna AMH w diagnozie PCOS jest zdecydowanie wyższa od powszechnie stosowanego FSH.

Otrzymane wyniki badań mogą przyczynić się do wcześniejszej oceny i szybszego podjęcia stosownych działań w kierunku poprawy stanu biologicznego organizmu kobiety wobec decyzji o macierzyństwie, w szczególności jeśli wymaga ona zwiększenia szansy rozrodu u kobiet z POF i PCOS.

Słowa kluczowe: AMH, FSH, rozrodczość, płodność, PCOS, POF

SUMMARY

In view of the growing problem of fertility disorders and infertility, this study attempts to fill the cognitive gap concerning the variability of ovarian reserve markers with age in women with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS) compared to women with normal ovarian function. The selected clinical units are linked to infertility to varying degrees.

Two key hormones in folliculogenesis were analysed: Anti-Müllerian hormone (AMH) and follicle-stimulating (FSH) hormone. The results of the study confirmed the hypothesis that in women with POF, AMH levels were significantly lower than in the control group, while FSH levels were higher than those in women with normal ovarian function only in the group of women aged 36-46 years. Among women aged 23-35 years, FSH levels did not differ significantly from those in the group of women with normal ovarian function ($p < 0,05$). The use of the AMH marker improves the effectiveness of POF detection in women of childbearing age of 23-35 years, while the standard FSH marker used in the diagnosis of fertility disorders did not differ compared to the control group and thus its predictive value for POF is not high.

AMH concentration in the group of women with PCOS was significantly higher than in women with normal ovarian function, whereas the standard FSH marker did not differ statistically significantly compared to controls in women aged 23-30 and 36-46 years. This means that the predictive value of AMH in the diagnosis of PCOS is significantly higher than for the commonly used FSH.

The results obtained may contribute to an earlier assessment and taking faster measures to improve the biological status of a woman's body to support maternity decisions, especially if they require an increased reproductive chance in women with POF and PCOS.

Keywords: AMH, FSH, reproduction, fertility, PCOS, POF

Składam serdeczne podziękowania

Pani Dyrektor Kliniki Leczenia Niepłodności InviMed we Wrocławiu

Wiesławie Malinowskiej-Mielnik

oraz

Panu Dyrektorowi Kliniki Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu

Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Prof. dr hab. Leszkowi Pawelczykowi

za umożliwienie realizacji badań stanowiących podstawę niniejszej pracy doktorskiej.

*Pamięci mojego Dziadka, który nauczył mnie rozumieć Naturę,
dedykuję tę pracę*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	3
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	11
1.1. Znaczenie AMH i FSH w rozwoju rezerwy jajnikowej.....	12
1.2. Budowa i funkcja AMH i FSH.....	16
1.2.1. AMH i FSH w poszczególnych etapach ontogenezy	20
1.2.2. Rola AMH i FSH w folikulogenezie	29
1.2.3. AMH jako marker POF	32
1.2.4. AMH jako marker PCOS.....	34
1.2.5. Molekularne i genetyczne aspekty występowania POF i PCOS	36
2. CEL PRACY, ZADANIA i HIPOTEZY BADAWCZE	41
3. MATERIAŁ i METODY.....	42
3.1. Charakterystyka próby badawczej. Organizacja badań	42
3.2. Zastosowane metody badania	45
3.2.1. Kwestionariusz ankietowy.....	45
3.2.2. Analizy laboratoryjne	49
3.2.3. Metody oceny budowy somatycznej	51
3.2.4. Metody opracowania danych statystycznych	54
4. WYNIKI	56
4.1. Charakterystyka kobiet z uwzględnieniem statusu funkcjonowania jajników	56
4.1.1. Cechy demograficzne i socjoekonomiczne	56
4.1.2. Czynniki stylu życia, kondycji psychofizycznej i budowa ciała.....	58
4.1.3. Cechy okresu rozrodczości.....	60
4.2. Profile AMH i FSH u kobiet z POF i PCOS i ich uwarunkowania	63
4.2.1. Zmienność stężeń AMH i FSH z wiekiem	63

4.2.2. Zróznicowanie poziomu stężeń AMH i FSH w zależności od cech cyklu płciowego	68
4.2.3. Analiza profili AMH i FSH w zależności od cech historii rozrodczości	74
4.2.4. Profile AMH i FSH w zależności od cech somatycznych.....	78
5. DYSKUSJA WYNIKÓW.....	83
5.1. Zmienność hormonów AMH i FSH i historia rozrodczości	85
5.2. Socjoekonomiczne uwarunkowania zmienności AMH i FSH.....	96
5.3. Somatyczne uwarunkowania zmienności AMH i FSH.....	98
5.4. Wybrane czynniki stylu życia a zmienność AMH i FSH	103
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	109
7. WNIOSKI	112
PIŚMIENNICTWO	114

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AFC - *Antral follicle count* / pula pęcherzyków jajnikowych
- AMH - *Anti-Müllerian hormone* / hormon anty-Müllerowski
- AMHR-I - *Anti-Müllerian hormone receptor II* / receptor typu I dla AMH
- AMHR-II - *Anti-Müllerian hormone receptor II* / receptor typu II dla AMH
- cAMP - *Cyclic adenosine monophosphate*
- AR - receptor androgenowy
- BDI - *Beck Depression Inventory* / skala depresji Becka
- BF% - *Body Fat Index* / procentowy udział tkanki tłuszczowej w masie ciała
- BMI - *Body Mass Index* / wskaźnik masy ciała (masa ciała/ wysokość ciała²)
- E2 - estradiol
- ECLIA - elektrochemiluminescencja
- ELISA - *Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*
- EPAF - *European Policy Audit on Fertility* / Audyt polityki europejskiej dotyczący płodności
- FSH - *Follicle-stimulating hormone* / hormon folikulotropowy
- FSHR - *Follicle-stimulating hormone receptor* / receptor dla FSH
- GATS - *Global Adult Tobacco Survey*
- GC - *Granulosa cell* / komórki ziarniste
- GnRH - *Gonadotropin-releasing hormone* / gonadotropina
- HPO axis - *Hypothalamic – pituitary – ovary axis* / oś podwzgórze-przysadka-jajniki
- HPA axis - *Hypothalamic – pituitary – adrenal axis* / oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

- LH - *Luteinizing hormone* / hormon luteinizujący
- MET - *Metabolic Equivalent Task*
- PCOS - *Polycystic ovary syndrome* / zespół policystycznych jajników
- POI - *Primary ovarian insufficiency* / pierwotna niewydolność jajników
- POF - *Premature ovarian failure* / przedwczesne wygasanie jajników
- SES - *Socioeconomic status* / status społecznoekonomiczny
- SHBG - *Sex Hormone Binding Protein* / białko wiążące hormony płciowe
- SRY - *Sex-determining region of the Y chromosome* / region chromosomu Y determinujący płeć
- TGF- β - *Transforming growth factor beta* / czynnik transformujący wzrostu beta
- WHR - *Waist-hip ratio* / wskaźnik obwodu talii do obwodu bioder

1.WSTĘP

Europejskie raporty dotyczące problemu niepłodności wskazują, że Europa przechodzi kryzys związany z rosnącym odsetkiem występowania niepłodności wśród par będących w wieku reprodukcyjnym (EPAF – European Policy Audit on Fertility 2017). Polska, obok Irlandii, znalazła się w niechlubnej czołówce państw, w których problem leczenia niepłodności jest podejmowany i wspierany w stopniu niewystarczającym. Problemy dotyczące zaburzeń rozrodu oraz problem niepłodności będą wzrastały także w wymiarze socjoekonomicznym wobec niepokojącej dla europejskiej gospodarki kwestii starzenia się społeczeństwa i postępującej degradacji demograficznej. Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii popiera programy naukowe dotyczące badania przyczyn zaburzeń rozrodu oraz leczenia niepłodności.

W niniejszej pracy został podjęty ważny i aktualny temat związku czynników endokrynych, takich jak hormon anty-Müllerowski (AMH) oraz hormon folikulotropowy (FSH) z określonymi cechami u kobiet z prawidłową i zaburzoną funkcją jajników POF i PCOS. Analiza zależności pomiędzy stężeniem AMH i FSH a cechami cyklu płciowego, cechami okresu rozrodczości, cechami somatycznymi takimi jak względna masa ciała (BMI), procentowa zawartość tłuszczu (BF%), stosunek obwodu talii do obwodu bioder (WHR) czy elementami stylu życia jak aktywność fizyczna, pozwoli uzupełnić wiedzę na temat mechanizmów regulujących prawidłową funkcję układu rozrodczego na poziomie osobniczym. Wskazanie czynników mogących wpłynąć na zaburzenie funkcjonowania układu rozrodczego w powiązaniu z układem neuroendokrynym, a w szczególności tych, które mogą być modyfikowane, umożliwi stworzenie odpowiednich programów zdrowotnych wspierających rozrodczość kobiet.

Endokryna regulacja funkcjonowania jajników w cyklu płciowym jest kluczowa dla rozrodu ze względu na jej biologiczne znaczenie w procesie życia i ewolucji. AMH jest szczególnie ważny z punktu widzenia biologii reprodukcyjnej ze względu na fakt, że jest to glikoproteina wysoce gatunkowo niespecyficzna i pojawia się na wczesnym etapie ewolucji zwierząt na przykład u ryb, niektórych gadów i ssaków. AMH jest konserwatywnym wskaźnikiem gotowości układu płciowego a jego rola została utrzymana ewolucyjnie. W endokrynologii rozrodu AMH jest jednym z najbardziej stabilnych markerów rezerwy jajnikowej określającym potencjalną zdolność kobiet do rozrodu i stanowi podstawę do wczesnego diagnozowania dysfunkcji jajników jak POF i PCOS.

Prawidłowa diagnoza wymaga odniesień do wartości referencyjnych. Tymczasem w aktualnej literaturze przedmiotu brakuje danych na temat zmienności osobniczej hormonu anty-Müllerowskiego oraz hormonu folikulotropowego u kobiet w okresie rozrodczym z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami oraz z zaburzoną funkcją jajników jak wymienione jednostki kliniczne - POF i PCOS. W niniejszej pracy przedstawiono zmienność hormonów AMH i FSH u kobiet z dysfunkcją jajników oraz prawidłową pracą jajników w zależności od wieku chronologicznego i wybranych modyfikatorów osobniczych tej zmienności.

1.1. Znaczenie AMH i FSH w rozwoju rezerwy jajnikowej

Różnicowanie układu rozrodczego podczas organogenezy przebiega dwoma odmiennymi ścieżkami w zależności od determinacji płciowej. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa inicjacja transkrypcji AMH, która podlega ścisłej kontroli pod względem miejsca i czasu. Dla zrozumienia obserwowanej zmienności surowiczego poziomu AMH konieczne jest prześledzenie historii tego hormonu, która ma początek na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego człowieka.

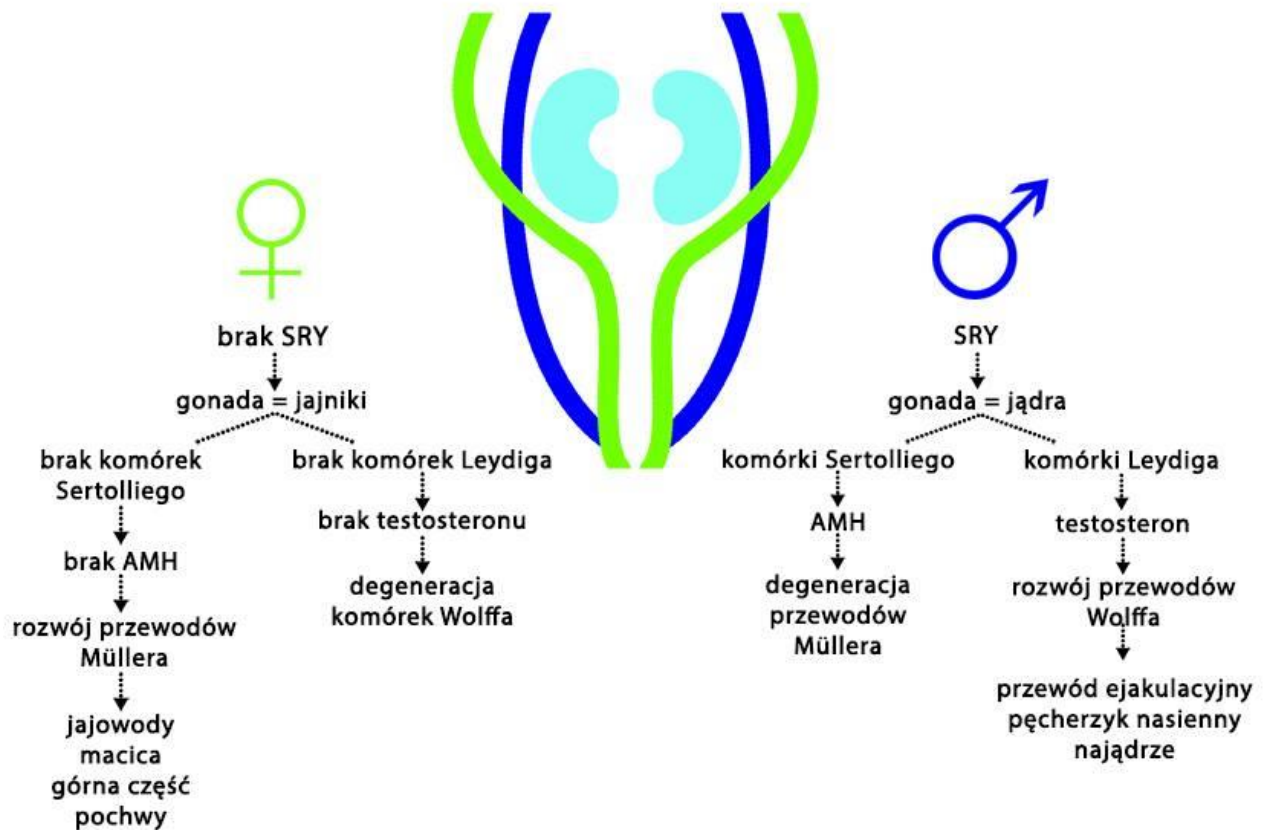
Proces gonadogenezy żeńskiego zarodka rozpoczyna się w 8-10 tygodniu po zapłodnieniu i jest uwarunkowany brakiem AMH na wczesnym etapie rozwoju (Munsterberg i Lovell-Badge 1991) (ryc.1). Genetyczna determinacja płci, związana z obecnością chromosomu Y, włącza się poprzez ekspresję genu *Sry*, znajdującego się w zawiązkach gonad męskich w rejonie TDF (*testis – determining factor*) w 4 tygodniu po zapłodnieniu (Nussey i Whitehead 2001). W 6 tygodniu organogenezy, obok przewodów Wolfa (przewody śródnerczowe), różnicują się parzyste przewody Müllera (przewody przyśródnerczowe). Powstały one przez podłużne wpuklenie nabłonka pochodzenia mezodermalnego, wyściełającego jamę ciała pod wpływem oddziaływania estrogenów, pochodzących od matki. Aktywacja ścieżki rozwojowej zarodka płci męskiej, gdzie obok testosteronu odbywa się sekrecja AMH, ma kluczowe znaczenie dla regresji przewodów Müllera.

Pierwszeństwo włączenia męskiej ścieżki rozwojowej ma istotne znaczenie dla biologii rozwoju zarodka, bowiem wczesne uruchomienie kaskady sygnałnej dla ekspresji genów AMH determinuje męski kierunek rozwoju płciowego. Komórki Sertoliego w jądrach płodowych rozpoczynają sekrecję AMH około 8 tygodnia życia, natomiast w komórkach

granulozy jajników płodowych są obecne dopiero w 24 tygodniu ciąży (Durlinger i wsp. 2002). Świadczy to o wysokim poziomie dymorfizmu płciowego już podczas embriogenezy i rozwoju prenatalnego na skutek oddziaływania AMH. Podczas embriogenezy zostaje uruchomiony proces różnicowania i rozwoju. W ten kluczowy moment włączony zostaje szereg czynników transkrypcyjnych, które w kaskadzie reakcji tworzą ścieżki rozwojowe dla obojnaczych początkowo gonad (Svingen i Koopman 2013). Wyróżniono wśród nich WT1 (+KTS) i LH9, które wraz z CBX2 przyłączają i zaktywują promotor genu *SF1* podczas różnicowania jajników (Tevosian 2013; Bialson-Lauber i Chaboissier 2015; Lin i Capel 2015). Ekspresja genu *Emx2* wpłynie na proces proliferacji na wczesnym etapie gonadogenezy oraz będzie uczestniczyć w budowaniu warstwy granulocytów pęcherzyków jajnikowych w dalszym etapie rozwoju, które odpowiadać będą za sekrecję AMH w żeńskim zarodku. SOX9 i SF1 w reakcji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi jak WT1 (+KTS) oraz GATA4 inicjują ekspresję genu *AMH*.

Po upływie 8-10 tygodni, kiedy obojnacze gonady nie podjęły realizacji programu męskiej determinacji płciowej, automatycznie włącza się program żeńskiej ścieżki rozwojowej. Geny *Wnt4* i *Rspo1* wraz ze sprzężonym ujemnie efektoorem β -cateniną, aktywnie uczestniczą w tym zadaniu. Przewody Wolfa degenerują a przewody Müllera w drugim trymestrze ciąży różnicują się w jajowody, macicę i górną część pochwy (ryc.2). Proces gonadogenezy żeńskiego zarodka inicjuje rozpad pierwotnych sznurów płciowych, stanowiących dotąd rusztowanie dla komórek prapłciowych - gonocytów. Fragmenty sznurów płciowych umiejscawiają się w rdzennej części parzystej gonady. Wskutek angiogenezy powstaje unaczyniony zrąb, będący zawiązkiem rdzenia jajnika. Pierwotne sznury płciowe degenerują, a z proliferującego nabłonka żeńskiej gonady powstają sznury korowe, które podlegając fragmentacji, dają początek komórkom ziarnistym.

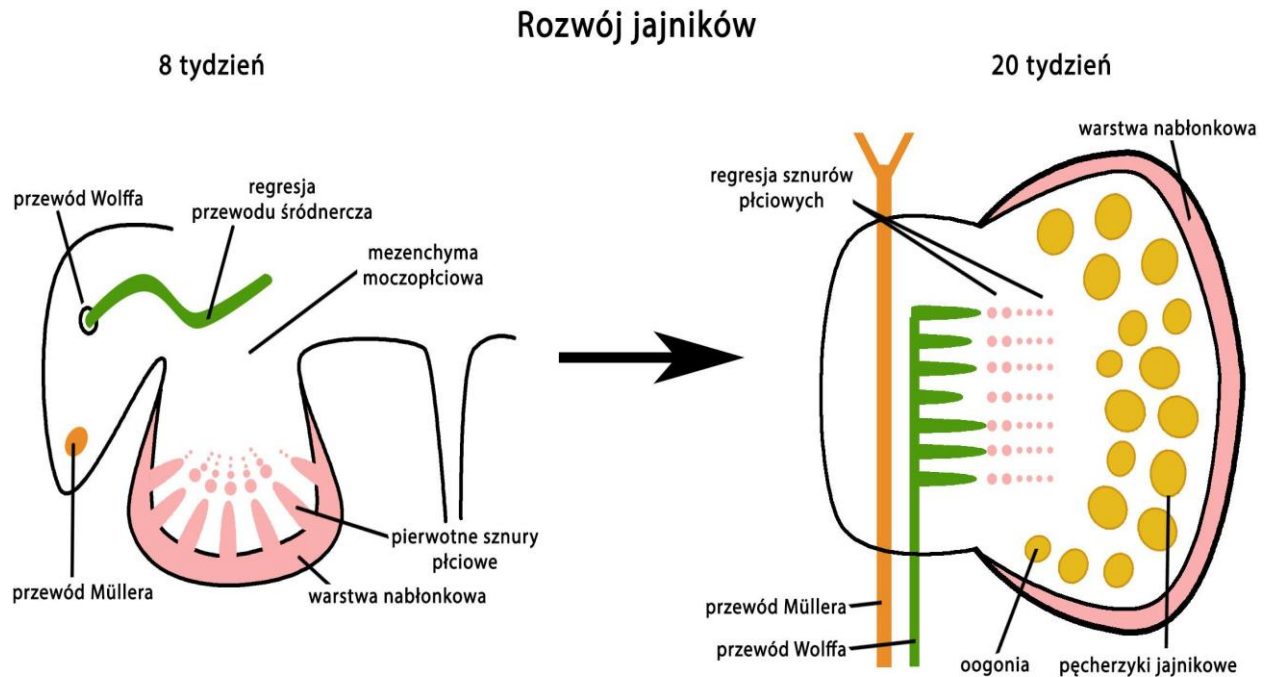
ETAPY RÓŻNICOWANIA PŁCIEWEGO



Ryc. 1. Rozwój gonad i ich przewodów na wczesnym etapie rozwoju. Realizacja ścieżki płciowej obojętnych gonad zdeterminowana przez AMH. *Zmodyfikowano za: Gilbert SF, Chromosomal Sex Determination in Mammals [w] Developmental Biology 6th Edition, Sinauer Associates, 2000, Sunderland (MA).*

Oogonie otoczone pojedynczą warstwą pregranulozy to pęcherzyki pierwotne. Komórki ziarniste pełnią funkcję podporową dla oocytów (Gardner i Shoback 2011). Receptory dla AMH (AMHR), znajdujące się na błonach komórkowych kanałów Müllera w zarodku płci żeńskiej, podlegają regresji. W ten sposób nawet śladowe ilości AMH, produkowane przez komórki ziarniste tworzących się pęcherzyków, nie mogą wpłynąć destrukcyjnie na przewody Müllera. Przekształcają się one następnie w jajowody, macice i górną część pochwy. Pierwsze pęcherzyki pierwotne powstają w jajnikach płodowych ok. 15-16 tygodnia po zapłodnieniu a gotowy pęcherzyk Graafa w 23-24 tygodniu (Pryse-Davies i Dewhurst 1971; Reynaud i wsp. 2004). Największa liczba oogonii występuje około

20 tygodnia po zapłodnieniu i przechodzą one dalsze etapy rozwoju lub podlegają atrezji. Obecność AMH jest wykrywalna w 24 tygodniu ciąży w komórkach ziarnistych pęcherzyków preantralnych (Kuiri-Hanninen i wsp. 2011).

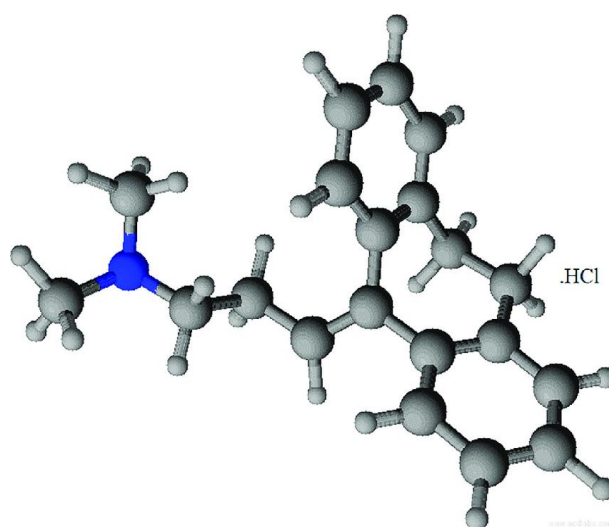


Ryc. 2. Różnicowanie jajników podczas gonadogenezy. *Zmodyfikowano za:* Gilbert SF, *Chromosomal Sex Determination in Mammals* [w] *Developmental Biology* 6th Edition, Sinauer Associates, 2000, Sunderland (MA).

W 32 tygodniu po zapłodnieniu jajniki są już w pełni wykształcone i gotowe do podjęcia wstępnej czynności endokrynnej przez warstwę tekalną i ziarnistą aparatu pęcherzykowego (ryc.2). Około 36 tygodnia blisko 300 pęcherzyków odpowiada za sekrecję AMH. Aktywowanie sekrecji gonadoliberyn w podwzgórzu inicjuje aktywność przysadki mózgowej, która drogą endokrynną poprzez wydzielanie hormonów gonadotropowych FSH i LH, rozpoczyna proces formowania się rezerwy jajnikowej. Będzie ona stanowić pulę pęcherzyków jajnikowych, która wykorzystana zostanie po raz pierwszy podczas pierwszej miesiączki rozpoczynającej okres dojrzewania oraz przez cały okres rozrodczy kobiety (Nelson i wsp. 2007; Kwee i wsp. 2008; Blińska i Hejmej 2013).

1.2. Budowa i funkcja AMH i FSH

AMH wraz z FSH pełni kluczową rolę w regulacji rekrutacji pęcherzyków jajnikowych podczas każdego cyklu menstruacyjnego (La Marca i wsp. 2009; McGee i Hsueh 2006). Model strukturalny cząsteczki AMH przedstawiono na rycinie 3. Z wiekiem stężenie AMH maleje i wygasa wraz z wyczerpaniem się rezerwy jajnikowej (Kerkhof i wsp. 2010; Hagen i wsp. 2010; Kelsey i wsp. 2011; Lee i wsp. 2012; Lie Fong i wsp. 2012).



Ryc. 3. Budowa strukturalna cząsteczki AMH.

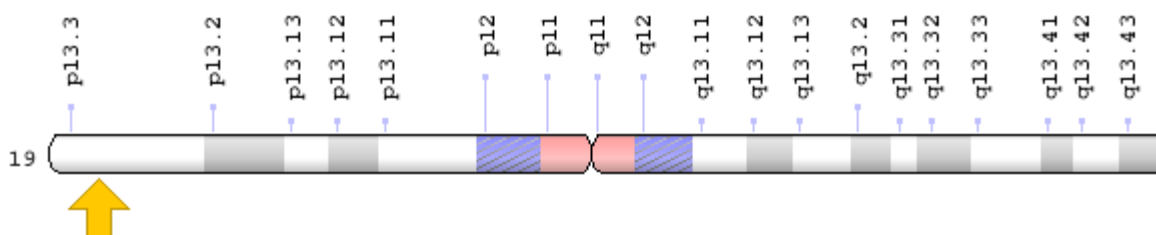
Źródło: [http:// doi.org/10.1371/journal.pone.0211077.g001](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0211077.g001).

Żeński układ hormonalny cechuje swoista dynamika związana z cyklem menstruacyjnym oraz z wiekiem. Z biologicznego punktu widzenia okres rozrodczości jest ściśle związany z obecnością puli pęcherzyków jajnikowych. Za prawidłowe gospodarowanie zasobem pęcherzyków w trakcie ich rekrutacji odpowiada głównie AMH. Podczas owulacji z pęcherzyka Graafa zostaje uwolniony oocyt i faza folikularna przechodzi w fazę lutealną, podczas której endometrium w macicy jest przygotowywane na ewentualne przyjęcie blastocysty.

AMH odgrywa kluczową rolę w rozwoju układu rozrodczego w okresie prenatalnym oraz podczas rekrutacji pęcherzyków jajnikowych w okresie rozrodczym kobiety. Jest to dimeryczna glikoproteina zbudowana z 560 aminokwasów. Gen kodujący AMH znajduje się

na krótszym ramieniu chromosomu 19p 13.3. (ryc. 4.) Złożony jest z 5 eksonów, z czego ostatni koduje domenę z C-końcem (Cohen-Haguenaer i wsp. 1987; Knight i Glistler 2006; La Marca i wsp. 2009). Ze względu na jej obecność AMH należy do nadrodziny transformujących czynników wzrostu β -TGF. Aktywność hormonu zostaje włączona po cięciu wiązania niekowalencyjnego (AMHNC) przez enzymy proteolityczne, którym połączone są dwie podjednostki w prekursorowej cząsteczce AMH. Nie wyjaśniono dotąd, kiedy ma miejsce aktywacja hormonu - w tkance docelowej czy tuż po sekrecji w komórkach granulocy. Włączenie aktywnej formy AMH jako liganda w postaci dwóch domen zawierających proregion z N-końcem i homodimer z C-końcem, połączonych mostkiem dwusiarczkowym, umożliwia połączenie z receptorem AMHR-II i uruchomienie kaskady sygnałnej w komórkach docelowych (di Clemente i wsp. 2010).

Kaskada reakcji spowodowana przyłączeniem się AMH do receptora AMHR-II funkcjonalnie powiązany z AMHR-I powoduje fosforylację tyrozyny i uruchomienie białek sygnałowych SMAD (ryc. 5.). AMHR-II ma powinowactwo tylko do jednego rodzaju liganda i jest nim AMH, natomiast AMHR-I łączy się z kilkoma rodzajami ligandów z rodziny β -TGF (Massague i wsp. 1996). Geny kodujące receptor AMHR-II zostały odkryte i sklonowane przez dwa niezależne zespoły badaczy (Baarends i wsp. 1994; di Clemente i wsp. 1994). Znajdują się one na chromosomie 12 (13q12) i są złożone z 11 eksonów gdzie 3 pierwsze kodują domenę extracellularną, 4 ekson - domenę transbłonową i 7 kolejnych pozostałych – domeny wewnątrzkomórkowe. Sekwencje mają długość 8,7 kb.

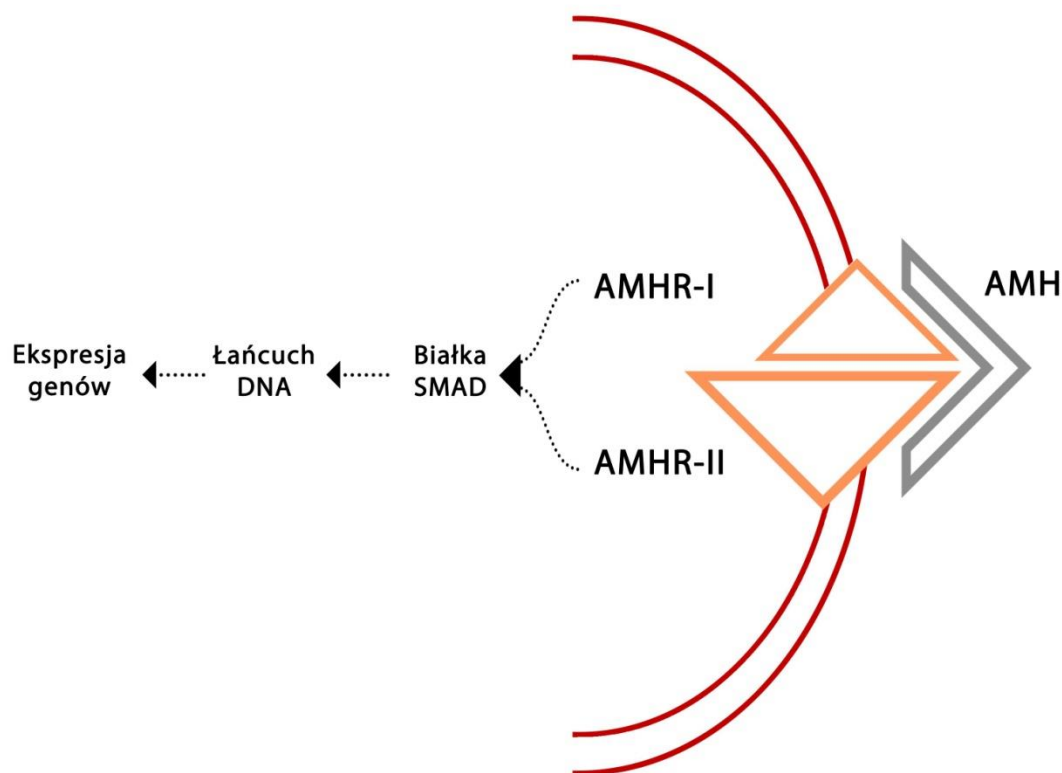


Ryc. 4. Gen *AMH* zlokalizowany na chromosomie 19.

Źródło: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AMH#sourcesforpage>

Liczba receptorów AMHR oraz miejsce ich występowania jest zmienne i zależne od aktualnego etapu rozwoju ontogenetycznego. Obecność układu AMH - receptor oraz system sprzężeń hormonów w osi płciowej są kluczowe w prawidłowej regulacji cyklu miesięczkowego od menarche aż do wyczerpania rezerwy jajnikowej około 6 lat przed ustaniem miesiączkowania. Wiek wystąpienia menopauzy naturalnej jest zróżnicowany i przeciętnie w Polsce pojawia się u kobiet w 51,2 roku życia. (Kaczmarek 2007).

FSH jest hormonem produkowanym przez komórki zasadochłonne przedniego płata przysadki mózgowej, który w odpowiedzi na zwiększenie uwalniania gonadoliberyny (GnRH) z rejonu jądra łukowego w części przyśrodkowo-podstawnej podwzgórza, podejmuje sekrecję gonadotropin FSH i LH. Drogą endokrynną oddziałują one na gonady regulując cykl rozrodczy. FSH w interakcji z estrogenami inicjuje powstawanie receptorów dla FSH (FSH-R) (Macklon i Fauser 2011). FSH odpowiada za rozrost warstwy ziarnistej co powoduje wzrost i rozwój pęcherzyka jajnikowego (Traczyk 1989; Skałba 2008; Gardner i Shoback 2011). FSH stymuluje również wzrost aktywności aromatazy, która odpowiada za konwersję androgenów do estrogenów (Grossman i wsp. 2008).



Ryc. 5. Szlak sygnałowy AMH. *Zmodyfikowano za: La Marca i Volpe, The anti-Müllerian hormone and ovarian cancer. Human Reproduction, 2007, 13:265-73.*

FSH jest glikoproteiną złożoną z dwóch łańcuchów peptydowych α i β . Podjednostka α (89 aminokwasów) jest charakterystyczna dla innych gonadotropin, natomiast podjednostka β (115 aminokwasów) określa specyfikę każdego z hormonów gonadotropowych (Gardner i Shoback 2012). Gen *FSH β* kodujący tę domenę jest położony na chromosomie 11p13 i może podlegać mutacjom zaburzającym prawidłową regulację osi podwzgórze-przysadka-jajniki (HPO), proces steroidogenezy czy prawidłową rekrutację pęcherzyków w jajniku.

Układ sprzężenia zwrotnego zostaje włączony już w trzecim trymestrze ciąży (Trotter i wsp. 1999). Pod wpływem hormonów gonadotropowych następuje aktywacja receptorów, znajdujących się w komórkach tekalnych osłonki oraz w komórkach ziarnistych aparatu pęcherzykowego w jajnikach (Juul i wsp. 2012). Hormony, poprzez system sprzężenia zwrotnego w osi płciowej, odpowiadają za cykliczne przemiany zachodzące w jajniku, którym od tego momentu towarzyszyć będzie wzrost i atrezja wybranej części pęcherzyków. Podczas folikulogenezy pęcherzyki prezentują różne stadia rozwoju, włączając się w proces

steroidogenezy pod wpływem jeszcze niepełnej aktywacji osi płciowej. W 18 tygodniu ciąży w jajnikach płodowych znajduje się około 7 milionów pęcherzyków (de Velde i Pearson 2002). Pod koniec ciąży poziom hormonu Anty-Müllerowskiego utrzymuje się na stałym, stosunkowo niskim poziomie. W wyniku atrezji pula pęcherzyków jajnikowych zostaje zredukowana do ok. 1-2 miliona w chwili narodzin.

Badania wykazały, że u wcześniaków płci żeńskiej dojrzewanie puli pęcherzyków jajnikowych jest kontynuowane przez określony czas po urodzeniu i zatrzymuje się na etapie dojrzewania fizjologicznego (Swamy i wsp. 2008). Tę sytuację obrazuje stosunkowo wysoki poziom FSH w odniesieniu do dziewczynek urodzonych w prawidłowym terminie (Trotter i wsp. 1999). Znajduje to potwierdzenie w nieco wyższym poziomie estrogenów, który następnie obniża się i utrzymuje na stałym poziomie przez cały okres przedpokwitaniowy (Winter i wsp. 1976). W okresie postnatalnym występują dwa piki stężenia FSH, pierwszy w przedziale 1-3 miesiąca po urodzeniu a drugi około 4 miesiąca po czym następuje gwałtowny spadek FSH i tendencja ta utrzymuje się do pierwszego roku życia (Polhemus 1953; Shinkawe i wsp. 1983; Cohen i wsp. 1993; Szmidt i Schwarz 2000).

Zaobserwowano niewielkie osobnicze fluktuacje w puli pęcherzyków jajnikowych, związane z czynnikami takimi jak na przykład: wiek kobiety podczas kolejnych ciąż, długość cyklu i liczba ciąż matki, przebyte choroby przed ciążą np. cukrzyca czy palenie tytoniu przed i w czasie ciąży oraz różnice w warunkach podczas rozwoju prenatalnego. Istnieje prawdopodobieństwo, że czynniki te mogą zmniejszyć rezerwę jajnikową płodu żeńskiego i wpłynąć na wcześniejszą menopauzę w życiu dorosłym (Morris i wsp. 2011).

1.2.1. AMH i FSH w poszczególnych etapach ontogenezy

Od narodzin do osiągnięcia dojrzałości płciowej

Przez około 3 miesiące po narodzinach poziom AMH stabilizuje się i jest utrzymany na stosunkowo niskim poziomie (Al-Attar i wsp. 1997; Lukas-Croisie i wsp. 2003; Rey i wsp. 2006; Lasala i wsp. 2011). Od 3 miesiąca rośnie i w przedziale wieku 4-8 lat osiąga podwojoną wartość stężenia, które wzrasta aż do okresu pokwitaniowego. Powodem tej tendencji jest rekrutacja pęcherzyków preantralnych i małych antralnych odpowiedzialnych za sekrecję AMH. Nie przechodzą one jednak w kolejne fazy rozwoju, prowadzące do rekrutacji pęcherzyka dominującego, wskutek braku pełnej aktywności osi płciowej (Andersen i wsp. 2010). W okresie niemowlęcym i dzieciństwa obserwuje się częściową

niewydolność podwzgórza. Równocześnie w surowicy krwi występuje niewielkie stężenie gonadotropin. W czasie wczesnego dzieciństwa i kolejnych etapów rozwoju, może wystąpić pewna zmienność w stężeniach hormonu wynikająca z predyspozycji genetycznych oraz zmiany liczby pęcherzyków primordialnych i wzrastających w określonych przedziałach wiekowych (Hagen i wsp. 2010; Kelsey i wsp. 2011). Średnio 75% pęcherzyków podlega atrezji w okresie od urodzenia do wystąpienia menarche.

Badania wskazują na dość szeroki przedział zakresu stężeń referencyjnych dla zdrowych dziewcząt w okresie dzieciństwa i adolescencji: 4,5-62,0 pmol/L (Hage i wsp. 2010). Obserwacje te, z zastrzeżeniem możliwości wystąpienia osobniczych fluktuacji, pozwalają stwierdzić, że AMH jest reprezentatywnym, ilościowym markerem, odnoszącym się do zachowanej puli pęcherzyków i podlega tendencji wzrostowej aż do wystąpienia menarche.

Dojrzewanie

Aktywacja osi podwzgórze-przysadka-gonady włącza drogą endokrynną system sprzężeń zwrotnych pomiędzy mózgiem a jajnikami. Od tego momentu przysadka mózgowa poprzez sekrecję gonadotropin FSH i LH regulować będzie cykl menstruacyjny, w którym kluczowym momentem będzie uwolnienie gotowej do zapłodnienia komórki jajowej podczas owulacji. Oocyty otoczone pojedynczą warstwą komórek ziarnistych i pozostające w fazie diplotenu i podziału mejotycznego, zostaną aktywowane po odebraniu sygnału z przedniego płata przysadki mózgowej podczas pierwszej miesiączki. Badania longitudinalne wykazały wzrost poziomu AMH w wieku poprzedzającym menarche o ok. 20% w przedziale wieku 7-9 lat (Hagen i wsp. 2010; Kelsey i wsp. 2012; Lie Fong i wsp. 2012). Skok poziomu AMH ma związek z sukcesywnym wzrostem stężenia estrogenów i inhibiny B w osoczu krwi. Fakt ten łączony jest ze wzrostem aktywności pęcherzyków jajnikowych i gotowością do rozrodu (Crofton i wsp. 2002). W gonadach uruchomiony zostaje mechanizm folikulogenezy i wybrany tylko jeden pęcherzyk – pęcherzyk Graafa, uwalniający oocyt w cyklu miesięcznym (Durlinger i wsp. 1999; Visser i wsp. 2006). Wystąpienie menarche wieńczy etap przygotowania organizmu dziewczynki w okresie przed pokwitaniem do pełnienia funkcji rozrodczej w dorosłym życiu.

Rola AMH i FSH jest istotna w regulacji funkcjonowania jajników. Pojawienie się menarche, rozpoczyna kluczowy dla biologii rozrodu etap – dojrzewanie i zdolność organizmu kobiety do rozrodu. Gwałtowny wzrost rekrutacji pęcherzyków, spowodowany

pulsacyjnym wyrzutem FSH i LH z przysadki, wywołuje nagły wzrost poziomu E_2 , powodując pojawienie się menarche (Sowers i wsp. 2010). Wiek pierwszej miesiączki zależy od liczby pęcherzyków w jajniku (AFC) oraz ich aktywności (Karapanou i wsp. 2010; Fleming i wsp. 2012). Uwarunkowany jest wieloma innymi czynnikami stąd duże różnicowanie międzyosobnicze i międzypopulacyjne. Wiek menarche dla polskich dziewcząt zmienia się w przedziale 12,8-13,2 lat (Kaczmarek i Wolański 2018).

W ciągu dwóch lat od osiągnięcia dojrzałości płciowej – poziom AMH spada o 30% w odniesieniu do czasu poprzedzającego pojawienie się menarche. Przyczyną obniżenia stężenia hormonu jest rekrutacja małych pęcherzyków antralnych. Komórki ziarniste wznrastających pęcherzyków o średnicy powyżej 4-6 mm zaprzestają sekrecji AMH.

Okres rozrodczości

Po wystąpieniu menarche poziom AMH obniża się i utrzymuje wartość plateau do 25 roku życia. Jest to maksymalna wartość stężenia AMH, jaka występuje w życiu kobiety. To punkt przełomowy, bowiem następuje odwrócenie dodatniej korelacji poziomu stężenia AMH i wieku. Od tego momentu hormon AMH można uznać za jeden z najczulszych markerów aktualnej puli pęcherzyków pierwotnych aż do całkowitego wyczerpania się rezerwy jajnikowej i menopauzy (Fleming i wsp. 2012). Większość autorów utrzymuje, że AMH jest miarodajnym wskaźnikiem puli pęcherzyków jajnikowych dopiero po 25 roku życia (Kerkhof i wsp. 2010). La Marca dowiódł, że sekrecja AMH odbywa się wyłącznie w jajnikach. Konsekwencją resekcji jajników jest brak możliwości oznaczenia hormonu w surowicy krwi już 3 do 5 dni po zabiegu (La Marca i wsp. 2011).

Pełny cykl jajnikowy w okresie rozrodczym kobiety kończy się uwolnieniem komórki jajowej z pęcherzyka Graafa podczas owulacji. Proces dojrzewania pęcherzyka (folikulogeneza) polega w pierwszej kolejności na proliferacji komórek warstwy ziarnistej (*stratum granulosum*). Na zewnątrz warstwy ziarnistej znajduje się osłonka tkalna (*theca*), która pełni funkcję ochronną i odżywczą dla pęcherzyka ze względu na bogate unaczynienie. W jej wewnętrznej warstwie (*theca interna*) zachodzą kluczowe dla procesu rozrodczego reakcje steroidogenezy pęcherzykowej. Drogą endocytozy przedostają się z krwioobiegu lipidy, które w mitochondriach, w obecności systemu enzymów cytochromowych P450, kodowanych przez gen *CYP17a* konwertują w hormony płciowe (Gardner i Shoback 2011). We wznrastającym pęcherzyku tworzy się jamka (*antrum*)

z płynem pęcherzykowym, który zawiera wysokie stężenie estrogenów i mniejsze androgenów. Zachowanie odpowiednich proporcji między tymi hormonami, stanowić będzie o możliwości zapłodnienia i prawidłowym rozwoju zarodka (Jura i Klag 2005). Oocyt komunikuje się z warstwą ziarnistą pęcherzyka za pomocą mikroosmków. Prawidłowa morfologia, funkcje czynnościowa i wydzielnicza wszystkich elementów składowych pęcherzyka odpowiadają w przyszłości za sukces rozrodczy (Jura i Klag 2005).

Cykl dojrzewania i funkcja endokryna pęcherzyków są powiązane z czynnością hormonów gonadotropowych. Układ sprzężeń zwrotnych pomiędzy podwzgórzem, przysadką i jajnikami, odpowiadający za prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego kobiet, przedstawia ryc. 6.

Prawidłowo przebiegający cykl menstruacyjny warunkuje kontrolowana przez podwzgórze zmienna pulsacja i amplituda wydzielania gonadoliberyn, co przekłada się na pulsacyjne wydzielanie przez przysadkę mózgową gonadotropin FSH i LH. Ten biologiczny zegar odmierza fazy cyklu płciowego - folikularną, zakończoną owulacją oraz lutealną, przygotowująca narządy rodne kobiety do implantacji potencjalnie zapłodnionej komórki jajowej (ryc. 7.). Faza folikularna, jako pierwsza część cyklu jajnikowego jest częściowo niezależna od gonadotropin. To etap rozwoju pęcherzyka pierwszorzędowego. Kolejny etap tej fazy jest efektem pulsacyjnego wydzielania GnRH z niższą częstotliwością: co 90-120 minut, która odpowiada za wydzielanie FSH z przedniego płata przysadki mózgowej. Komórki ziarniste dzielą się mitotycznie co prowadzi do zwiększenia objętości warstwy granulozy otaczającej oocyt oraz wzmocnienie ich funkcji endokrynej.

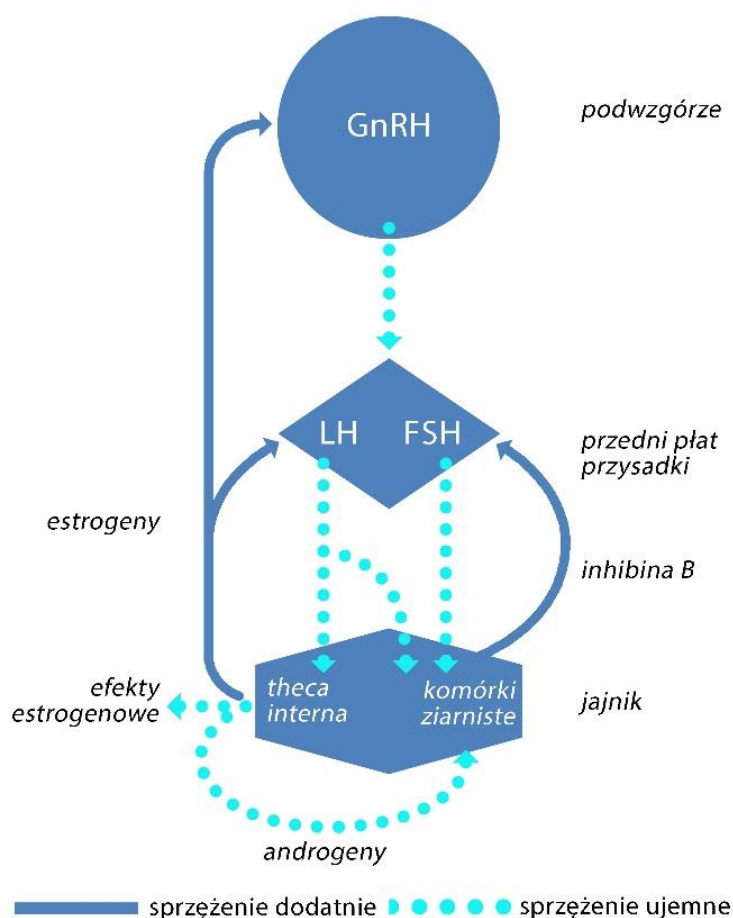
Różnice w częstości pulsacji wydzielania GnRH odpowiadają za rodzaj wydzielanej gonadotropiny przez przedni płat przysadki. Niższa częstotliwość związana jest z sekrecją FSH a wyższa częstotliwość wydzielania gonadoliberyn powoduje uwolnienie LH. Przemiany okołowulacyjne dotyczą wystąpienia pikę LH, pod wpływem oddziaływania estradiolu na podwzgórze. Drogą endokrynną FSH reguluje w ciągu 5-7 dni rozpoczętej fazy folikularnej dalszy proces rekrutacji pęcherzyków, zainicjowany pod koniec fazy lutealnej poprzedniego cyklu menstruacyjnego. Z grupy wytypowanych komórek zostaje docelowo wyselekcjonowany tylko jeden pęcherzyk dominujący, który będzie podlegał dalszym modyfikacjom w 28-dniowym cyklu menstruacyjnym.

Wzrost poziomu FSH świadczy o procesie dojrzewania pęcherzyka w jajniku (Debieve i wsp. 2000; Faiman i wsp. 1976). Deficyt FSH powoduje atrezję pęcherzyków (Skałba 2008). Podczas dojrzewania pęcherzyki przemieszczają się w stronę rdzennej części jajnika,

która jest bogato unaczyniona. Swoistą wrażliwość pęcherzyków na FSH warunkuje liczba i rozmieszczenie receptorów związanych z białkiem G (Macklon i Fauser 2011). Po przyłączeniu liganda uruchomiona zostaje kaskada sygnałowa i wybrane pęcherzyki podlegają dalszej rekrutacji a następnie selekcji, gdzie około 6-10 pęcherzyków antralnych będzie kandydować do dalszego rozwoju i jeden z nich osiągnie status pęcherzyka dominującego – pęcherzyka Graafa.

Ujemne sprzężenie zwrotne pomiędzy rosnącym stężeniem FSH i AMH oraz FSH i estrogenami odpowiada za pik LH. GnRH osiągają szczytową częstotliwość pulsacji co 60 minut (Gardner i Shoback 2011). Równocześnie poprzez pętlę długą sprzężenia zwrotnego, estrogeny stymulują stopniowe zwiększanie wydzielania przez przedni płat przysadki LH zgromadzonego w ziarnistościach gonadotropów, który w konsekwencji stymuluje dojrzalą pęcherzyk Graafa do uwolnienia oocyta (ryc. 8.). W tym czasie następuje dokończenie podziału mejotycznego w komórce jajowej i luteinizacja pęcherzyka (Pawlikowski 2003).

Sprzężenie zwrotne ujemne powoduje, że estrogeny oddziałując na podwzgórze, wywołują spadek poziomu FSH. Wraz z przekształceniem się pękniętego pęcherzyka w ciało żółte zostaje zakończona faza pęcherzykowa. Cykl menstruacyjny przechodzi w fazę lutealną skierowaną na przygotowanie endometrium do ewentualnego przyjęcia zapłodnionej komórki jajowej.



Ryc. 6. Regulacja hormonalna osi płciowej podwzgórze-przysadka-jajniki przez układ sprzężeń zwrotnych. Zmodyfikowano za: Konturek S., *Fizjologia człowieka*, Wrocław, Wyd. ELSEVIER Urban & Partner 2007.

Gwałtowny, przedowulacyjny pik LH po owulacji - ulega obniżeniu do poziomu podstawowego. Komórki śródmiąższowe osłonki oraz komórki warstwy ziarnistej w odpowiedzi na oddziaływanie LH po owulacji, przekształcają się w komórki luteinowe osłonkowe i luteinowe ziarniste, będące źródłem progesteronu. Jego opioidowa aktywność powoduje, że podwzgórze zwalnia pulsacyjne wydzielanie GnRH do 3-5 godzin a następnie osiąga rytm co 90-120 min pod koniec fazy lutealnej (Gardner i Shoback 2011). Progesteron jest produkowany przez ciało żółte oraz w syncytiotrofoblastycie łożyska podczas ewentualnej ciąży. Odpowiada za właściwe przygotowanie endometrium w jamie macicy do implantacji zarodka.

Jeśli nie doszło do zapłodnienia to szczytowy w połowie fazy lutealnej poziom progesteronu osiąga teraz minimalną wartość, co jest podyktowane napływem FSH

rozpoczynającym przygotowanie do fazy folikularnej nowego cyklu. LH poprzez zwiększenie aktywności aromatazy wpływa na konwersję androgenów do estrogenów w komórkach luteinowych ziarnistych. Wpływ FSH jest nieznaczny. Powstałe estrogeny są aktywne w procesie luteolizy pod koniec cyklu. Fazę lutealną kończy menstruacja. Równocześnie w jajniku przebiega proces rekrutacji, wzrostu i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, stanowiących o przebiegu kolejnego cyklu menstruacyjnego (Nelson i wsp. 2007).

Dynamika zmian zachodzących w aparacie pęcherzykowym prowadzi do spadku liczby pęcherzyków jajnikowych do 400 tysięcy w chwili osiągnięcia menarche a podczas menopauzy liczba ta zmniejszy się do 1000 pęcherzyków. Za zmiany ilościowe rezerwy jajnikowej odpowiada AMH, który wraz z gonadotropiną FSH bierze udział w rekrutacji pęcherzyków jajnikowych na wczesnym etapie ich rozwoju regulując proces konwersji androgenów do estrogenów przez enzym aromatazę (ryc.7).

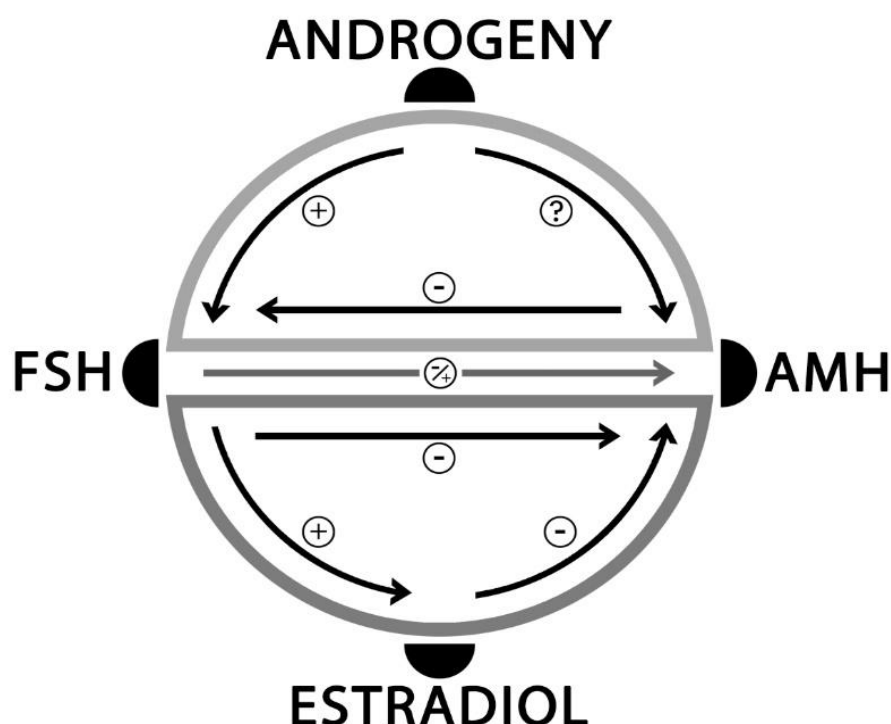
Liczbę pęcherzyków primordialnych można oszacować poprzez oznaczenie stężenia AMH w osoczu krwi obwodowej (van Rooij i wsp. 2002; Fanchin i wsp. 2003; Visser i wsp. 2006; Kwee i wsp. 2008; La Marca i wsp. 2009; Hagen i wsp. 2010). Poziom AMH odzwierciedla sekrecję tylko tych pęcherzyków, które są unaczynione. AMH oddziałuje auto- i parakrynnie. Pęcherzyki z upośledzonym unaczynieniem bądź też jego brakiem podlegają programowanej śmierci komórek - atrezji. Podwyższone stężenie AMH w płynie pęcherzykowym może okazać się toksyczne dla oocytów, które przedwcześnie podjęły mejozę. Przypuszcza się, że może to być swoista regulacja, kontrolująca czas i miejsce następujących po sobie procesów rozwojowych w celu rekrutacji najlepszego jakościowo pęcherzyka podczas cyklu menstruacyjnego.

AMH poprzez inhibicję odpowiada za optymalne gospodarowanie zasobem pęcherzyków jajnikowych, zapobiegając nadmiernej rekrutacji pęcherzyków jajnikowych w stadium przedantralnym i małym antralnym. Podczas folikulogenezy AMH działa antagonistycznie w stosunku do FSH. Proces wzrastania i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych do stadium pęcherzyka Graafa trwa średnio 85 dni, czyli około 3 miesiące (Mutukrishna i wsp. 2004; Bentley i Muthukrishna 2007).

Zmienność puli pęcherzyków jajnikowych utworzonej w okresie rozwoju prenatalnego, wyznaczają cykliczne przemiany związane z wpływem hormonów oraz włączona podczas rozwoju płodowego i trwająca cały okres rozrodczy - atrezja. Z tego powodu największy wpływ na zmienność badanych w niniejszej pracy hormonów: AMH i FSH u kobiet

w wieku rozrodczym z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami, wydaje się wywierać ich wiek.

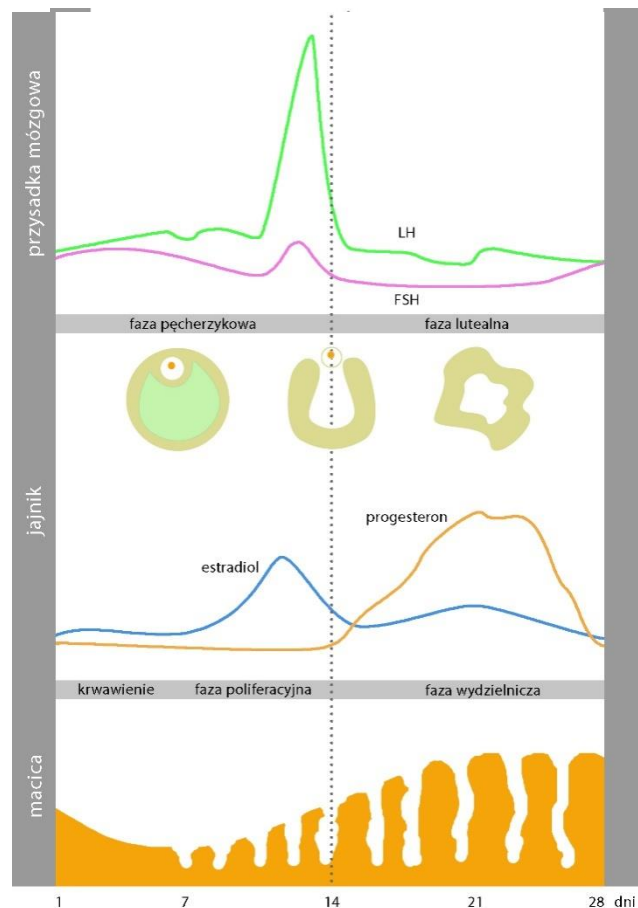
Precyzyjny mechanizm neuroendokryny nadaje cyklowi menstruacyjnemu biologiczny rytm i wymiar biologiczny umożliwiający wydanie potomstwa. Przez cały okres rozrodczy kobiety podczas owulacji zostaje uwolniony z pęcherzyka Graafa gotowy do zapłodnienia oocyt (ryc. 8.). Proces owulacji dzieli cykl menstruacyjny na fazę folikularną (proliferacyjną) i lutealną (wydzielniczą).



Ryc. 7. Związek pomiędzy AMH, FSH i hormonami steroidowymi regulowany przez pętle dodatniego lub ujemnego sprzężenia zwrotnego. *Zmodyfikowano za: Dewailly i wsp., Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. Human Reproduction. 2016; 22 (6):709–24.*

W toku ontogenezy następujące po sobie kolejno etapy rozwoju biologicznego kobiet takie jak okres przygotowawczy, rozrodczy i czas po zakończeniu zdolności reprodukcyjnych, stanowią kwintesencję biologicznego znaczenia organizmu żeńskiego (Kaczmarek i Wolański 2008). Zmienność puli pęcherzyków jajnikowych utworzonej

w okresie rozwoju prenatalnego wyznaczają cykliczne przemiany związane z wpływem hormonów i atrezja włączona podczas rozwoju płodowego i trwająca cały okres rozrodczy.



Ryc. 8. Regulacja cyklu menstruacyjnego przez FSH i LH. Źródło: Marchewka A., Dąbrowski Z., Żołądź J., *Fizjologia starzenia się. Profilaktyka i rehabilitacja*. Warszawa, Wyd. PWN, 2013.

1.2.2. Rola AMH i FSH w folikulogenezie

Prawidłowy przebieg folikulogenezy regulują dwie determinanty AMH i FSH. Ich rola opiera się na antagonistycznym oddziaływaniu na aparat pęcherzykowy podczas kolejnych etapów folikulogenezy. Ewolucyjnie utrwalona funkcja AMH w tym procesie polega na oszczędnym gospodarowaniu zasobem pęcherzyków jajnikowych podczas całego okresu rozrodczego kobiety. FSH odpowiada za rekrutację, wybór i dojrzewanie tylko jednego pęcherzyka w całym cyklu menstruacyjnym. Reszta podlega atrezji, w wyniku której następuje wyczerpanie rezerwy jajnikowej (ryc. 9.).

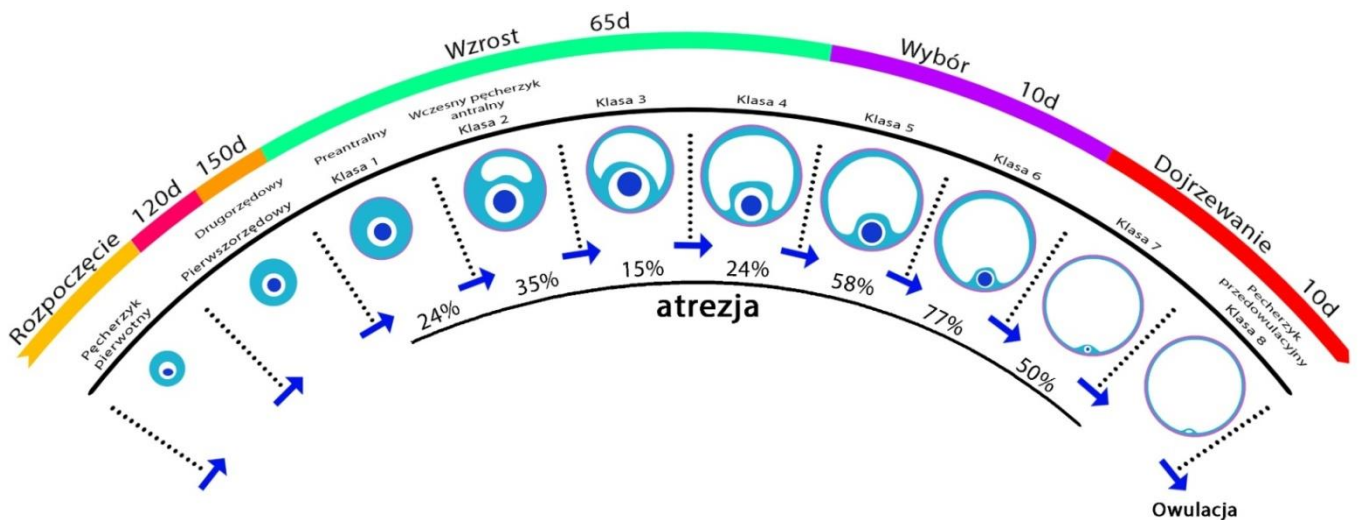
Istotna dla procesu wzrostu i dojrzewania pęcherzyków jest etapowość ich rozwoju regulowana przez FSH. Okres preantralny obejmuje rozwój pęcherzyka pierwszorzędowego, drugorzędowego i wczesny etap pęcherzyka trzeciorzędowego podczas tworzenia się jamy pęcherzyka (klasa 2) (Gardner i Shoback 2011). Należy podkreślić, że AMH jest obecny podczas folikulogenezy tylko w kilku jej etapach i oddziałuje na pęcherzyki w stadium preantralnym i wczesnym antralnym niezależnie od wpływu gonadotropin, chroniąc rezerwę jajnikową przed nadmierną atrezią podczas dalszych etapów ich rozwoju i dojrzewania. Proces tworzenia się pęcherzyków do stadium preantralnego trwa 300 dni, natomiast dojrzewanie od stadium antralnego do pęcherzyka przedowulacyjnego (klasa 8) trwa 40 dni. Wydzielanie AMH przez pęcherzyki preantralne i małe antralne osiągające rozmiar 4-6 mm, odbywa się niezależnie od wpływu FSH. Pęcherzyki powyżej 8 mm są FSH-zależne.

AMH reguluje przedwczesną rekrutację i dalszy rozwój pęcherzyków poprzez inhibicję receptorów FSH, co włącza drugi etap rekrutacji w czasie rozpoczętego cyklu jajnikowego. AMH kontroluje ekspresję enzymów cytochromu P450 i aromatazy indukowanej przez FSH (Lebbe i Woodruff 2013). Złożony mechanizm folikulogenezy w pierwszym etapie wzrastania pęcherzyków jest kontrolowany na poziomie parakrynnym a następnie endokrynnym podczas kolejnych stadiów rozwoju i rekrutacji pęcherzyków (ryc. 10.).

Wzrost stężenia estrogenów w fazie folikularnej powoduje obniżenie poziomu AMH w pęcherzyku wskutek reakcji sprzężenia zwrotnego. Wykazano, że poziom AMH również koreluje ujemnie ze stężeniem estrogenów zawartych w płynie pęcherzykowym małych pęcherzyków antralnych. Odpowiedni poziom estrogenów reguluje wystąpienie piku LH co warunkuje uwolnienie oocyta z pęcherzyka Graafa podczas owulacji (McGee i Hsueh 2000). Utrzymanie w odpowiedniego stężenia androgenów i estrogenów w poszczególnych etapach rozwoju pęcherzyków jajnikowych odpowiada za regulację cyklu menstruacyjnego

i owulację. Wpływ androgenów na ekspresję AMH nie został dokładnie poznany (Lebbe i Woodruff 2013).

Pęcherzyki pierwotne zostają utworzone podczas rozwoju prenatalnego i pozostają w fazie spoczynkowej do momentu inicjacji układu rozrodczego.



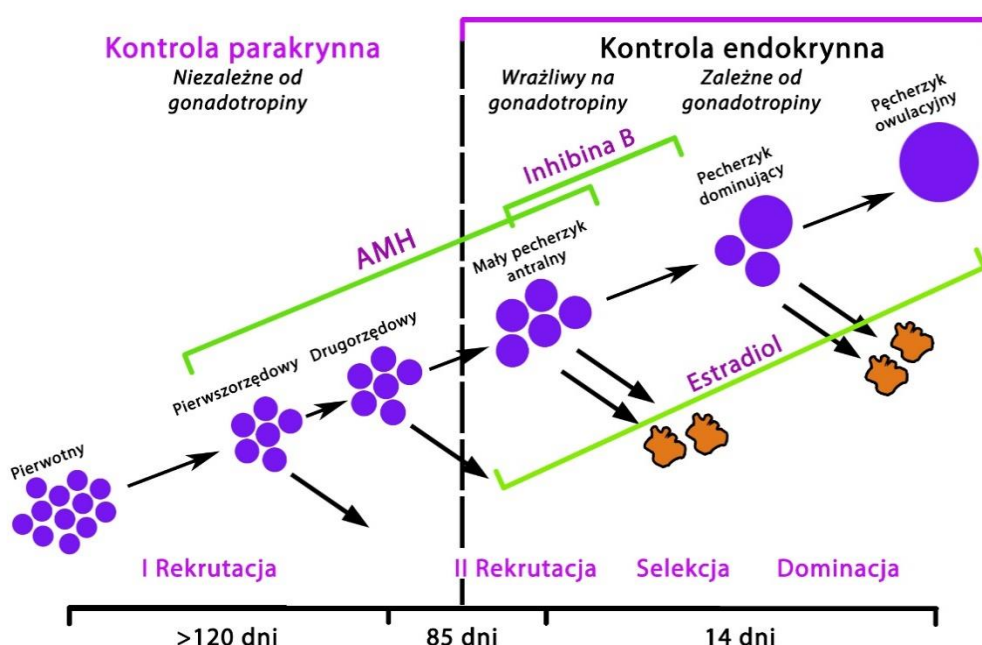
Ryc. 9. Etapy folikulogenezy w ludzkim jajniku z uwzględnieniem atrezji. Zmodyfikowano za: Gougeon, Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocrine Reviews* 1996;17:121.

Brak jest naukowego uzasadnienia wyjaśniającego kwestię czasu oraz warunki wyboru pęcherzyków do dalszego rozwoju oraz tych, które podlegają atrezji podczas trwającego okresu rozrodczego kobiet. Inicjacji do wzrostu i dojrzewania w kolejnych etapach rozwoju podlegają tylko niektóre z pęcherzyków. Niektóre z nich aktywowane są na samym jego początku, inne natomiast pozostają w uśpieniu w fazie spoczynkowej nawet przez wiele lat zanim zostaną włączone w cykl jajnikowy (Zhang i Liu 2015). Proces inhibicji spoczynkowej pozostaje w toku badań.

Warto podkreślić rolę komunikacji pomiędzy komórkami warstwy ziarnistej a oocytem poprzez szczeliny w błonie komórkowej. Wobec braku ukrwienia na wczesnym etapie rozwoju pęcherzyków jajnikowych, transport czynników sygnałowych, substancji

odżywczych czy też produktów metabolizmu komórkowego, odbywa się poprzez koneksyny (Gardner i Shoback 2011).

Aktywacja osi płciowej podwzgórze-przysadka-jajniki rozpoczyna regulację endokrynną FSH-zależną. Związany z folikulogenezą proces atrezji, który zostaje włączony na wczesnym etapie rozwoju pęcherzyka antralnego, jest największy (77%) w stadium pęcherzyka Graafa 6-10 mm (klasa 6). W tym stadium następuje ostateczny wybór pęcherzyka przedowulacyjnego (klasa 8).



Ryc. 10. Wpływ AMH i FSH na rozwój pęcherzyków jajnikowych podczas folikulogenezy. Zmodyfikowano za: Broer i wsp., Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications, *Human Reproduction*. 2014; 20(5): 688-701.

Złożony system cyklu jajnikowego, regulowanego przez kluczowe dla tego procesu hormony AMH i FSH, umożliwia realizację najistotniejszej biologicznie funkcji, jaką jest rozrodczość. Występujący coraz częściej problem związany z zaburzeniem płodności i niepłodnością dotyka coraz więcej kobiet, które podjęły decyzję o macierzyństwie. W dużej mierze jest on związany z dysfunkcją jajników jak na przykład POF czy PCOS.

1.2.3. AMH jako marker POF

Podjęta w niniejszej pracy problematyka dotyczy zagadnień związanych z prawidłową i zaburzoną funkcją jajników. Postępujący problem z zaburzeniami rozrodczości oraz coraz częściej występujące zjawisko niepłodności, podkreśla wagę badań dotyczących prawidłowego funkcjonowania jajników.

Jedną z przyczyn zaburzeń płodności jest przedwczesna niewydolność jajników (POF). Jest to dysfunkcja jajników, którą charakteryzuje obniżona liczba pęcherzyków oraz w efekcie ich przedwczesne wyczerpanie u kobiet przed 40 rokiem życia, podczas gdy wiek menopauzy naturalnej waha się u polskich kobiet pomiędzy 49 a 52 lat (Kaczmarek 2007; 2007a; 2015). Na skutek podwyższonego poziomu gonadotropin mogą wystąpić czasowe zaburzenia miesiączkowania, a w konsekwencji amenorrhea (Coulam i wsp. 1986; Anasti 1998; Nelson i wsp. 2005). Przyczyną takiej sytuacji są zaburzenia genetyczne związane z mutacjami dotyczącymi enzymów zaangażowanych w steroidogenezę jak np. *CYP17- α* czy aromataza lub mutacja w rejonie receptora FSH (Gardner i Shoback 2011). Obraz fenotypowy dotkniętych tą mutacją kobiet, może dotyczyć ciężkiej postaci związanej z niewystąpieniem drugorzędowych cech płciowych po normalny obraz z nieznacznie obniżoną zdolnością rozrodczą. Ciężkie postaci dotyczące genetycznego podłoża POF dotyczą takich jednostek chorobowych jak zespół Turnera z kariotypem 45,X lub kariotypem mozaikowym 45,X/46,XX, gdzie opisano kilka przypadków ciąży u kobiet z łagodniejszą postacią mutacji (Gardner i Shoback 2011). Czynnikiem genetycznym w tym np. zespół kruchego chromosomu związany z permutacją genu *FMRI*, zlokalizowanego w dystalnej części chromosomu X, występuje stosunkowo rzadko stąd też rzadko jest powodem pojawienia się POF. Częstym schorzeniem towarzyszącym POF jest choroba tarczycy oraz inne choroby autoimmunologiczne, które występują u ponad 20% kobiet z przedwczesnym wygasaniem czynności jajnika. POF może mieć również podłoże jatrogenne lub być związane z chorobą nowotworową.

U więcej niż połowy pacjentek z prawidłowym kariotypem 46,XX etiologia POF jest nieznana. Biopsja jajników, badanie USG oraz oznaczanie stężenia AMH wskazują na obecność i częściowy rozwój pęcherzyków (Taylor i wsp. 1996; Nelson i wsp. 2004). Osiągają one stadium pęcherzyka antralnego. Na tym etapie obserwuje się zmiany fenotypowe związane z deformacją *antrum*, obecnością komórek granulozy w płynie pęcherzykowym czy obecnością komórek luteinizujących ze zmienioną konsystencją cytoplazmy w obrazie mikroskopowym (Meduri i wsp. 2007). Takie pęcherzyki podlegają

masowej atrezji co prowadzi w konsekwencji do szybkiego wygasania rezerwy jajnikowej około 40 roku życia. Prawie 10% kobiet wchodzi w okres menopauzy w wieku 45 lat więc procesy poprzedzające całkowitą niewydolność rozrodczą mogą występować 10 lat wcześniej stąd już po 35 roku życia następuje radykalne zmniejszanie się rezerwy jajnikowej. Na obniżenie rezerwy jajnikowej i przedwczesne wygasanie czynności jajników mogą mieć również wpływ czynniki chorobowe takie jak na przykład endometrioza (Pawelczyk i wsp. 2008). W literaturze opisano przypadki powiązania czynnika genetycznego i zbliżonego czasu wygasania funkcji jajników u matki i córki oraz u siostry młodszej i starszej, co może mieć duże znaczenie w podjęciu decyzji o macierzyństwie po 30 roku życia (Szwed 2015).

Pierwotną niewydolność jajników charakteryzują objawy podobne jak przy menopauzie: uderzenia gorąca, trudności z koncentracją, bezsenność, wydłużające się cykle menstruacyjne aż do całkowitego ich ustania. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się podwyższony poziom FSH w porównaniu do kobiet normalnie owulujących w podobnym przedziale wiekowym oraz spadek poziomu estrogenów. Obserwuje się spontaniczne ciąże u kobiet z zaburzeniem prawidłowej folikulogenezy (Massin i wsp. 2004). Oszacowanie potencjału rozrodczego kobiet z POF za pomocą FSH czy estradiolu (E_2) nie jest wystarczająco dokładne. Satisfakcjonujący wynik, porównywalny z badaniem ultrasonograficznym AFC, zapewnia oznaczenie poziomu AMH (Durlinger i wsp. 2002; de Vet i wsp. 2002; van Rooji i wsp. 2005). Pewnym ograniczeniem oznaczenia pozostałej rezerwy jajnikowej u kobiet z POF za pomocą AMH jest liczba pozostałych pęcherzyków. Dokładny wynik badania AMH uzyskuje się w przypadku obecności więcej niż 15 pęcherzyków w histologii jajnika. Mniej niż 5 pęcherzyków, dla których wartość AMH (0,4 ng/ml) jest na granicy detekcji dla testu ELISA w systemie Elisa@Immunotech Beckman-Coulter. Zakres referencyjny w POF to $AMH < 1,0$ ng/ml. AMH wyrażony jest w pęcherzykach wtórnych oraz wybranych antralnych na różnym etapie rozwoju z kilkoma warstwami komórek granulozy o strukturze sześciianu. Metoda immunobarwienia wykazuje różnicę ekspresji AMH w komórkach ziarnistych pęcherzyków antralnych w POF w porównaniu z badaniem w grupie kontrolnej. W zaburzonych komórkach znakowany AMH widoczny jest w postaci skupionych ognisk podczas gdy w granulozie zdrowych pęcherzyków widoczne jest silne rozproszenie hormonu w cytoplazmie (Méduri i wsp. 2007).

Poziom stężenia AMH w osoczu wydaje się być satysfakcjonującym miernikiem wygasającej rezerwy jajnikowej i jest rekomendowany jako najbardziej wrażliwy marker w oznaczaniu rezerwy jajnikowej u kobiet z POF.

1.2.4. AMH jako marker PCOS

PCOS jest jedną z najczęstszych endokrynopatii przyczyniających się do zaburzeń związanych z rozrodczością. Według kryteriów europejskich tego typu dysfunkcja jajników, dotyczy 10-20% populacji kobiet (Fauser i wsp. 2012). Wobec podzielonych zdań dotyczących zaklasyfikowania różnorodnych symptomów do zespołu policystycznych jajników oraz braku jednoznacznych standardów, podczas konferencji w Rotterdamie w 2003 roku przyjęto regulacje według których diagnozuje się PCOS. Według nich w PCOS ocenia się rodzaj i stopień nasilenia objawów. Wśród nich należy wymienić obok regularnej menstruacji-zaburzenia miesiączkowania, hiperandrogenizm, obecność owulacji lub cykle bezowulacyjne, zwiększony stosunek LH do FSH, otyłość, insulinooporność czy hirsutyzm.

Szacuje się, że w Polsce PCOS występuje u ok. 4-10% kobiet w okresie rozrodczym (Banaszewska i wsp. 2008). Przyjęto, że hiperinsulinemia odgrywa znaczącą rolę w PCOS, bo dotyczy 50-60% badanych w porównaniu do 10-25% ogólnej populacji. Fluktuacje pojawiają się w zależności od masy ciała oraz typu sylwetki a nawet populacji, z której kobiety pochodzą. U kobiet z PCOS częściej występuje otyłość oraz aterogeny profil lipidowy co predysponuje do pojawienia się zespołu metabolicznego i podnosi ryzyko zachorowania na choroby niedokrwienne serca i układu krążenia oraz rozwój cukrzycy. PCOS jest zaburzeniem heterogennym z dużym udziałem czynnika genetycznego oraz wpływem komponenty środowiskowej. Udział ekspresji czynnika genetycznego w całkowitej wariancji cechy sięga 20-40% (Banaszewska i wsp. 2008; Foltyn i wsp. 2011; Fauser i wsp. 2012).

Aby ocenić wpływ metabolizmu węglowodanów na pojawienie się symptomów PCOS, zbadano geny odpowiadające za przemiany metaboliczne oraz steroidogenezę. Fakt nadmiernej ekspozycji oraz wyolbrzymionej wrażliwości na LH komórek osłonki, skutkuje podniesionym poziomem androstendionu, który przez interakcję parakrynną pomiędzy komórkami osłonki i ziarnistymi, jest substratem do konwersji estradiolu w komórkach granulozy (ryc.7.). W rezultacie obserwuje się podniesione poziomy obu steroidów z przewagą androgenów. Źródłem dysproporcji może być zaburzenie na poziomie zwiększonej ekspresji genu *CYP 17a*, hydroksylazy, P450 scc, receptorów dla LH oraz białek STAR regulujących steroidogenezę o natychmiastowym działaniu, odgrywających

zasadniczą rolę w procesie steroidogenezy. Zachodzące reakcje skutkują zmienionym fenotypowo obrazem jajników. Są one zwykle powiększone z charakterystycznymi torbielowatymi pęcherzykami położonymi podosłonkowo, w odróżnieniu od prawidłowych jajników, gdzie rekrutowane pęcherzyki przemieszczają się w stronę dobrze ukrwionego rdzenia jajnika. Zrąb jajnika charakteryzuje hiperplazja i można w nim znaleźć, obok komórek wnekowych charakterystycznych dla zrębu, komórki osłonki (drugorzędowe komórki osłonkowe), które mogą syntetyzować androgeny. Taki obraz gonad, często w powiązaniu z hiperandrogenizmem, obserwuje się u normalnie owulujących kobiet. Zmieniona morfologia jajników oraz odbiegający w różnym stopniu od normy profil hormonalny, kwalifikują pacjentkę do postawienia diagnozy PCOS. Sam obraz przerośniętych jajników nie oznacza zaburzenia endokrynnego. Podobnie prawidłowe stężenie androgenów w osoczu krwi nie wyklucza diagnozy PCOS, natomiast hirsutyzm w obrazie klinicznym nie musi świadczyć o PCOS lecz o wyższej aktywności α -reduktazy w mieszku włosowym.

Powyższe rozważania świadczą o złożoności występowania poszczególnych objawów i postawienia diagnozy PCOS, bowiem na pojawienie się zaburzenia ma wpływ różnorodność czynników, w tym również środowiskowe (McAllister i wsp. 2015). AMH jest dokładniejszym markerem w ocenie rezerwy jajnikowej oraz PCOS w porównaniu do standardowej ultrasonografii. W ocenie diagnostycznej PCOS praktykuje się połączenie obu narzędzi diagnostycznych AMH i AFC. Poziom AMH jest znacznie podwyższony w odniesieniu do prawidłowo funkcjonujących jajników. Osłonki tekalne pęcherzyków, produkując znaczne ilości androgenów (Gilling-Smith i wsp. 1994), mogą stymulować pęcherzyki do wzrostu, czego skutkiem jest podwyższona sekrecja AMH (Diamanti-Kandarakis i wsp. 2008). Przypuszcza się, że jego wysokie stężenia związane są ze stosunkowo dużą liczbą pęcherzyków antralnych, co potwierdza badanie ultrasonograficzne. Zmienność liczby pęcherzyków antralnych znajduje odzwierciedlenie w różnicach poziomu AMH (Fanchin i wsp. 2003; Broekmans i wsp. 2010; La Marca i wsp. 2011).

Według niektórych badaczy testosteron, podobnie jak hormon Anty-Müllerowski, dobrze diagnozuje PCOS (Cessar i wsp. 2014). W ocenie kondycji policystycznych jajników znajdują również zastosowanie takie markery jak: FSH, β -estradiol czy inhibina B, jednakże zmienność tych hormonów pomiędzy cyklami i podczas cyklu powoduje, że ich wartość diagnostyczna w ocenie PCOS jest dużo słabsza w porównaniu do AMH.

AMH wydaje się być stabilnym i niedocenionym biomarkerem kondycji jajników u kobiet w wieku rozrodczym oraz predyktorem zaburzeń związanych z ich nieprawidłowym funkcjonowaniem. W odniesieniu do powszechnie stosowanego miernika rezerwy jajnikowej - FSH, oznaczenie poziomu AMH pozwala na szybką diagnozę dysfunkcji w obrębie jajnika. Umożliwia to podjęcie wcześniejszego leczenia i zwiększenie szansy na potencjalne zajście w ciążę. FSH jako powszechnie stosowany w endokrynologii rozrodu marker, wydaje się być nie dość dokładnym, bo wrażliwym na fluktuacje środowiska wewnętrznego i zewnętrznego, wskaźnikiem kondycji rozrodczej kobiet, w przeciwieństwie do względnej stabilności AMH. Waga problemu oraz rosnący odsetek par zgłaszających zaburzenia płodności i niepłodność obligują do podjęcia wczesnych działań diagnostycznych, prozdrowotnych i edukacyjnych w celu poprawy tej niepokojącej sytuacji.

W aktualnej literaturze przedmiotu rzadko pojawiają się prace opisujące związek stężenia AMH i FSH z wiekiem, cechami oraz historią rozrodczości u kobiet z POF i PCOS (Lee i wsp. 2012; Lie Fong i wsp. 2012). Zbyt mało jest badań wyjaśniających w jakim stopniu czynniki środowiskowe i endokrynne mogą modulować zaburzenia płodności oraz niepłodność (Wang i wsp. 2009; Bragg i wsp. 2012; Kaczmarek 2014).

1.2.5. Molekularne i genetyczne aspekty występowania POF i PCOS

Występujące polimorfizmy i mutacje odpowiadają za wystąpienie odchyłeń związanych z funkcją rozrodu i płodnością. Badanie ich struktury i występowania nie było celem niniejszej pracy samym w sobie, jednak przedstawienie wpływu niektórych aberracji genetycznych i molekularnych na wystąpienie dysfunkcji jajników POF i PCOS stanowi uzupełnienie i ujęcie tematu niniejszej pracy w szerszym kontekście.

Do funkcjonalnych zaburzeń układu rozrodczego można zaliczyć mutacje w obrębie gonadotropiny FSH i receptora FSHR o strukturze dimerycznej. Mutacje dotyczące receptora FSHR, powodują strukturalne abberacje, co może powodować opóźnione dojrzewanie pęcherzyków czy zahamowanie ich wzrostu (Ledig i wsp. 2008). Jego aktywacja polegająca na zasadzie sprzężenia ujemnego, wymaga przyłączenia dwóch cząsteczek liganda w rejonie domeny zewnętrznej (Castagliola i wsp. 2005; Urizar i wsp. 2005). Receptor FSHR jest konstytucyjnie aktywny i należy do wysoce konserwatywnej subgrupy receptorów związanych z białkiem G (GPCR), które wykazują aktywność wobec braku liganda. Zbudowany jest on z 7 hydrofobowych domen transbłonowych

z ekstracellularną domeną z N-końcem, bogatą w leucynę i przyłączającą ligand w dwóch miejscach domeny zewnętrznej. Możliwość wystąpienia mutacji w obrębie domeny zewnętrznej nie musi być związana z wyłączeniem jego aktywności. Przyjmuje się, że FSHR może w pewnych okolicznościach funkcjonować bez konsekwencji zaistniałej mutacji jednak są to przypadki sporadyczne (Themmen i Huhtaniemi 2000). Obserwuje się również mutacje występujące w domenie transbłonowej (Vasart 2004). Mutacje występujące w rejonie receptora często odpowiadają za wystąpienia POF u kobiet w wieku rozrodczym. Delecja powodująca zmianę konformacji ektodomeny, może przyczynić się do częściowego lub całkowitego braku aktywności receptora (Vasart i wsp. 2004; Fan i Hendrikson 2005). Zamiana alaniny na walinę wywołuje zmianę konformacji receptora lub jego obrót i brak możliwości przyłączenia FSH. Być może, że mutacja wpływa na jakość glikozylacji FSHR, która warunkuje prawidłowe wiązanie liganda. Zaburzenie to skutkuje hypergonadotropową niewydolnością jajników i niesie ryzyko utraty zdolności do rozrodu (Aittomaki i wsp. 1995). U pacjentek z hypogonadyzmem hypogonadotropowym poziom AMH w odpowiedzi na FSH, może znacząco wahać się w zależności od stopnia dysfunkcji jajników z wiekiem (Bry-Gauillard i wsp. 2017). Badania laboratoryjne dowiodły, że FSH w stężeniu 5 lub 50 ng/ml blokuje sekrecję AMH w kulturach komórek ziarnistych pęcherzyków 3-5 mm, co zostało również potwierdzone w ludzkich komórkach granulocyty (Devailly i wsp. 2016). Niepoprawny sygnał transdukcji lub brak możliwości przyłączenia się liganda do domeny zewnętrznej, są powodem wystąpienia wczesnego bloku dojrzewania pęcherzyków i przedwczesnego wygaszenia funkcji rozrodczej. W takiej sytuacji jajniki charakteryzują liczne, małe pęcherzyki przypominające jajniki przed okresem menarche (Meduri i wsp. 2008).

Mutacje występujące w cząsteczce FSH również mogą być powodem wystąpienia POF. Mutacja punktowa w podjednostce β -FSH może być związana z obecnością kodonu STOP i wyłączeniem ważnej funkcji regulatorowej FSH w pętli sprzężenia, warunkującej prawidłowe funkcjonowanie osi płciowej. Skutkiem mutacji jest nieaktywna forma FSH pozbawiona aktywnego C-regionu w podjednostce β lub zmiana ramki odczytu, co skutkuje zaburzoną funkcją jajników oraz poważnymi niedoborami estrogenów, przyczyniając się do dysfunkcji ze strony układu rozrodczego i przedwczesnego wygaśnięcia zdolności do rozrodu (Matthews i wsp. 1993, Laymman i wsp. 1997).

Brak namnażania komórek ziarnistych w pęcherzykach, powoduje ich rekrutację i w konsekwencji zatrzymanie się na wczesnym stadium rozwoju, co w konsekwencji

przyczynia się do stopniowej ale wzmożonej atrezji. Kok i zespół (2004) potwierdzają, że obraz fenotypowy mutacji zachodzących w genie kodującym FSHR jest częstą przyczyną przedwczesnej utraty zdolności rozrodczej wskutek wyczerpania rezerwy jajnikowej (POF).

Jedną z przyczyn przedwczesnego wygasania czynności jajników (POF) może być zaburzenie związane z receptorem AMHR, występującym w dwóch wariantach genetycznych. Aktywność receptora reguluje wrażliwość pęcherzyków jajnikowych na FSH. Polimorfizm receptora AMHR2 - 482 A>G jest częściej obecny u kobiet z prawidłową czynnością jajników. Drugi wariant AMHR-482 G/G predysponuje do wystąpienia wcześniejszej menopauzy ze względu na szybszą utratę pęcherzyków jajnikowych w kolejnych cyklach, w odniesieniu do grupy kobiet ze wzorem mutacji A/A. Brak hamującej roli AMH, wskutek wystąpienia polimorfizmu receptora AMHR2, zaburza racjonalną gospodarkę zasobem pęcherzyków preantralnych i małych antralnych. Może to skutkować przedwczesną utratą zdolności rozrodczej (POF). Zjawisko to zbadał i opisał Kevenaar z zespołem (2007).

Istotną rolę w podczas folikulogenezy pełni enzym aromataza, który odpowiada za konwersję androgenów do estrogenów w komórkach ziarnistych. Badania potwierdziły, że AMH wpływa na redukcję mRNA związanego z ekspresją aromatazy poprzez blokowanie cyklicznego AMP, co prowadzi do zmniejszenia aktywności estrogenów w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych. We wcześniejszych badaniach wskazywano na wzrost atrezji pęcherzyków spowodowany zaburzeniem związanym z nadmierną ich ekspozycją na androgeny. Obecnie wskazuje się raczej na ich regulatorowy wpływ na komórki ziarniste pęcherzyków będących w stadium preantralnym i wczesnym antralnym, Androgeny stymulują ekspresję genów receptorów dla FSH (FSHR) na wczesnym etapie folikulogenezy (Lebbe i Woodruff, 2013). Badania prowadzone na małpach dotyczące androgenów i receptora AR w aparacie pęcherzykowym, wykazały wzrost proliferacji komórek ziarnistych oraz tekalnych po podaniu testosteronu i dihydrotestosteronu (DHT) (Vendola i wsp. 1998) Obserwacje te zostały potwierdzone przez innych badaczy, którzy udowodnili, że deficyt receptorów AR w stadium pęcherzyka preantralnego i małego antralnego, wpływa na obniżoną sprawność folikulogenezy i zmniejszą szansę wystąpienia prawidłowej owulacji, co w konsekwencji może prowadzić do wystąpienia POF, co zostało potwierdzone również u ludzi (Hu i wsp. 2004, Shiina i wsp. 2006; Catteau-Jonard i wsp. 2008).

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest dysfunkcją o różnym stopniu nasilenia objawów, związanych z zaburzeniem morfologii oraz równowagi hormonalnej. Przekłada się to na szereg reakcji molekularnych zachodzących w aparacie pęcherzykowym jajników kobiet z PCOS. Głównym efektem tych nieprawidłowości jest zwiększona czynność warstwy tekalnej pęcherzyka, która pod wpływem luteotropiny (LH) odpowiada za zwiększoną sekrecję androgenów. W konsekwencji zaburzeniu ulega system zależności i sprzężeń pomiędzy czynnikami regulującymi prawidłową folikulogenezę i cykl menstruacyjny. Patogeneza PCOS u kobiet w wieku rozrodczym związana jest z wpływem określonych czynników genetycznych i środowiskowych, które determinują szlak reakcji molekularnych. Najbardziej istotna w PCOS wydaje się być determinanta genetyczna (Vink i wsp. 2006, Urbanek 2007).

Interesujące wyniki otrzymał Stubbs z zespołem (2005). Przeprowadził on badanie dotyczące tranzykcji pęcherzyków na wczesnym etapie folikulogenezy u kobiet z PCOS i w grupie kontrolnej. Istotnie więcej wybarwionego AMH znaleziono w niektórych pęcherzykach primordialnych i pierwotnych u kobiet z dysfunkcją jajników z cyklami bezowulacyjnymi, które stwierdzono na podstawie wysokich wartości stężenia AMH oraz w grupie z prawidłowo przebiegającą owulacją (Stubbs i wsp. 2005). Wynik nie różnił się istotnie w obu grupach podobnie jak obserwacja pęcherzyków w stadium pre- i małym antralnym, gdzie intensywność wybarwienia okazała się większa ale podobna w obu grupach. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że prezentowana we wczesnej folikulogenezie obecność AMH, w mniejszym stopniu wpływa na inhibicję wzrastania pęcherzyków, szczególnie w grupie z cyklem bezowulacyjnym, co skutkuje szybszą i efektywniejszą rekrutacją do stadium pęcherzyka, w którym sekrecja AMH ma miejsce w stopniu najwyższym. Powoduje to szybkie nagromadzenie pęcherzyków i wzrost stężenia AMH, co utrudnia bądź uniemożliwia dalszy etap rekrutacji podczas folikulogenezy, przyczyniając się do wystąpienia PCOS i zaburzeń rozrodczości (Maciel i wsp. 2004). Wykazano również, że podniesiony poziom androgenów może przyspieszyć rekrutację pęcherzyków na wczesnym etapie ich rozwoju (Vendola i wsp. 1998). Implikacje obejmujące nieprawidłowe funkcjonowanie jajników u kobiet z PCOS, znakomicie obrazują markery AMH i FSH. Zaburzenie prawidłowej funkcji jajników może współwystępować z nadekspresją receptorów androgenowych (AR), co prowadzi do fizjopatologii związanej z obecnością nadmiernej liczby rekrutowanych pęcherzyków. Powoduje to ich nagromadzenie i zwiększoną sekrecję AMH oraz androgenów w komórkach osłonki oraz

ziarnistych otaczających oocyt (Catteau-Jonard i wsp. 2008, Lebbe i Woodruff, 2013). Kousteni z zespołem dowodzą, że androgeny blokują fizjologiczną atreję nagromadzonych pęcherzyków (Kousteni i wsp. 2001). Zwiększone stężenie AMH wpływa na zmniejszenie ekspresji FSHR oraz spowalnia i blokuje dalsze etapy dojrzewania pęcherzyków podczas folikulogenezy. Pęcherzyki rzadziej podlegają rekrutacji do stadium pęcherzyka dominującego i tworzą nieregularne skupiska w warstwie korowej jajnika, przyczyniając się do zaburzeń funkcjonowania osi płciowej podwzgórze-przysadka-jajniki jak na przykład hyperandrogenizm (Maciel i wsp. 2004, Pellat 2011). Badanie przeprowadzone przez Carlsena i współpracowników nie potwierdziło jasnej zależności pomiędzy androgenami a AMH. Grupie kobiet z PCOS podawano przez 6 miesięcy androgeny. Uzyskane wyniki badań nie wskazały na istotną zależność pomiędzy obserwowanymi hormonami co pozwala wnioskować, że być może istnieje inny mechanizm regulatorowy związany z ekspresją AMH u kobiet z policystycznymi jajnikami. Obserwacja kultur ludzkich komórek ziarnistych wykazała, że w pęcherzykach 2-10 mm u kobiet z PCOS zaobserwowano blisko 50% inhibicji sekrecji AMH pod wpływem FSH w odróżnieniu od kontroli (Pellatt i wsp. 2007). Podobny wynik, ale już w pęcherzykach 8-10 mm, otrzymał Li (Li i wsp. 2011).

Badania ekspresji genów AMH oraz receptora AMHR-II o aktywności serynowo-treoninowej, potwierdziły wpływ FSH na regulację prawidłowego stężenia AMH podczas folikulogenezy u kobiet z PCOS (La Marca i Volp, 2006; Andersen i wsp. 2010; Jeppesen i wsp. 2013). Najwyższe stężenie oznaczono w FSH-zależnych pęcherzykach pre- i małych antralnych, których kumulacja w policystycznych jajnikach prowadzi do zaburzeń płodności. Poziom AMH u kobiet z PCOS różni się w zależności od tego, czy wystąpiła owulacja podczas cyklu menstruacyjnego, czy też są to cykle bezowulacyjne. Das i współpracownicy wykazali, że u kobiet z cyklem bezowulacyjnym poziom AMH może być kilku- a nawet kilkunastokrotnie wyższy niż u kobiet z PCOS z prawidłowo występującą owulacją (Das i wsp. 2008). Różnica w stężeniach może być kilkudziesięciokrotnie większa u kobiet z zaburzeniem gdzie brak jest owulacji w porównaniu do kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami (Pellatt i wsp. 2010). Podobną zależność wykazano w odniesieniu do ekspresji receptorów AMHR-II (Pierre i wsp. 2013). Aby lepiej zrozumieć interakcje genetyczne odpowiadające za wystąpienie PCOS zbadano receptor ALK2 oraz gen kodujący *acv1*. Czynniki te biorą udział w kaskadzie sygnałnej dla AMH. Wynik wykazał istotną zależność pomiędzy genetycznym wariantem *acv1* i ALK a nadekspresją AMH i wystąpieniem PCOS (Kevenaar i wsp. 2009).

2. CEL PRACY, ZADANIA i HIPOTEZY BADAWCZE

Ze względu na wskazane braki w dotychczasowej wiedzy o zmienności poziomu AMH i FSH, zarówno u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami jak i z dysfunkcją jajników, podjęto próbę uzupełnienia tej luki. Jak dotąd nie opisano jeszcze związku AMH i FSH z cechami okresu rozrodczości i cechami somatycznymi u kobiet z POF i PCOS, dlatego podjęcie tego problemu ma na celu nie tylko poszerzenie wiedzy ale także rekomenduję wykorzystanie wyników badań w praktyce klinicznej biologii rozrodu.

Celem pracy jest **określenie fizjologicznej zmienności stężenia hormonów AMH i FSH u kobiet w wieku rozrodczym, u których jajniki nie funkcjonują prawidłowo i kobiet z prawidłową funkcją jajników**, a w szczególności zrealizowanie zadań badawczych polegających na:

1. Wyznaczeniu wartości przeciętnych stężeń AMH i FSH w surowicy krwi w zależności od wieku chronologicznego kobiet z POF i PCOS na tle kobiet z prawidłową funkcją jajników.
2. Zbadaniu czynników potencjalnie różnicujących poziom stężeń AMH i FSH w wymienionych grupach kobiet takich jak: cechy cyklu płciowego, okresu rozrodczości, somatyczne i związane z elementami stylu życia.

W pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza 1

U kobiet z POF w okresie rozrodczości poziom surowiczego stężenia AMH jest niższy a FSH jest wyższy w odniesieniu do wieku chronologicznego i fizjologicznej normy.

Hipoteza 2

U kobiet z PCOS w okresie rozrodczości poziom surowiczego stężenia AMH jest wyższy a FSH jest niższy w odniesieniu do wieku chronologicznego i fizjologicznej normy.

Hipoteza 3

Cechy okresu rozrodczości różnicują poziom surowiczego stężenia AMH i FSH niezależnie od funkcjonowania jajników.

3. MATERIAŁ i METODY

3.1. Charakterystyka próby badawczej. Organizacja badań

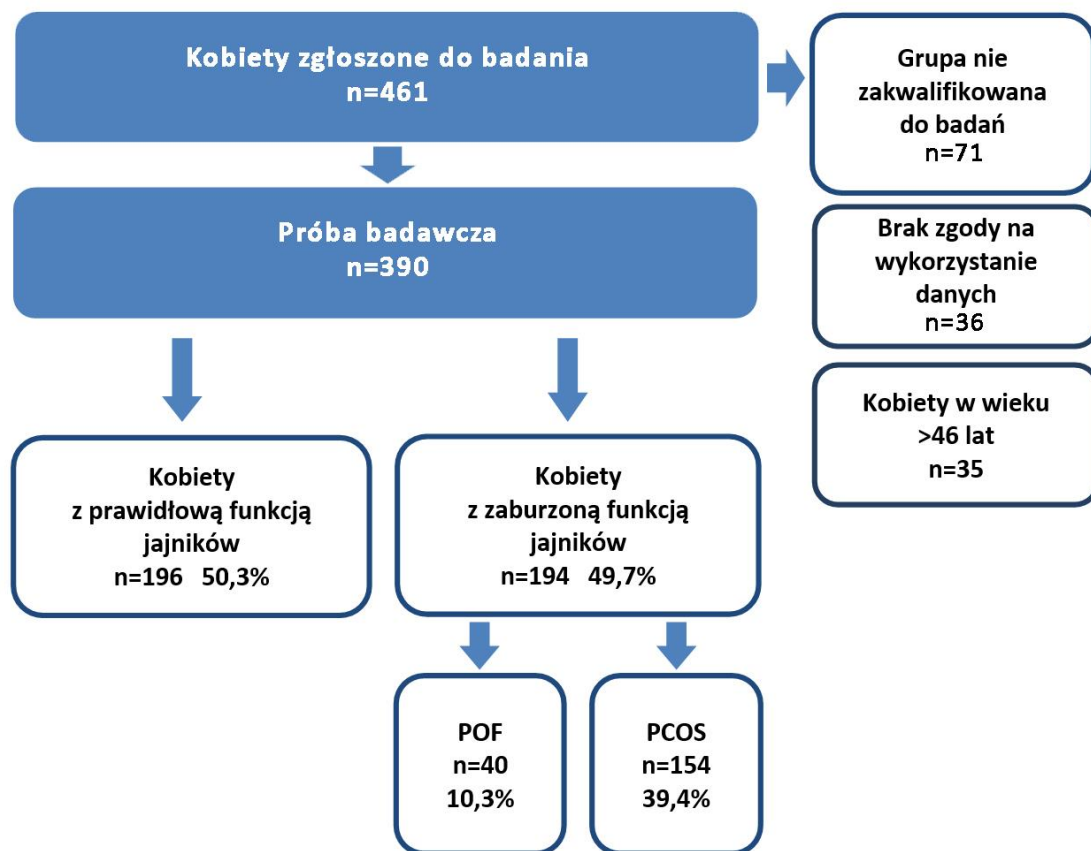
W pracy podjęto próbę analizy zmienności AMH i FSH u kobiet w wieku rozrodczym z nieprawidłową funkcją jajników na tle grupy kontrolnej. Przyjęto dwa poziomy analizy zróżnicowania biologicznego: osobniczy (wiek, cykl płciowy, cechy somatyczne) i międzyosobniczy z uwzględnieniem wybranych czynników stylu życia.

Badania przeprowadzono w okresie od lipca 2015 do maja 2016 roku w Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu GPSK UM oraz w Europejskim Centrum Macierzyństwa InviMed we Wrocławiu. Przyjęto założenie, że podjęcie pracy badawczej w dwóch, niezależnych ośrodkach klinicznych zwiększa rangę uzyskanych wyników.

Kryterium doboru kobiet do próby było spełnienie następujących warunków: wiek od 18 lat do 46 lat, brak leczenia ogólnego przez jeden miesiąc przed badaniem, niestosowanie środków hormonalnych, nietknięte jajniki i macica. Kobiety wzięły dobrowolny udział w badaniu, odpowiadając na zaproszenie do badań podczas rejestracji, w którym zawarto informację o celu i charakterze badań wraz z instrukcją sposobu wypełnienia dołączonej ankiety. Na zaproszenie odpowiedziało łącznie 461 kobiet (ryc. 11.).

Podczas wstępnej weryfikacji 71 wolontariuszek nie przystąpiło do badań ze względu na brak zgody na wykorzystanie danych (n=36) oraz przekroczenie przyjętego w niniejszej pracy progu wieku 46 lat (n=35). Schemat organizacji próby badawczej przedstawia rycina 8. Do badań zakwalifikowano 390 kobiet. Grupę badaną stanowiły łącznie 194 kobiet z nieprawidłowo funkcjonującymi jajnikami z czego u 40 badanych zdiagnozowano POF a 154 kobiety wykazywały symptomy PCOS. Grupę kontrolną stanowiło 196 kobiet.

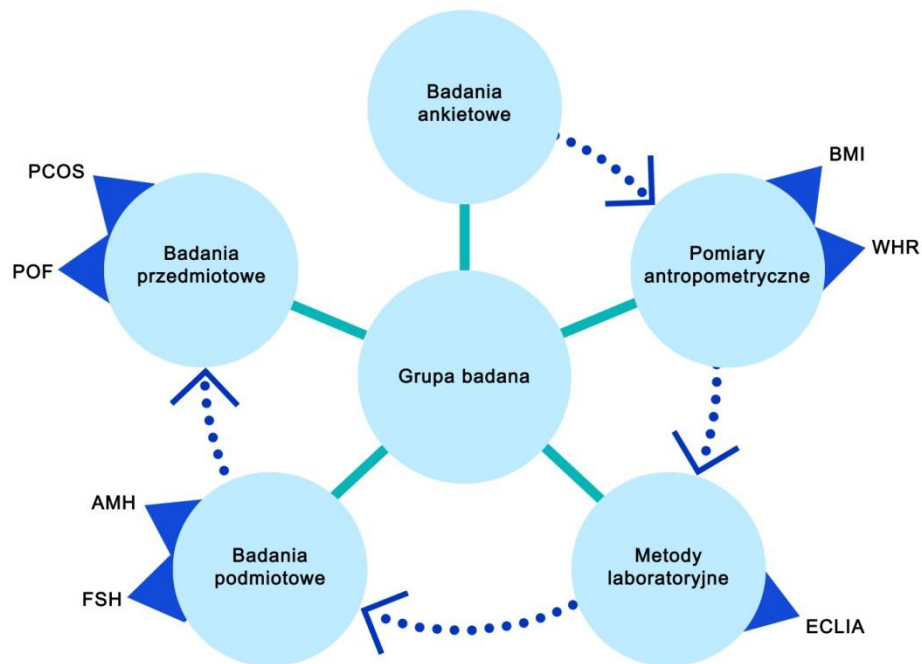
Wolontariuszki zapoznały się z instrukcją wypełnienia załączonego kwestionariusza ankietowego oraz poinformowano, że praca doktorska zrealizowana na bazie materiału zebranego dzięki ich udziałowi oraz uprzejmości zespołu i Dyrektor Kliniki InviMed we Wrocławiu oraz Dyrektora Kliniki Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu GPSK UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, przyczyni się do zaktualizowania wiedzy na temat wpływu czynników wewnętrznych oraz środowiskowych na potencjał rozrodczy kobiet. Zgodnie z Deklaracją Helsińską (1964) zmodyfikowaną po raz ostatni w 2013 roku, badane pacjentki wypełniły deklaracje zgody na udział w badaniach oraz udostępnienie wyników badań do celów naukowych. Projekt badawczy uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej.



Ryc. 11. Diagram ilustrujący dobór próby do badań, kryteria wykluczenia i liczebność badanych kobiet.

Grupę podzielono na trzy kohorty wiekowe: 23-30, 31-35 i 36-46 lat. W oparciu o diagnozę lekarską wydzielono trzy grupy kobiet o różnych statusach funkcjonowania jajników: prawidłowy, POF, PCOS.

W pierwszym etapie badań zastosowano metody kwestionariuszowe i wykonano pomiary antropometryczne. Za pomocą metod laboratoryjnych oznaczono poziomy AMH i FSH, które stanowiły podstawę do dalszych badań przedmiotowych. Oznaczenia poziomów hormonów zostały przeprowadzone w laboratoriach Kliniki Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu GPSK UM w Poznaniu oraz w Europejskim Centrum Macierzyństwa InviMed we Wrocławiu. Schemat przeprowadzonych badań przedstawia rycina 12.



Ryc. 12. Metody zastosowane w badaniach.

Pozyskane dane pozwoliły podjąć realizację badania przedmiotowego, które dotyczyło trzech kategorii funkcjonowania jajników: Prawidłowy, POF i PCOS i zastosowania przyjętego wskaźnika - poziomu AMH w surowicy krwi w referencyjnym zakresie dla kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników: 1,0-3,2 [ng/ml] oraz przyjmującym wartości dla POF $< 1,0$ [ng/ml] oraz PCOS $> 3,2$ [ng/ml].

Podjęta w dalszej pracy analiza statystyczna przedstawia szczegółowy przekrój stężenia hormonów dla kobiet z prawidłową i zaburzoną funkcją jajników w korelacji z takimi czynnikami jak: wiek, cechy okresu rozrodczości, historia rozrodczości, cechy somatyczne oraz aktywność fizyczna

3.2. Zastosowane metody badania

3.2.1. Kwestionariusz ankietowy

Po wyrażeniu zgody na przystąpienie do badań, kobiety otrzymały kwestionariusz ankietowy wraz z dokładną instrukcją wyjaśniającą pytania, które mogłyby budzić wątpliwości lub sprawiać trudność. Kobiety odpowiadały na pytania dotyczące statusu socjoekonomicznego oraz cech cyklu menstruacyjnego i historii rozrodczości. Postawiono również pytania dotyczące aktywności fizycznej, która wg. najnowszych wytycznych WHO uwzględnia także aktywność związaną z codzienną egzystencją ocenianą w siedmiodniowym interwale czasoprzestrzennym (Biernat 2015). W ankiecie uwzględniono również zmienne stylu życia takie jak palenie papierosów oraz ocenę kondycji psychofizycznej według skali depresji Becka (Beck i wsp. 1961). Odpowiedzi na pytania zawarte w kwestionariuszu ankietowym uzupełniły bazę danych, będącą podstawą do poszczególnych analiz w grupie badanych kobiet.

Metryczka zawiera podstawowe pytania opisujące grupę badawczą. Kobiety udzieliły informacji zakreslając lub wpisując liczbę w odpowiedzi na pytanie zawarte w kwestionariuszu ankietowym, które przedstawiono w ramce 1. Zebrane dane umożliwiły dokonanie podstawowej charakterystyki grupy badawczej i w dalszym etapie badań, ocenę zależności pomiędzy zmiennymi socjoekonomicznymi a zmiennością badanych hormonów AMH i FSH pod kontrolą wieku.

Do oceny kondycji rozrodczej kobiet, która jest głównym zagadnieniem analizowanym w niniejszej pracy, wykorzystano pytania ankietowe dotyczące historii okresu rozrodczego. Kwestionariusz obejmuje dwa wymiary badań: cechy cyklu menstruacyjnego oraz historię rozrodczości (ramka 2). Ze względu na delikatny charakter badanego zagadnienia, respondentki uprzedzono o możliwości przejścia do kolejnego pytania w razie kłopotliwej sytuacji związanej z podejmowaną problematyką.

W celu zbadania aktywności fizycznej w grupie badanych kobiet przyjęto kryteria według skróconej, polskiej wersji Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ). Aby ocenić poziom aktywności kobiet, przyjęto rekomendowane przez Biernat i zespół - jednostki MET (Biernat i wsp. 2007).

Ramka 1. Charakterystyki demograficzne i socjoekonomiczne zastosowane w pracy wraz z kategoriami

Cecha	Kategorie
Wiek (w latach)	23-30; 31-35; 36-46
Wykształcenie	1.Wyższe; 2.licencjat; 3.średnie; 4.zawodowe; 5.podstawowe
Stan cywilny	1.Zamężna; 2.z partnerem; 3.powtórnie zamężna; 4.wdowa; 5.w separacji; 6.rozwiedziona; 7.panna
Miejsce zamieszkania	1.Wieś; 2.małe miasto; 3.średnie miasto; 4.duże miasto; 5.bardzo duże miasto

Zastosowany system sumowania wydatkowanej energii podczas tygodniowej aktywności związanej z codziennymi czynnościami jak: chodzenie, praca fizyczna czy podejmowanie aktywności ruchowej w stopniu intensywnym bądź umiarkowanym, pozwolił ocenić faktyczną aktywność fizyczną wśród badanych kobiet.. Przyjęte kryteria dla zastosowane jednostki wydatkowania energii MET przedstawiono w ramce 3.

Dane dotyczące palenia papierosów uzyskano dzięki odpowiedziom na pytania zawarte w kwestionariuszu GATS, dotyczącym używania tytoniu przez osoby dorosłe i rekomendowanym do badań przez WHO oraz Ministerstwo Zdrowia (Blanke i da Costa e Silva 2004). Udzielone przez kobiety odpowiedzi pozwoliły określić czy i w jakim stopniu palenie papierosów wpłynęło na zaburzenia płodności w badanej grupie kobiet w wieku rozrodczym.

W celu zbadania kondycji psychofizycznej kobiet posłużono się kwestionariuszem BDI (*Beck Depression Inventory*) według Aarona Becka (ramka 4). Zastosowano polską wersję BDI w tłumaczeniu Parnowskiego i Jernajczyka (1977), w którym zawarto 21 pytań dotyczących ryzyka występowania depresji.

Ramka 2. Klasyfikacja cech historii okresu rozrodczego analizowanych w pracy.

Cecha	Kategorie
Wiek pierwszej miesiączki	1.Mniej niż 12 lat; 2.12-14 lat; 3.więcej niż 14 lat
Długość cyklu miesiączkowego	1.Krócej niż 28 dni; 2. 28-32 dni; 3.dłużej niż 32 dni; 4. inne
Regularność miesiączki	Tak; nie
Symptomy zbliżającej się menstruacji	1.Wrażliwość piersi; 2.rozdrażnienie/zły nastój; 3.bóle głowy; 4.wzdęcia; 5.skurcze w dole brzucha; 6. inne/jakie?
Bolesność miesiączki	Tak; nie
Symptomy trwającej menstruacji	1.Nudności; 2.bóle krzyża; 3.osłabienie; 4.biegunki; 5.zmiana apetytu; 6. inne
Inne symptomy trwającej menstruacji	1.Bóle głowy; 2.skurcze w dole brzucha; 3.wzmożona potliwość; 4.zmiany nastroju; 5.bóle mięśniowe
Ciąża	Tak; nie
Wiek pierwszej ciąży	Lata
Wiek urodzenia pierwszego dziecka	Lata
Nigdy nie rodziła	Nigdy nie rodziłam
Poronienia	Tak; nie
Liczba poronień	Liczba
Wiek poronienia	Lata

Ramka 3. Kategoryzacja stopnia aktywności fizycznej wyrażonej w jednostkach MET.

Aktywność fizyczna	Wydatek energetyczny/tydzień
Niewystarczająca	<600 MET
Wystarczająca	600-1500 MET >1500 MET Założenia: minimum 3 dni intensywnej aktywności fizycznej przez 20 minut dziennie/minimum 5 dni umiarkowanej aktywności przez 30 minut/ minimum 30 minut codziennej aktywności w stopniu umiarkowanym. Dopuszczalne są kombinacje powyższych aktywności.

1 MET = 3,5 ilość zużytego O₂ na kg masy ciała będącego w spoczynku.
 Otrzymane wyniki zinterpretowano według zaleceń WHO i American College of Sport Medicine (WHO 2010, Haskell i wsp. 2007)

Kobiety odpowiadały samodzielnie, zakreślając właściwe pola. Samoocena według skali depresji Becka jest popularnym narzędziem diagnostycznym, jednak posiada pewne ograniczenia ze względu na pewną nieaktualność w odniesieniu do kryteriów zaleconych przez American Psychiatric Association (2013). Skala depresji Becka zawiera cztery możliwe odpowiedzi, ze wzrastającym liniowo nasileniem objawów i punktacją, służącą podsumowaniu wyników testu. Oceny kondycji psychicznej według BDI dokonano na podstawie symptomów zaobserwowanych przez badane kobiety w ciągu 4 minionych tygodni (Back i wsp. 1961).

Ramka 4. Kategoryzacja kryteriów oceny kondycji psychicznej według kwestionariusza BDI.

Skala	Ocena wg. BDI
0-11	Bez depresji
12-26	Łagodna depresja
27-49	Umiarkowanie ciężka depresja
50-63	Bardzo ciężka depresja

3.2.2. Analizy laboratoryjne

Technika oznaczania stężenia hormonów we krwi polega na zastosowaniu metod immunologicznych. Zastosowaną metodę ECLIA charakteryzuje wysoka specyficzność, czułość i dokładność w odniesieniu do innych stosowanych testów. Podstawą powyższej metody jest reakcja antygenu (hormonu) ze swoistym przeciwciałem.



Równowaga powstałego kompleksu jest dynamiczna, ponieważ składowe stale dysocjują i łączą się. Przeciwciała wysokiej swoistości, stosowane w metodach immunologicznych mają tendencję do przesunięcia równowagi reakcji w prawo (Brook, Marshal 2000). Zasada metody immunometrycznej typu "kanapkowego" została zastosowana również do badania podmiotowego dla AMH i FSH w niniejszej pracy. Proces oznaczania stężenia hormonów jest w pełni zautomatyzowany (www.gpsk.ump.edu.pl).

Pobranie materiału

Przedmiotem analizy ilościowej jest surowica krwi. W celu oznaczenia profili AMH i FSH pobrano jednokrotnie próbkę krwi w warunkach ambulatoryjny z restrykcyjnym zachowaniem odpowiedniej procedury w odniesieniu do FSH. Ze względu na sprzężenie z osią płciową FSH został oznaczony z próby krwi pobranej według następującego standardu: w godzinach porannych, na czczo, w 2-3 dniu cyklu menstruacyjnego. Materiał do zbadania poziomu hormonu Anty-Müllerowskiego może być pobrany niezależnie od pory dnia i dnia cyklu, ze względu na brak sprzężenia z osią płciową. Może być realnie oznaczany również u pacjentek stosujących hormonalną antykoncepcję.

AMH i FSH – metodyka oznaczania.

Do ilościowego oznaczanie AMH i FSH w surowicy krwi wykorzystano analizator Cobas e601 firmy Roche Diagnostic. Jest to jedno z najnowszych i najbardziej zaawansowanych technologicznie urządzeń do analiz laboratoryjnych na rynku (Gassner et al. 2014). Do odczytu wyników zastosowano metodę ECLIA, w której po przyłożeniu napięcia zmierzono emisję wzburzonych fotonów za pomocą fotopowielacza. Jest to metoda niekompetycyjna z zastosowaniem nadmiaru przeciwciał. Na powierzchni platynowej elektrody, wskutek szeregu reakcji typu „sandwich” dochodzi do powstania wolnych rodników, które po wzbudzeniu elektrycznym odpowiadają za reakcję chemiluminescencji i emisję fotonów, której wartość jest zmierzona za pomocą fotopowielacza.

Procedura pomiarowa dla AMH i FSH:

1. Inkubacja próbki z kompleksem typu „sandwich” z biotylowanymi przeciwciałami skierowanymi przeciw AMH/FSH oraz znakowanym monoklonalnymi przeciwciałami swoistymi dla AMH/FSH - kompleksem rutenu –Tris.
2. Inkubacja kompleksu typu „sandwich” z mikrocząsteczkami opłaszczonymi streptawidyną. Powinowactwo biotyny i streptawidyny umożliwia wytrącenie fazy stałej.
3. Umieszczenie mieszaniny w komorze pomiarowej, gdzie za pomocą magnesu cząsteczki są przyciągane do powierzchni elektrody.

4. Usunięcie niezwiązanych substancji i dodanie ProCell zawierającego trójpropyloaminę (TPA). Po przyłożeniu napięcia do elektrody platynowej następuje reakcja utleniania i redukcji rutenu, znacznika kompleksów immunologicznych. Niestabilny rodnik TPA przeprowadza kompleks rutenu w stan wzbudzenia, który powraca do stanu podstawowego z efektem luminescencji.
5. Odczyt emisji światła o długości fali 600 nm na podstawie krzywej kalibracyjnej, ustalonej dla każdego analizatora indywidualnie oraz krzywej wzorcowej oznaczonej na odczynniku.

Zakres pomiaru stężenia AMH: 0,01-23,00 ng/ml. Dla FSH: 0,100-200,0 mIU/ml.

3.2.3. Metody oceny budowy somatycznej

Podstawowymi parametrami opisującymi wielkość ciała jest wysokość i masa ciała. Pomiar antropometryczny przeprowadzono stosując standardowe procedury: wyprostowana postawa ciała z nogami w lekkim rozkroku z wyprostowanymi kolanami i swobodnie opuszczonymi wzdłuż ciała rękami. Głowa badanych kobiet podczas pomiarów utrzymywana była w pozycji frankfurckiej, która polega na równoległym w stosunku do podłoża, ułożeniu głowy w płaszczyźnie poziomej uszno-ocznej. Linia pozioma przechodzi przez dolną krawędź oczodołu i górną część otworu słuchowego (Martin i Saller 1957; Cieślak i wsp. 1994; Kaczmarek i Wolański 2018). Wysokość zmierzono na podstawie odległości od punktu *vertex*, najwyższego punktu na czaszce i podstawy (*basis*), na której stoi badana. Do pomiaru użyto antropometru GMP (Gneupel Praezisions Mechanik) z dokładnością do 1mm. Do pomiarów kobiety przystępowały w lekkim, swobodnym stroju, na bosy. Masę ciała zbadano przy użyciu elektronicznej, wystandaryzowanej wagi Radwag WPT 60/150 o (dokładność pomiaru 50g). Pozycja w lekkim rozkroku, umożliwiała równomierne rozłożenie masy ciała na obie stopy i uzyskanie poprawnych wyników. Pomiar wykonano dwukrotnie lub trzykrotnie w przypadku, jeśli drugi wynik był niezgodny z pierwszym pomiarem. Uzyskane pomiary wysokości i masy ciała, pozwoliły wyznaczyć wskaźnik BMI w grupie badanych kobiet.

Wskaźnik BMI jest szeroko rozpowszechnioną metodą służącą do wstępnej oceny masy ciała po względem obecności tkanki tłuszczowej. Pomimo dużej schematyczności, oznaczenie indeksu BMI [kg/m^2] jest działaniem podstawowym w rozpoznaniu nadwagi czy

też otyłości w obserwowanych populacjach. Według wytycznych WHO wyznaczono standardowe zakresy dla oznaczania stopnia otyłości w praktyce klinicznej (WHO 2000, James 2008). Normy dla poszczególnych kategorii dotyczą osób dorosłych powyżej 18 roku życia i przedstawiono je w ramce 5. W utworzonej bazie danych uwzględniono dwa stopnie klasyfikacji otyłości jednak ze względu na małą liczebność próby w wymienionych podklasach i poprawienie mocy statystycznej wyniku – kobiety z BMI $\geq 25,0$ połączono i zaklasyfikowano do wspólnej kategorii: Otyłość/nadwaga.

Ramka 5. Kategorie BMI według wytycznych WHO (1997)

Kategoria	BMI [kg/m ²]
Niedowaga	< 18,5
Norma	18,5-24,9
Nadwaga (Przedotyłość)	25,0–29,9
Otyłość Io	30,0–34,9
Otyłość IIo	35,0–39,9
Otyłość IIIo	≥ 40

Wskaźnik WHR jest narzędziem do oceny typu otyłości ciała na podstawie dystrybucji tkanki tłuszczowej. Wykonano pomiar obwodów talii do bioder [cm] (Szymocha i wsp. 2009). Za pomocą miary antropometrycznej przyłożonej w płaszczyźnie poprzecznej, równoległej do podłogi, zmierzono obwody ciała: pasa i biodra. Pomiarów obwodu pasa dokonano w chwilowym bezdechu w połowie odległości pomiędzy dolnym brzegiem łuku żebrowego a górnym brzegiem grzebienia kości biodrowej. Linię obwodu bioder wyznaczała wysokość spojenia łonowego. Każdy z pomiarów wykonano dwu- lub trzykrotnie w celu wyeliminowania błędu pomiaru. Analizę przeprowadzono na podstawie kryteriów przyjętych przez Międzynarodową Federację Diabetologiczną (IDF, International Diabetes Federation), które przedstawia ramka 6. (Alberti i wsp. 2006).

Ramka 6. Kryteria oceny typu dystrybucji tkanki tłuszczowej u kobiet na podstawie wskaźnika WHR (Alberti i wsp. 2006).

Typ otłuszczenia /kobiety	Wartość wskaźnika
WHR	Androidalny $\geq 0,85 \geq 1,0$ (wisceralno-brzuszy) Gynoidalny $< 0,85 < 1,0$ (udowo-pośladkowy)

Wskaźnik ogólnego otłuszczenia (BF%) określono za pomocą algorytmów wykorzystujących pomiary grubości fałdów skórno-tłuszczowych (ramka 7). Pomiary wykonano za pomocą fałdomierza Falaya z dokładnością pomiaru do 0,1mm w trzech punktach pomiarów: tylna powierzchnia ramienia, nad mięśniem trójgłowym, pod dolnym kątem łopatki w pionowej płaszczyźnie oraz na brzuchu w $\frac{1}{4}$ odległości pomiędzy pępkiem a kolcem biodrowym (Kaczmarek i Wolański, 2018). Wskaźnik BF% obliczono na podstawie wzoru według Deurenberg i wsp. (1991).

$$BF\% = 1.2 \times BMI + 0.23 \times \text{wiek} - 10.8 \times \text{płeć}^* - 5.4$$

Do oceny stopnia ogólnego otłuszczenia ciała w badanej grupie kobiet zastosowano rekomendowaną przez WHO klasyfikację według Gallaghera, która obok BMI jest uznawana za złoty standard w oznaczaniu otyłości (Shahab i Kouzekanani 2016).

Ramka 7. Kryteria oceny ogólnego otłuszczenia u kobiet według klasyfikacji Gallaghery i wsp. (2000).

Kategoria	Wiek w latach		
	20-39	40-59	60 ≤
		%	
Niedowaga	< 21,0	<23,0	<25,0
Norma	21,0-32,9	23,00-34,9	25,00-37,9
Nadwaga	33,0–38,9	35,00-40,9	38,00-42,9
Otyłość	≥39,00	≥41,00	≥43,00

3.2.4. Metody opracowania danych statystycznych

Dane uzyskane z badań poddano analizie statystycznej w pakiecie programów statystycznych STATISTICA 13.3 (StatSoft, Inc., 2014).

Statystyka opisowa została obliczona dla danych demograficznych, poziomów hormonów, cech reprodukcyjnych oraz zachowań związanych ze zdrowiem psychicznym i aktywnością fizyczną. Udział procentowy wybranych czynników został wyliczony dla kategorii statusu jajników: prawidłowy w grupie 196 kobiet, w grupie POF liczącej 40 i w grupie PCOS dla 154 kobiet. Łącznie u 194 badanych wystąpiły nieprawidłowości związane z funkcjonowaniem jajników. Liczebność kategorii dla poszczególnych czynników odpowiada liczebności oznaczeń hormonów AMH i FSH i jest określone wartością n oraz udziałem procentowym dla poszczególnych kategorii.

Zgodność dopasowania danych empirycznych względem rozkładu normalnego zweryfikowano 3 testami: K-S Kołmogorowa-Smirnowa, Lillieforsa i Shapiro-Wilka. We wszystkich analizach hipoteza o normalności była odrzucona jednak histogramy sporządzone dla rozkładu były w przybliżeniu symetryczne, dlatego zastosowano test F, który jest odporny na niespełnienie założeń o normalności, w szczególności gdy jest

symetryczny. W celu określenia jednorodności wariancji użyto testu Levene'a. Dla zbadania zależności pomiędzy zmiennymi skategoryzowanymi wykorzystano test Chi-kwadrat.

Wpływ pojedynczych czynników na zmienne AMH i FSH zbadano przy pomocy analizy wariancji jednoczynnikowej ANOVA. Następnie w celu znalezienia istotnych interakcji pomiędzy badanymi czynnikami, zastosowano test *post-hoc*. Za pomocą testu NIR wyznaczono najmniejsze istotne różnice dla każdej porównywanej pary. Przyjęto poziom istotności $\alpha=0,05$. Obliczono również eta-kwadrat cząstkowe (η^2) - jest to część zmienności zmiennej zależnej wyjaśnionej przez efekt (czynnik). Oszacowano, który z czynników ma największy wpływ na zmienną zależną.

W celu określenia zmienności w stężeniach hormonów w zależności od wieku posłużono się analizą regresji opisaną funkcją: $y=a+bx$. Współczynniki równania regresji wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów. Współczynnik kierunkowy prostej wskazuje czy funkcja jest rosnąca - $b>0$, czy malejąca - $b<0$. Przyjęto poziom istotności $p<0,05$. Dla $b>0$ korelacja (Pearsona) z wiekiem jest dodatnia a dla $b<0$ ujemna. Procent wyjaśnionej zmienności AMH lub FSH w zależności od wieku to współczynnik determinacji ($R^2 * 100\%$). Aby zbadać wpływ czynników na nieprawidłowe stężenie AMH (PCOS) wykorzystano regresję logistyczną (Stanisz 2007). Statystyką Chi-kwadrat Walda zbadano, czy współczynniki regresji logistycznej różnią się istotnie od zera dla $p<0,05$.

W celu zbadania interakcji pomiędzy badaną zmienną i czynnikami zastosowano

Logitową postać modelu logistycznego wyrażonego wzorem:

$$\text{Logit } P = a_0 + a_1 * \text{badana cecha}$$

$a_i, i = 0,1$ - współczynniki regresji

Iloraz „szans” OR (*odds ratio*) obliczono według wzoru:

$$\text{OR} = e^{a_1(x_1-x_2)}$$

x_1, x_2 - zmienne

e - podstawa logarytmów naturalnych.

Procedury analizy statystyczno-matematycznej oparto o zasady postępowania i metodykę wg., Łomnickiego (2003), Sokal'a i Rohlf'a (2003), Sobczyka (2007) i Stanisza (2008). Ponadto, uwzględniono wskazówki i wytyczne zawarte w podręczniku elektronicznym StatSoft (2014). Weryfikację statystyczną wyników przeprowadzono na poziomie istotności $p<0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka kobiet z uwzględnieniem statusu funkcjonowania jajników

4.1.1. Cechy demograficzne i socjoekonomiczne

Istotnym elementem determinującym rozwój oraz stan biologiczny człowieka są czynniki socjoekonomiczne. W pracy zbadano, czy cechy społeczno-demograficzne wpływają na status rozrodczy kobiet w zależności od wieku. Podstawowa charakterystyka grupy badawczej w zależności od prawidłowej i zaburzonej funkcji jajników obejmowała informacje dotyczące wieku, stanu cywilnego, miejsca zamieszkania oraz wykształcenia (tab. 1.).

Aby prześledzić zmiany związane z wyczerpywaniem rezerwy jajnikowej u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami, grupę badawczą podzielono na trzy przedziały wieku: 23-30, 30-35 oraz 36-46 lat. Przyjęty podział umożliwił porównanie parametrów opisujących kondycję jajników z dysfunkcją takich jak POF i PCOS z grupą kontrolną oraz ocenę zmian zachodzących z wiekiem. Najmniej kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami znalazło się w grupie 23-30 lat, która prezentowała najwyższy potencjał rozrodczy, określony poziomem AMH. Przedziały 31-35 oraz 36-46 lat miały zbliżoną liczebność. Ze względu na fizjologiczny spadek kondycji rozrodczej u kobiet po 35 roku życia, do najstarszej grupy zaklasyfikowano kobiety w wieku 36-46, u których stwierdzono zbliżone poziomy stężenia AMH i FSH.

Różnice w częstościach kategorii wiekowych w trzech grupach podzielonych ze względu na funkcjonowanie jajników: Prawidłowa, POF, PCOS, wykazały wysoką istotność statystyczną. W najmłodszej grupie kobiety z PCOS stanowiły 28% podczas gdy z POF tylko 15%. Kobiety z PCOS to 45% w odniesieniu do 25% badanych z POF w przedziale wiekowym 31-35 lat, podczas gdy w grupie 36-46 lat proporcje ulegają odwróceniu i liczba kobiet z PCOS stanowi już tylko blisko połowę w porównaniu do badanych z POF.

Kobiety z POF, PCOS i z prawidłową funkcją jajników nie różniły się pod względem stanu cywilnego, miejsca zamieszkania i poziomu wykształcenia. Istotna różnica dotyczyła kobiet w trzech grupach podzielonych ze względu na wiek: 23-30, 31-35 i 36-46 lat oraz status funkcjonowania jajników: Prawidłowy, POF i PCOS. W najmłodszej grupie kobiety z PCOS stanowiły 28% podczas gdy z POF tylko 15%. Kobiety z PCOS to 45% w odniesieniu do 25% badanych z POF w przedziale

wiekowym 31-35 lat, podczas gdy w grupie 36-46 lat proporcje ulegają odwróceniu i liczba kobiet z PCOS stanowi już tylko blisko połowę w porównaniu do badanych z POF. Status socjoekonomiczny kobiet określono w oparciu o stan cywilny, miejsce zamieszkania oraz stopień wykształcenia. Zdecydowaną większość próby stanowiły kobiety zamężne, mieszkające w małych miastach lub na wsi, posiadające wyższe wykształcenie. Trzy badane grupy nie różniły się pomiędzy sobą pod względem badanych cech statusu socjoekonomicznego.

Kobiety różniły się istotnie pod względem wieku kalendarzowego. Wśród badanych najwięcej kobiet z POF znalazło się w przedziale wieku 36-46 lat. Generalnie mediana wieku osiągnięcia fizjologicznej menopauzy u kobiet w Polsce wynosi 51,25 lat. w związku z przyspieszoną utratą pęcherzyków jajnikowych należy spodziewać się, że u kobiet z POF wiek menopauzy przesunie się i wystąpi wcześniej (Kaczmarek 2007 a).

Tabela 1. Zróznicowanie cech socjodemograficznych wśród kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej.

Zmienność	Funkcja jajników						Chi-kwadrat	p
	Prawidłowa		POF		PCOS			
	n	%	n	%	n	%		
Wiek [lata]							17,98	0,0012
23-30	36	18,37	6	15,00	43	27,92		
31-35	79	40,31	10	25,00	69	44,81		
36-46	81	41,33	24	60,00	42	27,27		
Stan cywilny							5,57	0,4735
W związku	191	97,95	40	100	154	100		
Inne	4	2,05	0	0	0	0		
Miejsce zamieszkania							4,12	0,3895
Wieś/małe miasto	83	42,78	17	43,59	76	50,33		
Średnie miasto	34	17,53	9	23,08	30	19,87		
Duże/b. duże miasto	77	39,69	13	33,33	45	29,80		
Wykształcenie							3,68	0,4514
Wyższe/licenc.	152	77,55	26	65,00	113	73,38		
Średnie	35	17,86	10	25,00	34	22,08		
Podst./zawod.	9	4,59	4	10,00	7	4,55		

4.1.2. Czynniki stylu życia, kondycji psychofizycznej i budowa ciała

Aby ocenić wpływ czynników stylu życia na status funkcjonowania jajników zbadano takie czynniki jak aktywność fizyczna, palenie papierosów, kondycja psychofizyczna (skala depresji Becka) oraz zmienne somatyczne. Ogólną charakterystykę cech somatycznych i aktywności fizycznej w zależności od prawidłowej i zaburzonej funkcji jajników w grupie badanych kobiet zaprezentowano w tabeli 2. W odniesieniu do wskaźników cech somatycznych: BMI, WHR czy BF% nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi kobietami z POF, PCOS i kontrolą. Częstość występowania wskaźnika BMI w normie wśród badanych grup podzielonych ze względu na status funkcjonowania jajników była zbliżona i wynosiła około 70%. Nadwaga i otyłość wystąpiły u około 27% kobiet we wszystkich grupach. Osoby z niedowagą stanowiły marginalny procent obserwacji.

Jako zmienną uzupełniającą zbadano wskaźnik WHR, określający typ budowy zdeterminowany dystrybucją tkanki tłuszczowej: gyno- i androidalny. Porównywane grupy nie różniły się istotnie między sobą, jednak zarówno u kobiet z POF, PCOS i jak u kobiet z prawidłową funkcją jajników przeważał androidalny typ sylwetki. Wstępna analiza procentowego udziału tłuszczu (BF%) nie wykazała istotnej statystycznie różnicy w obserwowanych grupach z tym, że podwyższony bądź wysoki udział tkanki tłuszczowej w masie ciała występował najczęściej, bo aż u 37,5% kobiet z POF. Wśród badanych z PCOS podwyższona i wysoka ilość tkanki tłuszczowej wystąpiła z częstością 28% i 26% u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. BF% poniżej normy zaobserwowano u aż 39,6% kobiet z PCOS, podczas gdy u 32,5% kobiet z POF (tab. 2.)

Za pomocą skali depresji Becka zbadano kondycję kobiet. Odpowiedziały one na standardowe pytania, zawarte w kwestionariuszu ankietowym. Kobiety z POF i PCOS oraz z prawidłową funkcją jajników nie różniły się istotnie między sobą. Aż u 72% badanych PCOS i 67,5% z POF nie stwierdzono objawów depresji. Objawy łagodnej depresji zgłosiło 32,5% kobiet z objawami POF oraz 25% z PCOS co jest zgodne z otrzymanym wynikiem w grupie kontrolnej. Stan psychiczny badanych kobiet można było określić jako dobry, niezależnie od przynależności do grupy.

Tabela 2. Charakterystyka cech somatycznych oraz BF% w trzech grupach badanych kobiet.

Zmienność	Funkcja jajników						Chi- kwadrat	p
	Prawidłowa		POF		PCOS			
	n	%	n	%	n	%		
BMI							2,02	0,733
Niedowaga	3	1,5	1	2,5	6	3,9		
W normie	141	71,9	28	70,0	106	68,8		
Nadwaga i otyłość	52	26,5	11	27,5	42	27,3		
WHR							0,80	0,671
Typ gynoidalny	93	47,7	16	40,0	71	46,1		
Typ androidalny	102	52,3	24	60,0	83	53,9		
BF%							2,50	0,644
Poniżej normy	84	42,9	13	32,5	61	39,6		
W normie	61	31,1	12	30,0	50	32,5		
Nadwaga/ otyłość	51	26,0	15	37,5	43	27,9		

Tabela 3. Charakterystyka elementów stylu życia w trzech grupach badanych kobiet.

Zmienność	Funkcja jajników						Chi- kwadrat	p
	Prawidłowa		POF		PCOS			
	n	%	n	%	n	%		
Aktywność fizyczna							0,032	0,984
Wystarczająca	134	68,4	27	67,5	104	67,5		
Niewystarczająca	62	31,6	13	32,5	50	32,5		
Palenie papierosów							0,85	0,931
Tak	17	8,7	4	10,0	13	8,5		
Nie	144	73,8	28	70,0	117	76,5		
Rzuciła	34	17,4	8	20,0	23	15,0		
Skala depresji Becka							4,25	0,642
Brak depresji	141	72,7	27	67,5	111	72,1		
Łagodna depresja	45	23,2	13	32,5	38	24,7		
Umiarkowana depresja	6	3,1	0	0	4	2,6		
Ciężka depresja	2	1,0	0	0	1	0,6		

Pod wpływem palenia papierosów spada kondycja rozrodcza kobiet. Badanie wykazało, że 70% kobiet z POF oraz 76% z PCOS nie pali papierosów. Odpowiednio 20% badanych z POF i 15% z PCOS oświadczyło, że rzuciły palenie a tylko około 10% we wszystkich grupach zadeklarowało, że pali papierosy (tab. 3.).

4.1.3. Cechy okresu rozrodczości

Okres rozrodczości stanowi biologiczny potencjał, ponieważ w tym czasie organizm kobiety jest gotowy do wydania potomstwa podczas każdego z cykli menstruacyjnych. Aby scharakteryzować potencjał rozrodczy badanej grupy kobiet wykorzystano takie parametry jak cechy okresu rozrodczości oraz historię rozrodczości. Cechy okresu rozrodczości jak wiek menarche, długość cyklu, regularność miesiączkowania, liczba ciąż, liczba poronień oraz liczba urodzonych dzieci przedstawiono w tabeli 4.

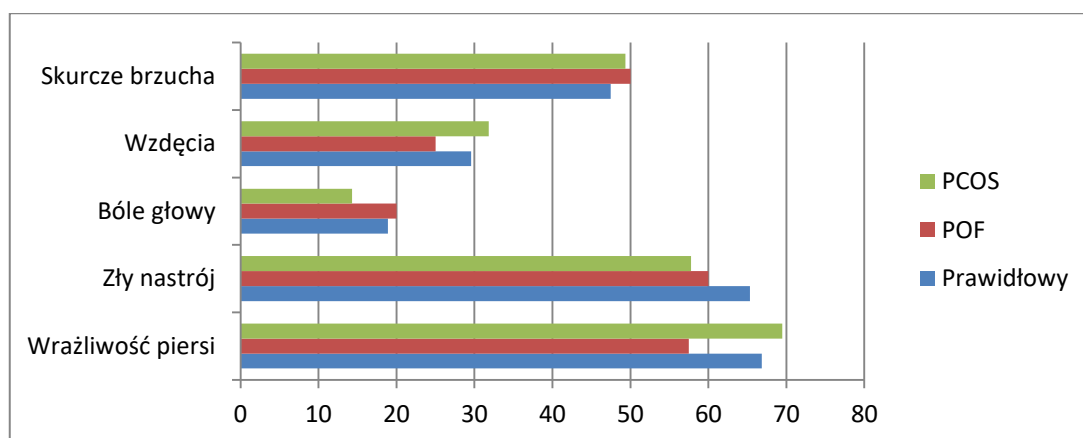
Kobiety nie różniły się istotnie pod względem wieku menarche w wydzielonych kategoriach funkcjonowania jajnika: POF, PCOS i prawidłowy. Większość badanych rozpoczęła miesiączkowanie w przedziale wieku 12-14 lat, który uznany jest za prawidłowy. W grupie, u której menarche pojawiła się w spodziewanym czasie, POF to 62,5% badanych natomiast kobiety PCOS i z prawidłową funkcją jajnika stanowiły około 70%. Najmniej liczną jest grupa badanych, u których pierwsza miesiączka pojawiła się najwcześniej. U 8,4% kobiet menarche wystąpiła poniżej 12 roku życia, podczas gdy menarche powyżej 14 roku życia zadeklarowało 19,5% badanych z PCOS. Wśród kobiet z POF wczesna miesiączka pojawiła się u 17,5% natomiast późną inicjację okresu rozrodczości zadeklarowało 15% badanych.

Wysoką istotność statystyczną wykazuje zmienna długość cyklu w kolejnych kategoriach statusu jajnika w podzielonych grupach: <28, 28-32 i >32 dni. U kobiet z POF niemal nie występuje wydłużony cykl menstruacyjny, podczas gdy krótki oraz występujący w prawidłowym przedziale czasu, to jest co 28-32 dni, cykl pojawił się prawie w równych proporcjach u 50% kobiet w rozpatrywanych kategoriach statusu jajnika. Nieco inaczej rozkładał się udział procentowy w przypadku kobiet z PCOS. Kobiety z prawidłową długością cyklu stanowiły blisko 71%, natomiast odwrotnie niż u badanych z POF, bo aż 15% stanowiły kobiety z wydłużonym cyklem płciowym a u około 10% cykl jest zdecydowanie krótszy.

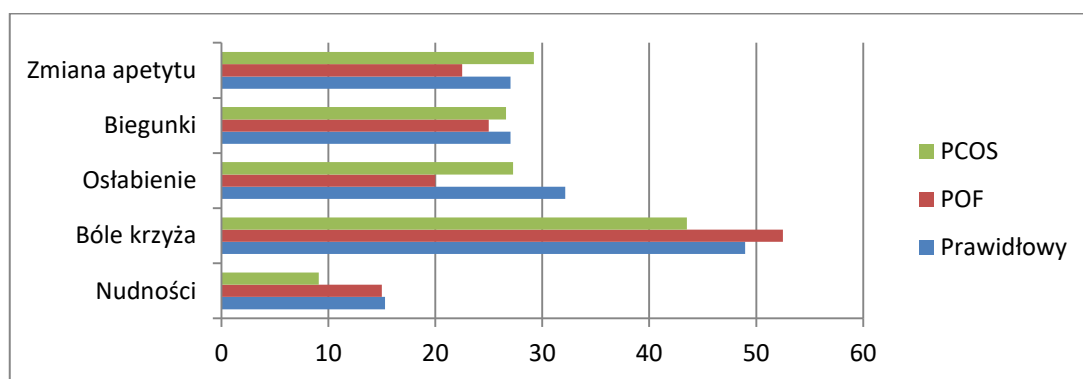
Tabela 4. Zróznicowanie cech okresu rozrodczości w zależności od statusu funkcjonowania jajników.

Cecha	Status jajników						Chi- kwadrat	<i>p</i>
	Prawidłowy		POF		PCOS			
	n	%	n	%	n	%		
Menarche [lata]							3,01	0,556
< 12 r.ż.	21	10,7	7	17,5	13	8,4		
12-14 r.ż.	138	70,4	25	62,5	111	72,1		
> 14 r.ż.	34	17,4	6	15,0	30	19,5		
Długość cyklu [dni]							47,56	0,000
<28	67	34,2	20	50,0	15	9,7		
28-32	113	57,6	19	47,5	109	70,8		
>32	10	5,1	1	2,5	23	14,9		
Regularność miesięczkowania							3,73	0,155
Tak	163	83,2	33	82,5	116	75,3		
Nie	31	15,8	7	17,5	37	24,0		
Liczba ciąż							0,67	0,955
0	118	60,2	23	57,5	95	61,7		
1	52	26,5	11	27,5	42	27,3		
>=2	26	13,8	6	15,0	17	11,0		
Poronienia							1,40	0,497
tak	52	65,8	11	64,7	44	74,6		
nie	27	34,2	6	35,3	15	25,4		
Liczba poronień							2,51	0,285
1	30	58,8	6	54,6	32	72,73		
>2	21	41,2	5	45,6	12	27,27		
Liczba urodzonych dzieci							2,58	0,276
0	161	82,1	32	80,0	135	87,7		
≥1	35	17,9	8	20,0	19	12,3		

W pracy zbadano również zależności pomiędzy symptomami zbliżającej się miesiączki oraz symptomami występującymi podczas trwającej miesiączki w trzech grupach. Nie znaleziono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupą kobiet z dysfunkcją jajników i z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. Wyniki badania zaprezentowano na rycinach 13 i 14.



Ryc.13. Symptomy przed menstruacją.



Ryc.14. Symptomy podczas menstruacji.

Wszystkie kobiety biorące udział w badaniu podjęły decyzję o macierzyństwie. Wśród badanych, bez względu na status funkcjonowania jajnika, większość nie posiadała dzieci i nigdy nie była w ciąży. Częstość wystąpienia jednokrotnego poronienia u badanych była porównywalna dla kobiet z POF oraz z prawidłowym funkcjonowaniem jajnika w przeciwieństwie do grupy z PCOS, gdzie była nieco

wyższa, choć różnica nie była istotna statystycznie. W tej grupie relatywnie rzadziej występowały więcej niż dwa poronienia w porównaniu do kobiet z POF i kontroli. Zbliżony odsetek kobiet, które urodziły przynajmniej jedno dziecko zaobserwowano u kobiet z POF i w grupie kontrolnej natomiast u kobiet z PCOS był on nieco niższy ($p < 0,05$).

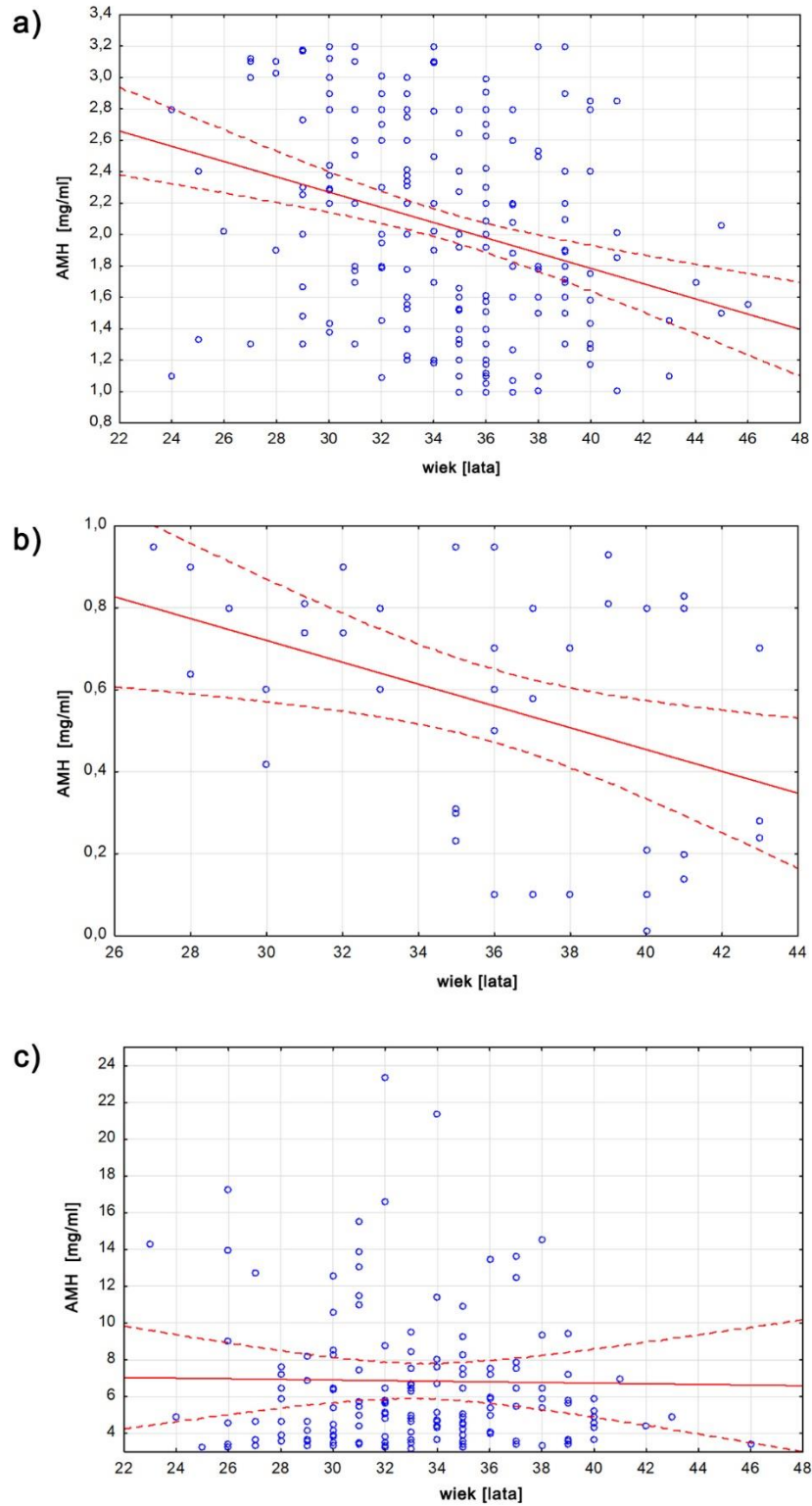
4.2. Profile AMH i FSH u kobiet z POF i PCOS i ich uwarunkowania

4.2.1. Zmienność stężeń AMH i FSH z wiekiem

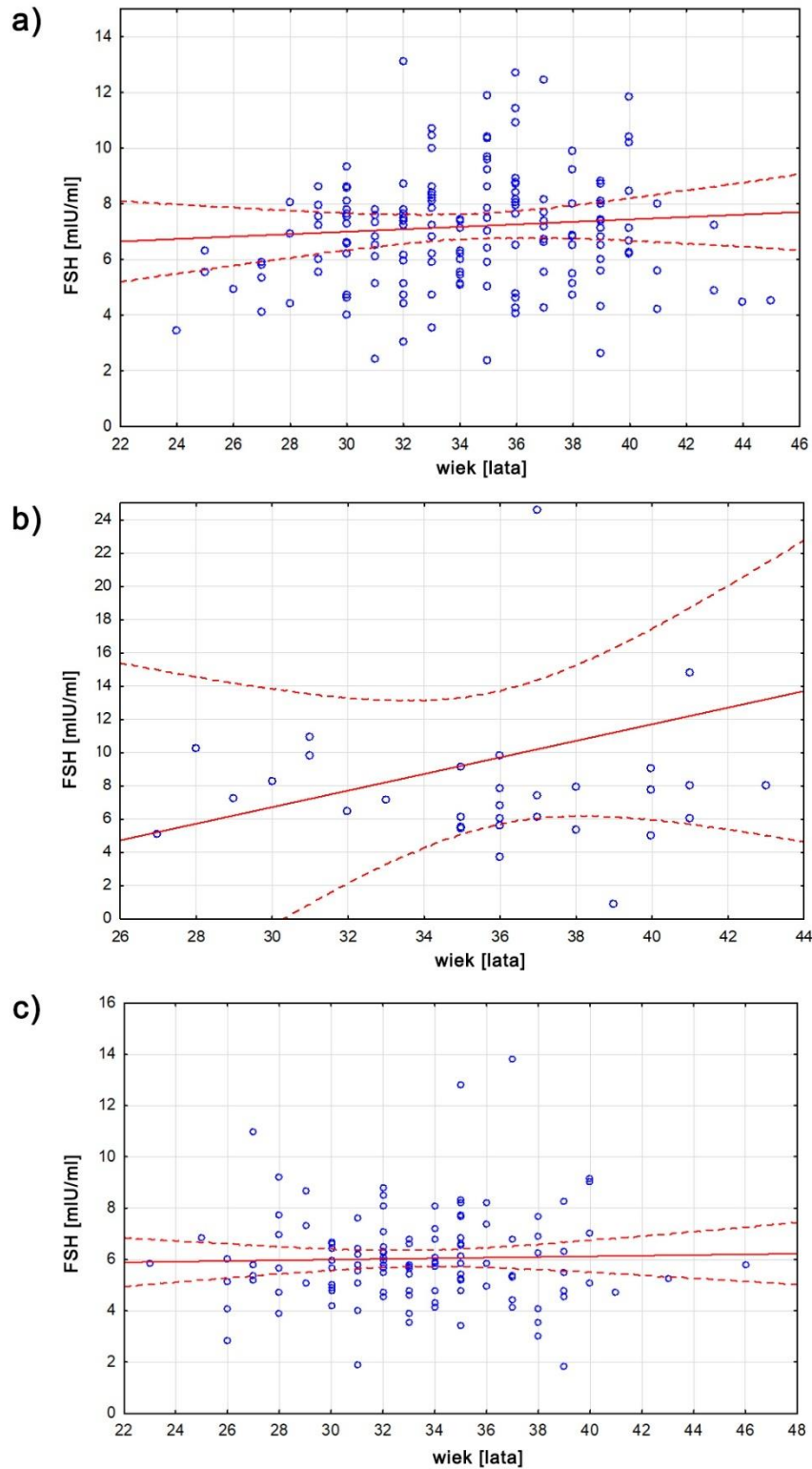
Przeprowadzona analiza regresji, dotycząca określenia zmienności stężenia AMH i FSH w zależności od wieku u kobiet z POF oraz PCOS potwierdziła występujące różnice w poziomie hormonów u badanych z dysfunkcją jajników w porównaniu do grupy kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami (ryc. 15. i ryc. 16.). W grupie kontrolnej współczynnik kierunkowy regresji dla zmiennej AMH jest istotnie mniejszy od zera ($b = -0,0486$) na poziomie istotności $p < 0,01$ co potwierdziło, że AMH maleje z wiekiem. Ocena współczynnika determinacji $r^2 = 0,0943$ ($r = -0,3071$) pozwoliła oszacować, że 9,4% całkowitej zmienności AMH może być wyjaśnione przez czynnik wieku. U kobiet z prawidłową funkcją jajnika współczynnik kierunkowy i korelacja dla FSH i wieku są dodatnie ale nie różnią się istotnie od zera ($p > 0,05$) i można przyjąć, że w badanej grupie FSH utrzymuje się stale na tym samym poziomie niezależnie od wieku ($b = 0,04394$).

W grupie kobiet z POF poziom FSH nie zależy od wieku ($p > 0,05$). Współczynnik kierunkowy prostej jest większy niż w grupie kobiet z prawidłową funkcją jajnika ($b = 0,49891$) ale nie jest istotnie różny od zera. Odwrotna tendencja odnosi się do AMH, gdzie współczynnik kierunkowy prostej oraz korelacja z wiekiem są istotnie różne od zera ($p < 0,05$) i mają wartość ujemną, co oznacza, że AMH maleje z wiekiem.

AMH nie wykazuje istotnej różnicy w zależności od wieku wśród badanych z PCOS. Współczynnik kierunkowy prostej i korelacja nie są istotnie różne od zera ($p > 0,05$). Podobny wynik uzyskano w analizie FSH, co wskazuje na brak zależności stężenia hormonu od wieku ($p > 0,05$). Otrzymane wyniki średnich poziomów AMH i FSH w trzech grupach podzielonych ze względu na wiek, przedstawiają zmienność hormonów w dwóch grupach z dysfunkcją jajnika na tle grupy kontrolnej (tab. 5).



Ryc. 15. Zmienność poziomów AMH w zależności od wieku i statusu jajników: w grupach kobiet z a) prawidłową funkcją jajników b) POF i c) PCOS.



Ryc. 16. Zmienność poziomów FSH w zależności od wieku i statusu jajników: w grupach kobiet z a) prawidłową funkcją jajników b) POF i c) PCOS.

Analiza stężenia hormonów w grupie kontrolnej wykazała, że poziom AMH zmniejszał się w sposób liniowy wraz z wiekiem. Poziom FSH był wyższy w grupie kobiet zdrowych w wieku 31-35 lat niż w młodszej grupie badanych, osiągając poziom $7,51 \pm 3,89$ mIU/ml a następnie obniżył się u kobiet w wieku 36-46 lat ($7,22 \pm 2,12$ mIU/ml).

Zmiany stężeń z wiekiem potwierdzono analizą wariancji i wykazano, że najwyższy poziom stężenia AMH był w grupie kobiet 23-30 lat. Porównanie testem *post-hoc* średnich stężenia AMH w kategoriach funkcjonowania jajnika: Prawidłowy-POF nie wykazał istotności statystycznej. U kobiet z PCOS wystąpiła statystycznie istotna zależność ($p < 0,01$) w porównaniu średnich wartości stężenia AMH w dwóch grupach: Prawidłowy-PCOS oraz POF-PCOS. Analiza średnich FSH w badanych kategoriach funkcjonowania jajnika nie wykazała istotnych interakcji statystycznych w najmłodszej grupie badawczej.

U kobiet w wieku 31-35 lat wynik testu NIR wskazał na wysoce istotną różnicę ($p < 0,01$) w poziomie AMH dla grup: Prawidłowy-PCOS oraz POF-PCOS. W przeciwieństwie do młodszych kobiet, średnie stężenia FSH porównywanych grup: Prawidłowy-PCOS wskazuje na wysoką istotność statystyczną ($p < 0,01$), podczas gdy wartości stężenia: Prawidłowy-POF oraz POF-PCOS nie wykazywały takiej zależności. W przedziale 36-46 lat nie obserwowano różnic w poziomach AMH dla porównywanych kategorii: Prawidłowy-POF, natomiast pary: Prawidłowy-PCOS i POF-PCOS cechuje wysoka zależność statystyczna ($p < 0,01$). W najstarszej grupie wykazano istotną statystycznie różnicę w odniesieniu do poziomu FSH dla par: Prawidłowy-POF ($p < 0,05$) oraz POF-PCOS ($p < 0,01$).

Poziom AMH u kobiet z POF, podobnie jak w grupie kontrolnej, sukcesywnie obniżał się z wiekiem, osiągając w najstarszej grupie badanych średni poziom $0,49 \pm 0,32$ ng/ml. Tendencja była zgodna z oczekiwanym wynikiem. Poziom FSH w grupie kobiet z POF różnił się od wyniku w grupie kontrolnej, bowiem jego wartość obniżyła się w średnim przedziale wieku a następnie gwałtownie wzrosła w przedziale wieku 36-46 lat.

Wykazano istotną różnicę w poziomach hormonów AMH i FSH u kobiet z PCOS i w grupie kontrolnej w zależności od wieku z wyłączeniem FSH w grupie kobiet 31-35 lat, który utrzymywał się na podobnym poziomie. Analiza średnich wartości AMH u kobiet z prawidłową funkcją jajnika w kolejnych przedziałach wiekowych wykazała

tendencję do liniowego obniżania poziomu stężenia hormonu w surowicy krwi z wiekiem, co nie znajduje potwierdzenia u kobiet z PCOS w trzech analizowanych przedziałach wieku. Poziom AMH wzrósł z wiekiem osiągając najwyższą wartość $7,66 \pm 9,81$ ng/ml u kobiet w przedziale wieku 36-46 lat. Analiza poziomu FSH wykazała, że jego stężenie pozostawało na stałym poziomie we wszystkich grupach wiekowych i wynosiło $6,00 \pm 2,27$ mIU/ml i różni się w porównaniu do kontroli, gdzie zaobserwowano fluktuacje w zależności od wieku.

Tabela 5. Stężenie hormonów AMH oraz FSH u kobiet z prawidłową funkcją jajników, POF i PCOS w zależności od wieku. Wyniki testu NIR *post-hoc*.

Status jajników i wiek	AMH[ng/ml]		FSH[mIU/ml]	
	x \pm SD	Min.-Max	x \pm SD	Min.-Max
Wiek 23-30 lat				
Prawidłowy (n=36)	2,42 \pm 0,69	1,10-3,20	6,48 \pm 1,57	3,43-9,30
POF (n=6)	0,72 \pm 0,20	0,42-0,95	7,70 \pm 2,13	5,10-10,20
PCOS (n=43)	6,18 \pm 3,49	3,22-17,30	5,94 \pm 1,65	2,85-11,01
NIR				
Prawidłowy-POF	NS		NS	
P-PCOS	<0,01		NS	
POF-PCOS	<0,01		NS	
Wiek 31-35 lat				
Prawidłowy (n=79)	2,09 \pm 0,62	1,00-3,20	7,51 \pm 3,89	2,35-32,75
POF (n=10)	0,64 \pm 0,26	0,23-0,95	7,49 \pm 1,98	5,40-10,90
PCOS (n=69)	6,76 \pm 4,04	3,21-23,36	6,10 \pm 1,61	1,90-12,79
NIR				
Prawidłowy-POF	NS		NS	
Prawidłowy-PCOS	<0,01		<0,01	
POF-PCOS	<0,01		NS	
Wiek 36-46 lat				
Prawidłowy (n=81)	1,85 \pm 0,59	1,00-3,20	7,22 \pm 2,12	2,64-12,68
POF (n=24)	0,49 \pm 0,32	0,01-0,95	10,96 \pm 14,42	0,90-68,81
PCOS (n=42)	7,66 \pm 9,81	3,31-67,00	6,00 \pm 2,27	1,82-13,80
NIR				
Prawidłowy-POF	NS		<0,05	
Prawidłowy-PCOS	<0,01		NS	
POF-PCOS	<0,01		<0,01	

4.2.2. Zróznicowanie poziomu stężeń AMH i FSH w zależności od cech cyklu płciowego

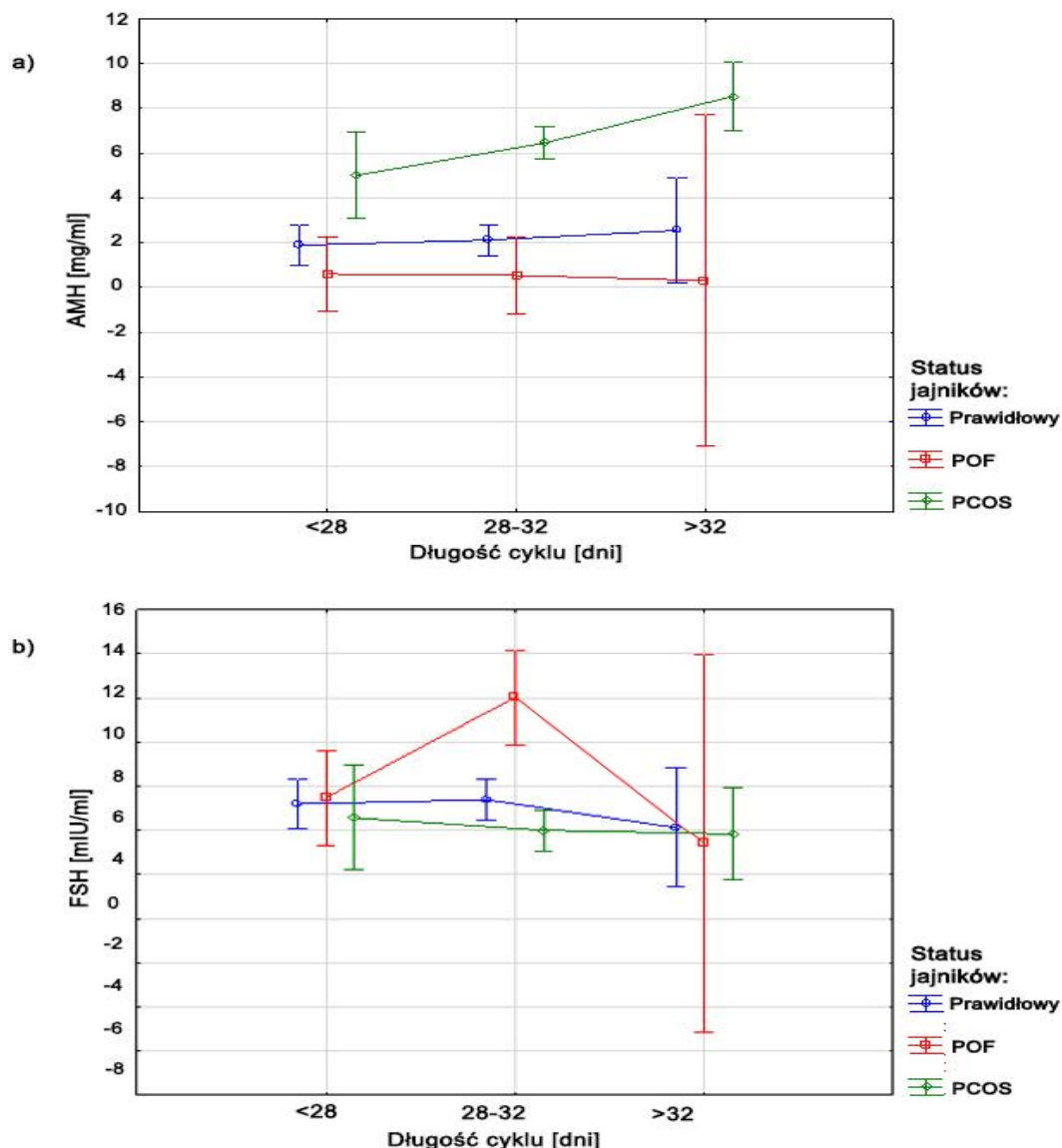
W celu zbadania zależności stężenia AMH i FSH w trzech kategoriach funkcjonowania jajników w odniesieniu do cech okresu rozrodczości jak: wiek menarche, długość cyklu menstruacyjnego, regularność miesiączkowania, liczba ciąż i liczba poronień, zastosowano analizę wariancji a następnie przeprowadzono test *post-hoc* (NIR, $\alpha=0,05$) aby określić, które średnie różnią się między sobą. Zmiany stężeń AMH oraz FSH w surowicy krwi w grupie kobiet z POF, PCOS oraz kontrolnej w odniesieniu do cech okresu rozrodczości przedstawiono w tabeli 6.

Na podstawie statystyki ANOVA obliczono średnie wartości dla badanych hormonów. Punktem odniesienia są średnie wartości AMH ($2,05 \pm 0,65$ ng/ml) i FSH ($7,19 \pm 2,88$ mIU/ml) określające prawidłowo funkcjonujące jajniki. W okresie rozrodczości u zdrowych kobiet obserwuje się odwrotną korelację przyjętych w niniejszej pracy hormonalnych parametrów rozrodczości jakimi są AMH i FSH. Potwierdza to obserwacja niskiego stężenia AMH (<1 ng/ml) w grupie kobiet z POF i podwyższonego w odniesieniu do PCOS i grupy kontrolnej, poziomu FSH. Według przyjętych kryteriów, AMH u kobiet z PCOS osiąga wartości powyżej 3,2 ng/ml.

Aby zbadać zależności obserwowanych hormonów z cechami okresu rozrodczości w grupie kobiet z POF, PCOS i kontrolnej, przeprowadzono analizę wariancji. Wykazano zależność statystyczną ($p<0,05$), która wystąpiła w odniesieniu do zmienności hormonów AMH i FSH oraz czynnika długość cyklu w grupie kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami (ryc. 17. a i b). Test *post-hoc* wskazał na występujące różnice stężeń hormonów ($p<0,05$) dla porównywanych par zmiennych w zakresie długości cyklu menstruacyjnego: <28 z 28-32 dni, 28-32 z >32 dni oraz znacząco istotną różnicę ($p<0,01$) dla najkrótszego i najdłuższego cyklu menstruacyjnego: <28 z >32 dni.

Tabela 6. Zróznicowanie stężenia AMH i FSH w zależności od cech okresu rozrodczości u kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej. Wyniki testu NIR *post-hoc*.

Zmienność			AMH[ng/ml]			FSH[mIU/ml]			
	n	%	$\bar{x} \pm SD$	F	<i>p</i>	$\bar{x} \pm SD$	F	<i>p</i>	
Prawidłowy(P)	196	50,3	2,05 ± 0,65			7,19 ± 2,88			
POF	40	10,3	0,56 ± 0,3	82,84	0,000	9,62 ± 11,30	9,28	0,000	
PCOS	154	39,5	6,84 ± 6,06			6,04 ± 1,79			
NIR									
P-POF			<0,05			<0,01			
P-PCOS			<0,01			<0,01			
POF-PCOS			<0,01			<0,01			
Menarche[lata]									
				Prawidłowy					
< 12	21	10,7	2,14 ± 0,66			7,32 ± 2,18			
12-14	138	70,4	2,04 ± 0,66	0,25	0,778	7,35 ± 3,10	1,43	0,230	
> 14	34	17,3	2,02 ± 0,63			6,29 ± 2,02			
				POF					
< 12	7	17,5	0,58 ± 0,25			7,91 ± 2,02			
12-14	25	62,5	0,60 ± 0,30	1,77	0,185	10,02 ± 14,09	0,08	0,922	
> 14	6	15,0	0,34 ± 0,33			10,38 ± 8,14			
				PCOS					
< 12	13	8,4	7,12 ± 5,19			6,46 ± 2,94			
12-14	111	72,0	6,41 ± 3,51	1,23	0,295	6,07 ± 1,44	0,54	0,587	
> 14	30	19,4	8,35 ± 11,52			5,77 ± 2,38			
Długość cyklu [dni]									
				Prawidłowy					
<28	67	34,1	1,89 ± 0,62			7,19 ± 2,26			
28-32	113	57,6	2,12 ± 0,65	5,91	0,003	7,39 ± 3,35	0,85	0,428	
>32	10	5,1	2,55 ± 0,65			6,13 ± 1,52			
NIR									
<28 - 28-32			<0,05						
<28 - >32			<0,01						
28-32 - >32			<0,05						
				POF					
<28	20	50,0	0,60 ± 0,29			7,47 ± 1,87			
28-32	19	47,5	0,54 ± 0,31	0,56	0,573	12,03 ± 16,02	0,71	0,5	
>32	1	2,5	0,31 ± 0,00			5,4 ± 0,00			
				PCOS					
<28	15	9,7	5,00 ± 1,68			6,57 ± 2,68			
28-32	109	70,7	6,46 ± 6,68	1,78	0,172	6,01 ± 1,75	0,68	0,510	
>32	23	14,9	8,55 ± 3,63			5,83 ± 1,29			
Regul.miesiącz									
				Prawidłowy					
Tak	163	83,1	2,04 ± 0,63			7,00 ± 2,10			
Nie	31	15,8	2,18 ± 0,78	1,28	0,259	8,02 ± 5,00	3,01	0,085	
				POF					
Tak	33	82,5	0,58 ± 0,29			7,98 ± 4,23			
Nie	7	17,5	0,47 ± 0,34	0,77	0,384	17,02 ± 25,39	3,37	0,076	
				PCOS					
Tak	116	75,3	6,25 ± 6,22			6,10 ± 1,77			
Nie	37	24,0	8,80 ± 5,22	5,07	0,026	5,91 ± 1,88	0,29	0,592	



Ryc.17. Zroźnicowanie wartości średnich hormonów w zależności od długości cyklu: <28; 28-32; >32 dni oraz statusu jajników: Prawidłowy, POF i PCOS a) AMH b) FSH.

Wśród kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami poziom AMH podlega fluktuacjom w zakresie przedziału normy referencyjnej w zależności od długości cyklu gdzie nie uwzględniono czynnika wieku. U kobiet z długością cyklu >32 dni poziom hormonu był najwyższy ($2,55 \pm 0,65$ ng/ml) podczas gdy u badanych z najkrótszą długością cyklu ($1,89 \pm 0,62$ ng/ml) - najniższy. U kobiet z dysfunkcją jajników nie wystąpiły statystycznie istotne różnice w poziomie AMH określonego w widełkach referencyjnych. W zależności od długości cyklu menstruacyjnego u badanych z PCOS

są one widoczne w odniesieniu do wydłużonego cyklu menstruacyjnego a u kobiet z POF najwyższe stężenie AMH zaobserwowano dla cyklu <28 dni.

Na podstawie logistycznego modelu regresji dla zmiennej dychotomicznej (Prawidłowy, PCOS), obliczono prawdopodobieństwo wystąpienia PCOS ($P(Y=1)$) u kobiet z długością cyklu w trzech kategoriach: < 28, 28-32 i 32<dni (tab. 7.). Ryzyko podwyższonej wartości AMH u kobiet z długością cyklu powyżej 32 dni jest prawie 12 razy większe niż u kobiet z cyklem krótszym niż 28 dni i 3,45 razy większe niż u badanych ze średnią długością cyklu, mieszczącego się w przedziale 28 - 32 dni. Ryzyko wystąpienia PCOS u kobiet z długością cyklu 28-32 dni jest o 3,45 raz większe niż u kobiet, u których cykl menstruacyjny trwa krócej niż 28 dni.

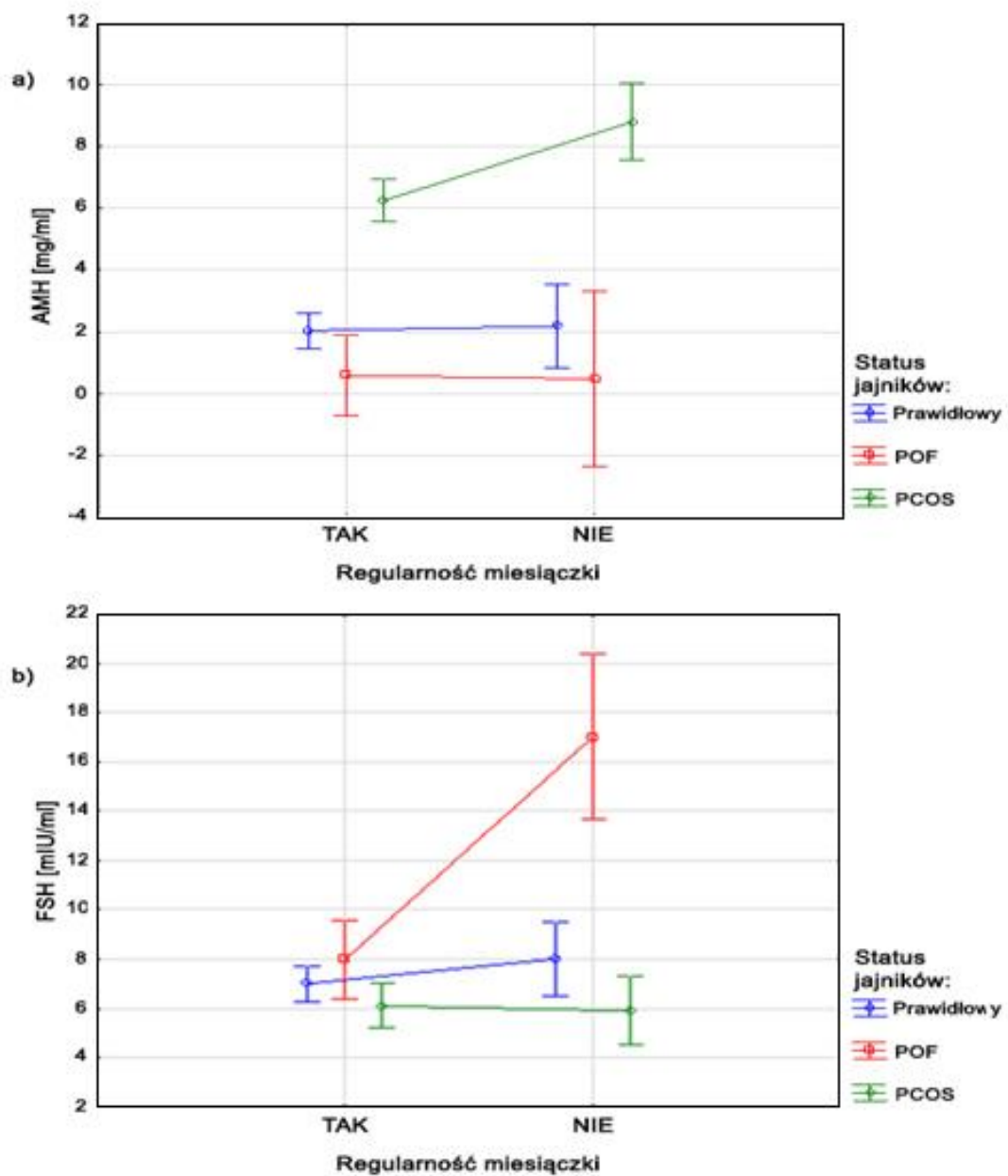
Tabela 7. Związek stężenia AMH z długością cyklu menstruacyjnego w świetle regresji logistycznej krokowej wstecznej u kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników i PCOS.

Zmienne	$x \pm SD$	Chi-kwadrat Walda	p	OR jedności (95% CI)	OR zakresu (95% CI)
Wyraz wolny	$-2,58 \pm 0,45$	32,43	0,0000	0,08 (0,03-0,18)	-
Długość cyklu (dni): <28 28-32 >32	$1,24 \pm 0,23$	28,83	0,0000	3,45 (2,19-5,43)	11,90 (4,80-29,48)

Po obliczeniach $P(Y=1)$ dla trzech kategorii długości cyklu oszacowano, że prawdopodobieństwo wystąpienia PCOS u badanych z krótkim cyklem menstruacyjnym (< 28 dni) jest stosunkowo niskie i wynosi 0,21 podczas gdy w grupie kobiet, u których długość cyklu jest dłuższa niż 32 dni – istnieje wysokie (0,76) prawdopodobieństwo wystąpienia podwyższonej wartości stężenia AMH w osoczu krwi. Dla kobiet ze średnią długością cyklu : 28-32 dni, PCOS może wystąpić z prawdopodobieństwem określonym przez wartość 0,47. Wielowymiarowość przeprowadzonych wcześniej analiz miała na celu najlepsze dopasowanie modelu do

obliczenia powyższych statystyk. Zbyt mała liczebność uniemożliwiła przeprowadzenie analizy regresji logistycznej krokowej dla grupy z POF.

Badanie zmienności AMH i FSH w zakresie występowania regularnej miesiączki u kobiet z POF, PCOS i z prawidłowym funkcjonowaniem jajnika wykazało, że tylko u kobiet z PCOS występuje istotna statystycznie różnica w stężeniu AMH w zależności od regularnego i nieregularnego występowania menstruacji co jest szczególnie wyraźne w przypadku kobiet z nieregularnym miesiączkowaniem. U badanych z POF z nieregularną miesiączką poziom FSH przyjmuje wyższe wartości niż poziomy w porównywanych grupach kobiet. Zależności te pokazano na rycinie 18 a) i b).



Ryc. 18. Zróżnicowanie średnich wartości hormonów w zależności od regularności miesiączkowania oraz statusu funkcjonowania jajników: Prawidłowy, POF i PCOS dla: a) AMH b) FSH.

4.2.3. Analiza profili AMH i FSH w zależności od cech historii rozrodczości

Jak pokazują wyniki, poziomy AMH i FSH nie zależały od tego czy kobieta była w ciąży czy nie. Tę prawidłowość zaobserwowano u kobiet w każdej z grup. Aby ocenić zmienność poziomów AMH i FSH w powiązaniu z elementami historii rozrodczości u kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej, zbadano takie zmienne jak: ciąża, liczba ciąż, poronienia i liczba poronień (tab.8.).

Fakt, że kobieta była w ciąży nie miał związku z istotną zmiennością poziomów analizowanych hormonów zarówno u badanych z POF jak i z PCOS oraz z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. Podobnie sytuacja kształtuje się w odniesieniu do zmiennej liczba ciąż, gdzie nie wykazano różnic w stężeniach hormonów w analizowanych pod względem prawidłowo i nieprawidłowo funkcjonujących jajników kategoriach. Czynniki związane z dzietnością nie wpływały na zmianę stężenia AMH i FSH wśród badanych kobiet z zaburzoną funkcją jajników. Różnicę zaobserwowano natomiast u kobiet z prawidłową funkcją jajnika w kategorii „liczba poronień”, gdzie wykazano istotną zależność w odniesieniu do poziomu stężenia jedynie AMH, podczas gdy FSH nie różnił się w poszczególnych podklasach. Zastosowanie testu NIR wykazało statystycznie istotną różnicę w poziomie stężeń AMH w grupie kobiet z prawidłową pracą jajników, u których nigdy nie wystąpiły samoistne poronienia w porównaniu do kobiet z jednym poronieniem w historii rozrodczej ($p < 0,05$). Nie było istotnej interakcji pomiędzy poziomem AMH i FSH oraz większą liczbą poronień w porównaniu z ich brakiem wśród kobiet zdrowych, oraz wśród grup kobiet z nieprawidłowo funkcjonującymi jajnikami jak POF i PCOS w przypadku wystąpienia i nie wystąpienia poronienia. Przeprowadzona dwuczynnikowa analiza wariancji dla zmiennej AMH w grupie kobiet z PCOS w zależności od czynników długość cyklu i ciąża nie wykazała istotności statystycznej ($p > 0,05$) (tab. 9). Na podstawie oceny wskaźnika eta-kwadrat cząstkowe (η^2) przyjęto, że w przypadku grupy kobiet z PCOS długość cyklu w większym stopniu wyjaśniła zmienność AMH niż czynnik ciąża, chociaż nie potwierdziła tego zależność statystyczna (ryc. 19.a i b). W celu zbadania zależności pomiędzy stężeniem AMH w grupie kobiet z PCOS a czynnikami: długość cyklu i poronienia zastosowano statystykę analizy wariancji, zbadano interakcję pomiędzy czynnikami oraz obliczono wartość dla eta-kwadrat cząstkowe (tab. 9)

Tabela 8. Zróźnicowanie stężenia AMH i FSH w surowicy krwi w zależności od cech historii rozrodczości u kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej. Wyniki ANOVA.

Zmienność	AMH[ng/ml]			FSH[mIU/ml]				
	n	%	$\bar{x} \pm SD$	F	<i>p</i>	$\bar{x} \pm SD$	F	<i>p</i>
Prawidłowy								
Ciąża								
Tak	79	40,3	2,05 ± 0,66	0,00	0,994	7,53 ± 3,76	1,34	0,250
Nie	11	58,7	2,05 ± 0,65			6,98 ± 2,16		
POF								
Tak	17	42,5	0,50 ± 0,34	1,41	0,243	11,27 ± 16,19	0,58	0,453
Nie	23	57,5	0,61 ± 0,26			8,25 ± 4,50		
PCOS								
Tak	60	39,0	6,24 ± 3,08	0,96	0,329	5,82 ± 1,42	1,13	0,289
Nie	94	61,0	7,23 ± 7,35			6,18 ± 2,00		
Prawidłowy								
Liczba ciąż								
0	11	58,2	2,06 ± 0,65	0,37	0,692	7,01 ± 2,16	1,36	0,261
1	52	26,5	2,10 ± 0,68			7,81 ± 4,37		
≥2	27	13,8	1,96 ± 0,64			6,78 ± 1,76		
POF								
0	23	57,5	0,61 ± 0,26	0,81	0,454	8,25 ± 4,50	0,66	0,525
1	11	27,5	0,47 ± 0,36			12,80 ± 18,87		
≥2	6	15,0	0,54 ± 0,32			7,04 ± 1,79		
PCOS								
0	94	61,0	7,23 ± 7,35	0,92	0,403	6,18 ± 2,00	0,66	0,516
1	42	27,3	5,72 ± 2,50			5,79 ± 1,40		
≥2	17	11,0	7,10 ± 3,75			5,77 ± 1,49		
Prawidłowy								
Liczba poronień								
0	14	74,5	2,00 ± 0,64	3,43	0,034	7,12 ± 2,08	1,53	0,220
1	29	14,8	2,34 ± 0,68			8,02 ± 5,58		
≥2	21	10,7	2,00 ± 0,61			6,46 ± 1,90		
NIR								
0-1			<0,05					
0-≥2			NS					
1-≥2			NS					
POF								
0	29	72,5	0,57 ± 0,29	0,10	0,900	8,16 ± 4,22	2,03	0,148
1	6	15,0	0,54 ± 0,35			18,68 ± 28,20		
≥2	5	12,5	0,514 ± 0,35			7,04 ± 1,79		
PCOS								
0	11	71,4	7,16 ± 6,91	1,10	0,335	6,09 ± 1,92	0,14	0,866
1	32	20,8	5,45 ± 2,08			5,89 ± 1,38		
≥2	12	7,8	7,67 ± 4,26			5,93 ± 1,67		

Tabela 9. Zależność stężenia AMH od długości cyklu menstruacyjnego i ciąży u kobiet z PCOS oraz w grupie kontrolnej oraz długości cyklu menstruacyjnego i poronienia u kobiet z PCOS. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji.

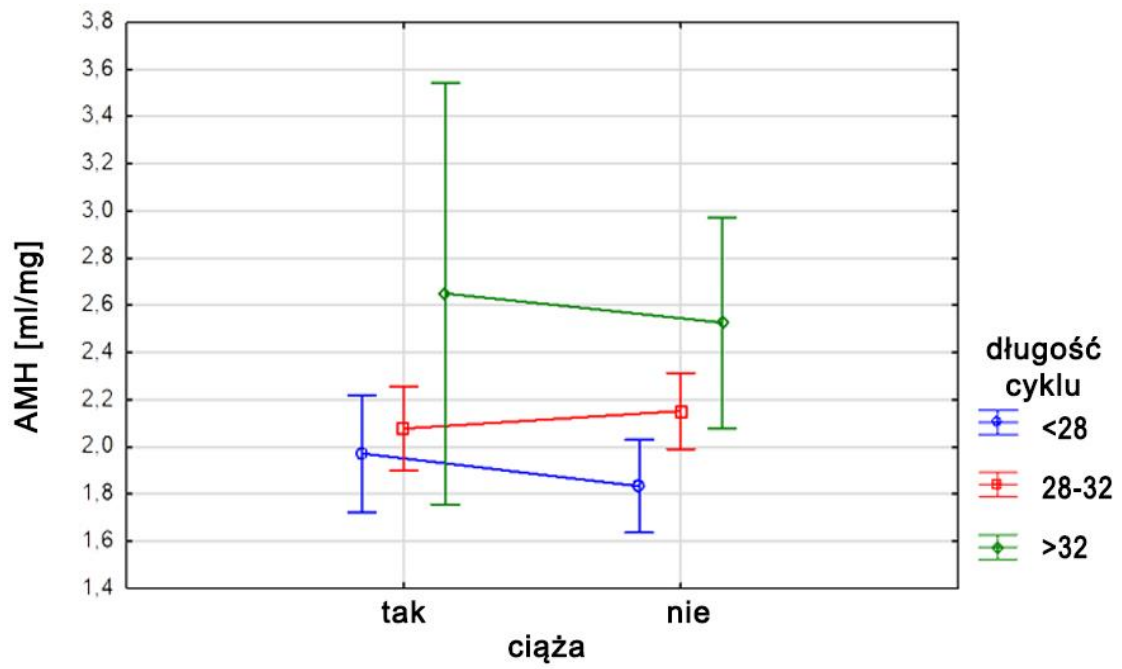
Zmienne	MS*	df	F	<i>p</i>	Eta -kwadrat cząstkowe
Prawidłowy					
Długość cyklu menstruacyjnego	1,84	2	4,49	0,012	0,0471
Ciąża	0,05	1	0,12	0,731	0,0006
Dług.cyklu*cięża	0,24	2	0,59	0,586	0,0064
PCOS					
Długość cyklu menstruacyjnego	57,79	2	1,59	0,208	0,0220
Ciąża	5,31	1	0,14	0,703	0,0010
Dług.cyklu*cięża	1,18	2	0,03	0,968	0,0004
PCOS					
Długość cyklu menstruacyjnego	11,63	2	1,76	0,1819	0,0672
Poronienia	5,35	1	0,81	0,3719	0,0163
Długość cyklu*poronienia	5,52	2	0,84	0,4386	0,0331

MS*- średnia suma kwadratów

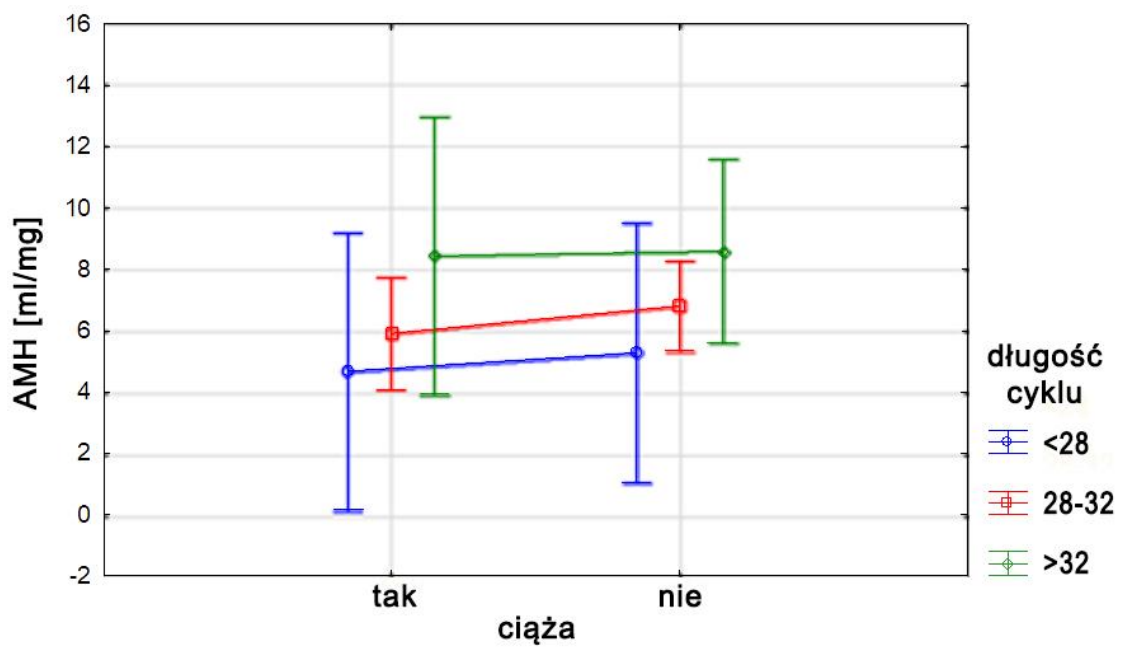
Ze względu na ograniczenia związane z małą liczbą danych w grupie kobiet z POF dla zmiennych: długość cyklu i ciąża oraz długość cyklu i poronienia, nie przeprowadzono analizy wariancji w celu pełnego zbadania zależności statystycznych dla tej grupy.

Czynniki takie jak: długość cyklu i poronienia nie mają istotnego wpływu na zmienną AMH ale nadal największą wartość η^2 wykazuje długość cyklu następnie interakcja długość cyklu i poronienia. W najmniejszym stopniu poziom AMH wykazuje pewne powiązanie ze zmienną poronienia. Zależności te ilustruje rycina 20. Zbyt mała liczba danych dla grupy kobiet z POF nie pozwoliła na przeprowadzenie analizy statystycznej.

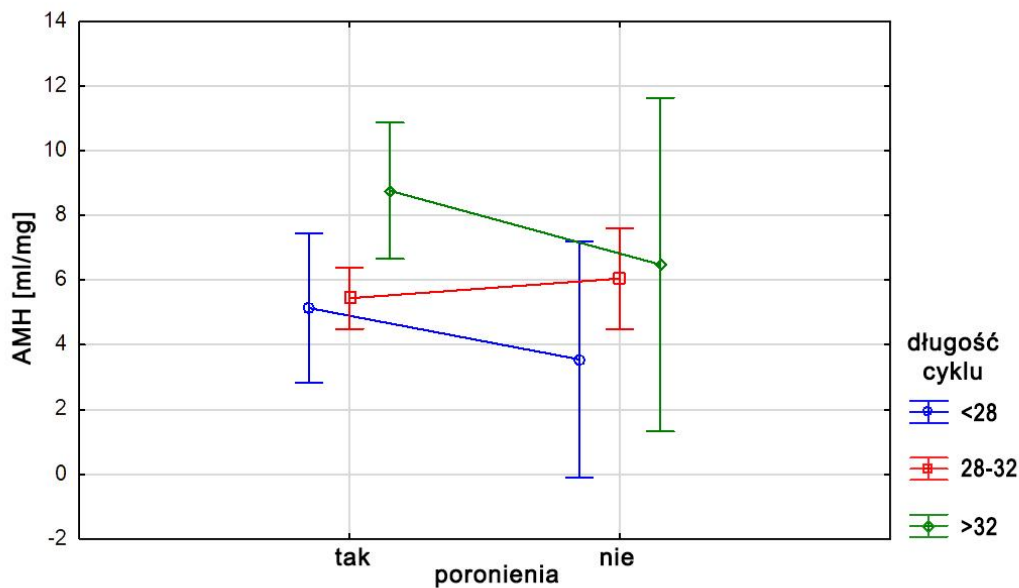
a)



b)



Ryc. 19. Związek stężenia AMH a długością cyklu i ciążą u kobiet ze statusem jajnika:
a) Prawidłowy b) PCOS.



Ryc. 20. Związek stężenia AMH a długością cyklu i wystąpieniem poronień u kobiet z PCOS.

4.2.4. Profile AMH i FSH w zależności od cech somatycznych

W celu zbadania powiązania czynników BMI, WHR i BF% związanych z tkanką tłuszczową oraz jej rozmieszczeniem u kobiet w wieku rozrodczym z AMH, zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Statystyka przeprowadzona dla zmiennej zależnej AMH w grupie kobiet z prawidłową funkcją jajników wykazała, że czynnik WHR określający typ sylwetki ze względu na rozmieszczenie tkanki tłuszczowej: gynoidalny lub androidalny, wpływa istotnie na wartość stężenia AMH w osoczu krwi ($p < 0,05$) w odróżnieniu od procentowego wskaźnika ogólnej zawartości tkanki tłuszczowej BF.

Interakcję pomiędzy analizowanymi czynnikami: WHR i BF% dla zmiennej AMH w grupie kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli 10. Wynik nie był statystycznie istotny. ($p > 0,05$). Stosunek eta-kwadrat cząstkowych dla WHR i BF% w grupie kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników pozwolił oszacować, że WHR 1,4-krotnie bardziej wyjaśnia zmienność AMH niż wskaźnik otluszczenia ciała (BF%).

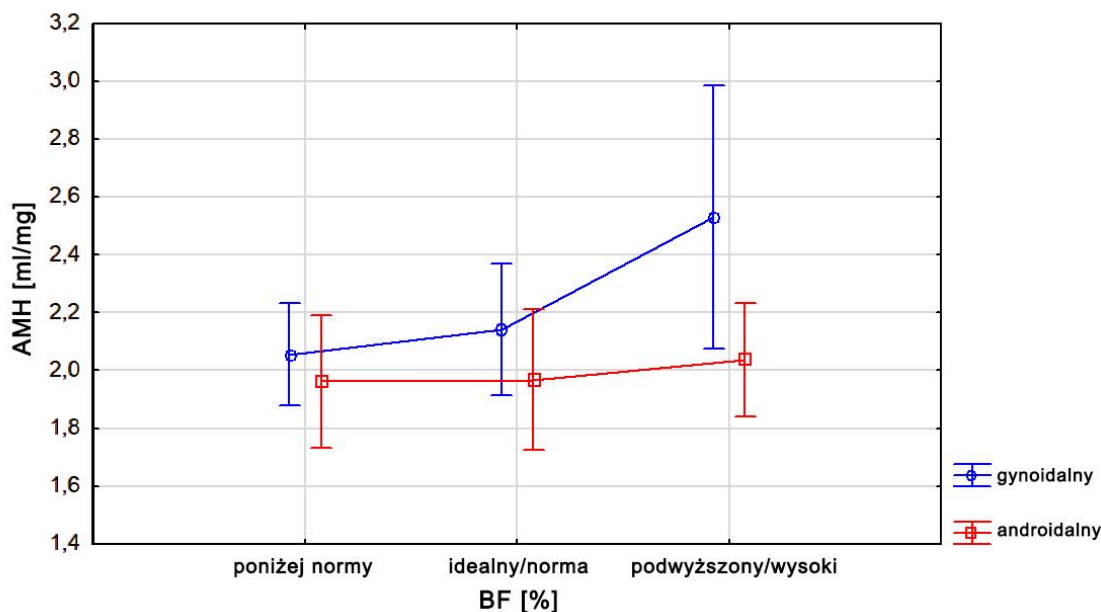
Zależność poziomu stężenia AMH od czynników BF% oraz WHR w grupie kontrolnej zaprezentowano na rycinie 21. Średnie dla AMH w grupie kontrolnej

przyjmują wyższe wartości w przedziale normy referencyjnej dla kobiet z gynoidalnym typem budowy w porównaniu do kobiet z androidalnym typem otłuszczenia, u których średnie wartości stężenia AMH w grupie z niskim, prawidłowym i wysokim stopniem otłuszczenia (BF%) prawie nie różnią się od siebie, pozostając na poziomie ok.2,0 ng/ml.

Tabela 10. Zależność stężenia AMH od czynników WHR i BF% u kobiet z POF, PCOS oraz w grupie kontrolnej. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji.

Zmienna	MS*	df	F	p	Eta -kwadrat cząstkowe
Prawidłowy					
WHR	2,17	1	5,10	0,025	0,0263
BF%	0,77	2	1,82	0,166	0,0188
WHR * BF%	0,40	2	0,94	0,391	0,0098
POF					
WHR	0,01	1	0,10	0,752	0,0030
BF%	0,02	2	0,22	0,802	0,0129
WHR * BF%	0,04	2	0,38	0,984	0,0221
PCOS					
WHR	4,05	1	0,11	0,739	0,0007
BF%	45,34	2	1,25	0,290	0,0166
WHR * BF%	4,99	2	0,14	0,872	0,0018

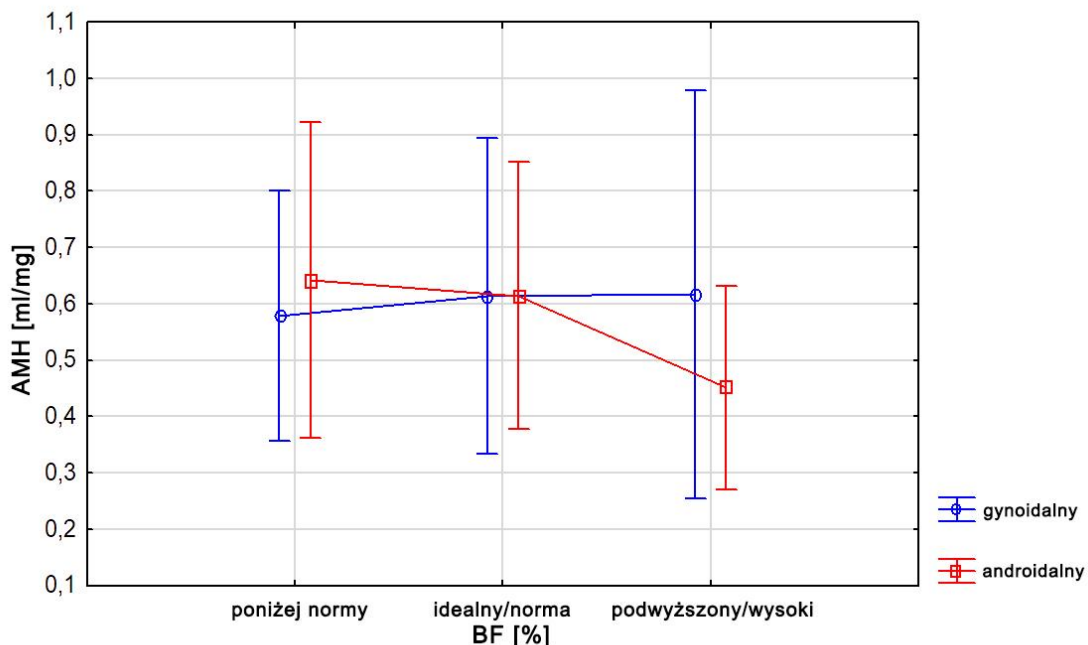
MS*- średnia suma kwadratów



Ryc. 21. Zróżnicowanie stężenia AMH w zależności od WHR i BF u kobiet z prawidłową funkcją jajnika.

Wśród kobiet z POF nie zaobserwowano istotnych zależności pomiędzy stężeniem AMH i wskaźnikami somatycznymi. Ze względu na zbyt małą liczebność grupy z POF nie przeprowadzono analizy ANOVA. Aby zbadać wpływ czynników WHR i BF% na poziom AMH u kobiet z POF wyliczono stosunek eta-kwadrat częściowych, co pozwoliło oszacować, że WHR w stosunku do BF% wyjaśnia zmienność AMH na poziomie wartości 0,23. Odwrotny stosunek eta-kwadrat częściowych wykazał, że BF% ponad 4-krotnie więcej wyjaśnia zmienność AMH w odniesieniu do WHR. Uzyskany wynik jest odwrotny do otrzymanego w grupie kontrolnej kobiet, co może mieć wartość predykcyjną.

Zależność poziomu AMH u kobiet z POF od czynników somatycznych przedstawiono na rycinie 22 ($p > 0,05$). Najniższe średnie wartości AMH zaobserwowano w grupie kobiet z POF z wysoką zawartością tkanki tłuszczowej i androidalnym typem jej rozmieszczenia. Pozostałe wartości średnich nie wykazały istotnych różnic.

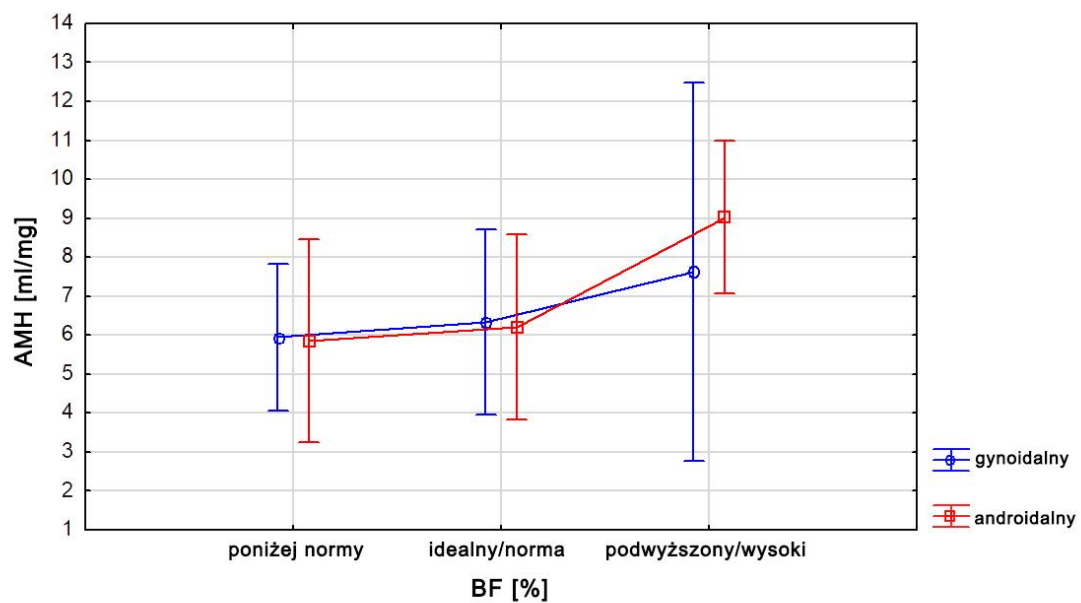


Ryc. 22. Zróżnicowanie stężenia AMH w zależności od WHR i BF u kobiet z POF.

Badanie zależności wybranych czynników somatycznych jak WHR i BF% z poziomem stężenia AMH, przeprowadzone wśród wolontariuszek z PCOS nie wykazały statystycznej istotności (tab. 10.). W grupie badanych kobiet nie odnotowano większych wahań poziomu AMH u kobiet zarówno z gynoidalnym jak i androidalnym typem sylwetki, bez względu na grubość tkanki tłuszczowej.

Wśród kobiet z PCOS wyraźnie podwyższone wyniki poziomu AMH prezentuje grupa z androidalnym typem budowy w przedziale wysokiego stopnia otluszczenia w porównaniu do kobiet z gynoidalnym rozłożeniem tkanki tłuszczowej (ryc. 23). Średnie AMH u kobiet z niskim i prawidłowym udziałem procentowym tkanki tłuszczowej oscylują wokół wartości stężenia 6 ng/ml.

Wynik wskazuje na nieznaczne odchylenie u badanych z wysokim BF%. Podobnie jak w grupie POF, odwrócenie stosunku eta-kwadrat cząstkowych w odniesieniu do grupy kontrolnej wskazało, że BF% odpowiada w stopniu 22-krotnie wyższym za zmienność AMH niż WHR.



Ryc. 23. Zróźnicowanie stężenia AMH w zależności od WHR i BF u kobiet z PCOS.

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

Ważnym argumentem do zrealizowania tematu pracy była potrzeba oceny kondycji rozrodczej kobiet, u których występują zaburzenia prawidłowej funkcji jajnika: POF i PCOS z wykorzystaniem markerów hormonalnych funkcji jajnika: AMH i gonadotropiny FSH.

Zmienność hormonów AMH i FSH jest odpowiedzią organizmu na działanie czynników zarówno wewnętrznych jak i środowiskowych. Może mieć charakter genetyczny lub być skutkiem czy reakcją na działanie różnych bodźców. Podstawowym elementem determinującym zmienność profili hormonalnych jest czynnik wieku. Starzenie reprodukcyjne to proces, który obok innych czynników biologicznych, najsilniej determinuje wygasanie zdolności reprodukcyjnej. Zbadanie zmienności międzyosobniczej na podstawie wskaźników rezerwy jajnikowej AMH i FSH u pacjentek z dysfunkcją jajników jak POF i PCOS na tle grupy kontrolnej w zależności od wybranych czynników jest przedmiotem niniejszej pracy.

Ograniczenia interpretacyjne wyników badań.

Dyskusję uzyskanych wyników pragniemy poprzedzić wskazaniem pewnych ograniczeń interpretacyjnych z doboru próby. Nie jest on w pełni losowy, gdyż takim nie może być próba kliniczna. Tworzą ją kobiety z POF i z PCOS. Dostępne w literaturze opracowania dotyczące AMH, bazują w znaczącej większości na danych z ośrodków klinicznych leczących zaburzenia płodności, do których zgłosiły się pacjentki (Sova i wsp. 2019).

Mocną stroną pracy jest liczebność próby, istotnie wyższa w porównaniu z innymi badaniami, co czyni analizy statystyczne bardziej wiarygodnymi niż w przypadku kilkunastu kobiet, stanowiących obiekt badań innych autorów (Sowers i wsp. 2010; Randolph i wsp. 2014; Guedikian i wsp. 2018). Należy wspomnieć, że najmniej liczna w porównaniu do grupy z PCOS i kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami, była grupa kobiet z POF co tłumaczy brak możliwości przeprowadzenia pełnej analizy statystycznej i wystąpienie luk w niektórych wynikach w odniesieniu do nielicznych opracowań medycznych, gdzie liczebność próby badawczej była bardzo mała. W związku z tym zebrane w tej pracy dane dotyczące POF wydają się być satysfakcjonujące.

Kolejną mocną stroną pracy jest jej wieloaspektowość. Temat pracy opracowano na podstawie zbadania związków i zależności pomiędzy hormonami AMH i FSH a czynnikami modulującymi ich zmienność u kobiet z dysfunkcją jajników na tle grupy z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. Badania nie ograniczają się do jednej zmiennej, ponieważ temat z założenia ujęto w sposób kompleksowy. Uwzględniono różne zmienne: zarówno te dotyczące fizjologii jajników jak również te związane ze statusem socjoekonomicznym i stylem życia.

Praca ma charakter przekrojowy ze względu na czas i zakres przeprowadzonych badań empirycznych, które narzuca sam tryb pisania rozprawy doktorskiej. Jest to metoda badawcza najbardziej rozpowszechniona w pracach naukowych i włącza się w nurt metod opisowych (Kaczmarek, Wolański 2018). Badania longitudinalne prezentują szerszy aspekt poznawczy jednak ich przeprowadzenie wymaga rozłożonego w czasie dostępu do materiału badawczego.

Retrospektywne podejście do niektórych aspektów, czy też niepewność co do udzielania przez kobiety rzetelnych odpowiedzi na pytania zawarte w kwestionariuszu ankietowym, było pewnym ograniczeniem dla trafności otrzymanych wyników. Należy podkreślić satysfakcjonujący poziom realizacji próby (ang. *total response rate*), gdzie wszystkie rozdysponowane ankiety wróciły do badacza (Kaczmarek i Wolański 2018).

Podczas wykonywania pomiarów antropometrycznych mogły wystąpić drobne nieścisłości związane z dokładnością otrzymanych wyników. Należy wziąć pod uwagę zmiany zachodzące w organizmie ze względu na zmianę pory roku (temperatura otoczenia, dieta, kondycja psychosomatyczna), co może przekładać się na drobne fluktuacje wyników pomiarów.

Pewnym ograniczeniem mogą być zmienne wzorce wydzielania AMH i FSH oraz pewne nieścisłości interpretacyjne, dotyczące różnic w poziomach odcięcia punktów dla norm referencyjnych wyznaczone przez laboratoria współpracujące z ośrodkami klinicznymi, gdzie prowadzono badania. Temat ten jest przedmiotem dyskusji badaczy na świecie, bowiem brak międzynarodowych standardów uniemożliwia przyjęcie ujednoczonych zakresów referencyjnych dla badanych hormonów, szczególnie w odniesieniu do AMH (Sova i wsp. 2019).

Możliwość wystąpienia osobniczej zmienności poziomów AMH i FSH w cyklu menstruacyjnym u kobiet z prawidłową funkcją jajnika nie wpływa znacząco na rzetelność uzyskanych wyników, co potwierdzają w pracach inni autorzy (Cook i wsp.

2000; Wunder i wsp. 2008; Streuli i wsp. 2009; Hadlow i wsp. 2010; Sowers i wsp. 2010; Zec i wsp. 2010; Robertson i wsp. 2011; Overbeek i wsp. 2012; Randolph i wsp. 2014).

5.1. Zmienność hormonów AMH i FSH i historia rozrodczości

Zmienność AMH i FSH z wiekiem

Okres rozrodczy kobiety trwa około 30 lat aż do całkowitego wyczerpania rezerwy jajnikowej. Wraz z wiekiem następuje involucja w obrębie gonad, obniża się ich aktywność endokrynną oraz sprawne funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jajniki (Kaczmarek i Wolański 2018). Coraz słabsza odpowiedź ze strony przysadki mózgowej jest wynikiem zmniejszającej się rezerwy jajnikowej i stopniowego wygasania negatywnego sprzężenia zwrotnego w osi płciowej (Klein i wsp. 1996). W późniejszym okresie życia reprodukcyjnego wzrasta tempo utraty pęcherzyków jajnikowych co ma odzwierciedlenie w odwróceniu stosunku pęcherzyków wzrastających do pęcherzyków pierwotnych. Sytuacja ta znajduje odzwierciedlenie w zmianach poziomów stężenia markerów rezerwy jajnikowej - AMH i FSH. Istnieją hipotezy, że względne wzrosty szybkości aktywacji pierwotnych pęcherzyków mogą być powodem utrzymania większej puli pęcherzyków antralnych i zwiększenia szansy na wybór najlepszego oocytu (Faddy i Gosden, 1995). Inni autorzy są zdania, że proces wyczerpywania się rezerwy jajnikowej jest tylko nieznacznie przyspieszony, niektórzy zaś sądzą, że starzenie reprodukcyjne odbywa się liniowo i na stałym poziomie (Rosen i wsp. 2012). Postępujące wyczerpywanie pojemności reprodukcyjnej jajnika oraz zmiany w gonadach, związane z ich dysfunkcją można ocenić na podstawie zmienności poziomów AMH i FSH.

Dotychczasowe prace rzadko poruszały aspekt zmienności AMH i FSH w odniesieniu do wieku kobiety. W najnowszej literaturze przedmiotu badacze coraz częściej podejmują ten wątek (Pankhurst i wsp. 2013; Pankhurst i wsp. 2016; Pankhurst 2019; Urrutia i wsp. 2019; Sova i wsp. 2019).

Na podstawie badań własnych stwierdzono wyraźną zmienność AMH i FSH w zależności od wieku u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. Należy podkreślić wagę AMH, który jako marker wykazał w niniejszym badaniu wyższą czułość i mniejsze fluktuacje w porównaniu do standardowo wykorzystywanego we wstępnej diagnostyce - FSH, co zostało potwierdzone w pracach innych autorów

(Fanchini wsp. 2005; Kumar i wsp. 2010; Randolph i wsp. 2014). Rosen z zespołem potwierdza powyższe stwierdzenie, zwracając uwagę na możliwość bezpośredniego pomiaru liczby pęcherzyków jajnikowych, wgląd w jakość oocytów oraz oznaczenie funkcjonalnej pojemności jajników. Aby to zbadać, wymagana jest minimalna liczba pomiarów z minimalnym ograniczeniem czasowym (Rosen i wsp. 2012).

W pracy wykazano, że kobiety z trzech badanych grup różniły się istotnie pod względem poziomu hormonów AMH i FSH w trzech przedziałach wieku. Uzyskano potwierdzenie, że wiek jest czynnikiem determinującym zmienność profili AMH i FSH u kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników co jest zgodne z wynikami innych autorów jednak tylko w odniesieniu do AMH (Bragg i wsp. 2012, Pankhurst i wsp. 2016). We wcześniejszych pracach rzadko kategoryzowano grupę badawczą pod względem wieku czy też statusu funkcjonowania jajnika, co mogłoby podnieść dokładność uzyskanych wyników (Hambridge i wsp. 2013).

Otrzymane w pracy wyniki analizy regresji wskazują, że poziom AMH zmniejszał się liniowo z wiekiem, podczas gdy FSH w małym stopniu podlegał fluktuacjom, szczególnie u kobiet z dysfunkcją jajników. Potwierdzono tym samym dotychczasowe ustalenia, że poziom FSH wzrasta tuż przed wystąpieniem menopauzy. Badane kobiety (36-46 lat), poza tymi z POF, były przed fizjologiczną menopauzą.

Według Pawelczyka z zespołem (2003) wiek w dużym stopniu wpływa na zwiększenie ryzyka wystąpienia zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu jajników co znalazło potwierdzenie w niniejszej pracy w odniesieniu do grupy kobiet z POF, gdzie częstość występowania krytycznie niskiego poziomu AMH zwiększyła się dwukrotnie w najstarszej grupie badanych w porównaniu do kobiet w wieku 31-35 lat, gdzie czułość markera FSH okazała się być satysfakcjonująca. Nie zaobserwowano w tej grupie wiekowej statystycznej różnicy w poziomach AMH i FSH w porównaniu średnich wartości u kobiet z POF jak i w grupie kontrolnej, jednak w przypadku AMH różnica wydaje się być wyraźna.

Ograniczona liczba pęcherzyków jajnikowych zmniejszająca się z wiekiem, co znajduje odzwierciedlenie w spadku poziomu stężenia AMH w surowicy krwi oraz wzrost poziomu gonadotropiny FSH w odpowiedzi na słabą reakcję ze strony jajnika w osi przysadka-podwzgórze-jajniki (Lambalk i wsp. 2009).

Wyniki otrzymane w pracy potwierdzają to stwierdzenie, bowiem poziom AMH odzwierciedlał zmniejszający się z wiekiem potencjał rozrodczy, co ma związek

z postępującą atrezią pęcherzyków jajnikowych podczas folikulogenezy. W pierwotnych pęcherzykach aktywacja AMH odbywa się drogą autokrynną, co prezentują śladowe ilości stężenia w komórce lub parakrynnie, działając na sąsiadujące komórki. System parakrynnny jest o rząd wielkości słabszy niż autokrynnny z powodu relatywnie śladowej sekrecji AMH, która dodatkowo ulega wygaszeniu w związku utratą koncentracji ze względu na odległość (McLaughlin i McIver 2009). Według innych autorów sygnalizacja autokrynnna AMH w pęcherzykach pierwotnych nie jest niezbędna dla funkcji związanych z aktywacją pęcherzyków, bowiem AMH jest parakrynnym regulatorem aktywacji pęcherzyków i oddziałuje na tkanki plejotropowo z udziałem licznych czynników regulatorowych (Massague 2012). Na wczesnym etapie folikulogenezy nie występuje interakcja AMH-FSH, która zostaje włączona w stadium okołoaantralnym (Visser i wsp. 2007; Visser i Themmen 2014).

W grupie kobiet najmłodszych oraz w przedziale wiekowym 31-35 lat nie zaobserwowano różnic w średnich wartościach stężeń FSH pomiędzy kobietami z PCOS oraz POF z kontrolą oraz w porównaniu grupy POF z PCOS podczas gdy wystąpienie różnic na wysokim stopniu istotności statystycznej w tym samym badaniu potwierdziły wyniki AMH. Wyjątek stanowiło porównanie średnich FSH u kobiet z PCOS i z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami w przedziale 31-35 lat, gdzie zaobserwowano różnicę.

Zmienność rezerwy jajnikowej jest konsekwencją rozwoju jajników ssaków w toku ewolucji (Lambalk i wsp. 2009). Zmiany są szczególnie widoczne pod koniec aktywności reprodukcyjnej kobiety. W pracy wykazano, że w grupie kobiet z POF w wieku 36-46 lat wystąpiła istotna statystycznie różnica ($p < 0,05$), dotycząca podwyższonego stężenia FSH w porównaniu do grupy kontrolnej. Niski poziom AMH wykazał że w niedługim czasie nastąpi całkowite wygaśnięcie czynności jajników.

Jeśli przyjąć za innymi badaczami, że poziom hormonów AMH i FSH pośrednio odzwierciedlają liczbę pęcherzyków jajnikowych (rezerwę jajnikową), to wyniki niniejszej pracy wykazały, że czułość FSH okazała się być słabsza w odniesieniu do AMH (Visser i Themmen 2014). Dysfunkcje ze strony jajnika jak POF czy PCOS mogą być wynikiem zaburzeń natury genetycznej, molekularnej lub strukturalnej i często są przyczyną problemów z zajściem w ciążę czy niepłodnością.

Zmienność AMH i FSH w POF

POF charakteryzuje się typowymi objawami, które występują podczas naturalnej menopauzy. Kobiety z wrodzoną niską początkową pulą pęcherzyków jajnikowych będą narażone na wcześniejsze zakończenie życia reprodukcyjnego. Jak wskazują nieliczne badania, brak hamującego wpływu AMH na rekrutację pęcherzyków pierwotnych prowadzi do zachwiania kondycji rozrodczej i wcześniejszego zakończenia okresu rozrodczego (Carlson i wsp. 2006). Potwierdziły to również wyniki niniejszej pracy. W przypadku kobiet z POF wyjściowa pula pęcherzyków jajnikowych była znacznie niższa w porównaniu z grupą z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami co potwierdził obniżający się z wiekiem poziom AMH. U kobiet z PCOS stwierdzono wzrost poziomu stężenia AMH w trzech analizowanych przedziałach wieku ($p < 0,01$).

Wyniki analizy stężenia AMH u kobiet z POF ($p < 0,0001$) uzyskane przez Urrutia i zespół (2019) są zgodne z wynikiem otrzymanym w niniejszej pracy ($p < 0,05$). Zmieniający się z wiekiem stosunek liczby pęcherzyków primordialnych i pierwotnych do liczby rzadziej występujących pęcherzyków w stadium preantralnym i antralnym powoduje, że obniża się poziom AMH i pęcherzyki w dużym procencie degenerują. W konsekwencji następuje zmniejszenie objętości jajników i przyspieszone wyłączenie ich aktywności. (Urrutia i wsp. 2019).

Do wystąpienia POF może się przyczynić szereg zaburzeń endokrynych i metabolicznych, związanych ze słabą odpowiedzią ze strony osi płciowej podwzgórze-przysadka-jajniki. Podniesiony poziom FSH jest odpowiedzią na słaby rozwój pęcherzyków podczas folikulogenezy. Niewystarczający poziom E_2 promuje zwiększoną sekrecję FSH, powodując zmianę proporcji LH do FSH, obniżenie poziomu globuliny wiążącej hormony płciowe oraz w konsekwencji zaburzenie owulacji czy wystąpienie cykli bezowulacyjnych.

Na podstawie stężenia AMH i FSH w grupie kobiet z POF zaobserwowano, że aż 60% badanych w przedziale wieku 36-46 lat ma krytycznie wyczerpaną rezerwę jajnikową w porównaniu do młodszych kobiet. Przeprowadzona obserwacja zmienności AMH i FSH u kobiet z POF pozwoliła stwierdzić, że AMH jest lepszym markerem odzwierciedlającym przyspieszoną utratę pęcherzyków jajnikowych wśród badanych kobiet. Na podstawie poziomu AMH stwierdzono, że najmłodsza grupa wiekowa 23-30 lat ($0,72 \pm 0,20$ vs. $2,42, \pm 0,69$ g/ml) prezentowała mniejszą pulę pęcherzyków jajnikowych niż kobiety w grupie kontrolnej. Różnice w stężeniach AMH

u kobiet z POF, w porównaniu do grupy kontrolnej w kolejnych przedziałach wieku, okazały się nie być statystycznie istotne ($p > 0,05$), chociaż wyraźne. Porównanie stężeń FSH w grupie najmłodszych i w średnim wieku kobiet z POF w odniesieniu do grupy kontrolnej nie wykazało istotnych różnic. Należy jednak podkreślić, że grupa kobiet z POF w porównaniu z grupą PCOS i kontrolną, miała najmniejszą liczebność.

W niniejszej pracy analizowano szereg zmiennych mogących mieć wpływ na zmienność stężenia AMH i FSH u kobiet z POF. O ile FSH jest parametrem endokrynnym dobrze poznanym, to fizjologiczna rola AMH oddziałująca na tkanki parakrynnie jest jak dotąd nieznaną. Czasteczka prekursorowa AMH wydaje się być regulowana fizjologicznie poprzez różne miejsca cięć podczas jej aktywacji. Jest to jeden z systemów biologicznego modulowania zmienności międzyosobniczej związanej z płcią (Pankhurst i wsp. 2013; Pankhurst i wsp. 2016). W pobranych próbach krwi są obecne dwa rodzaje AMH: AMH_{N,C} oraz proAMH (Pankhurst i wsp. 2016). Są one praktycznie nierozpoznawalne dla standartowych oznaczeń laboratoryjnych. Nieaktywna forma proAMH nie ma możliwości aktywacji receptora (di Clemente i wsp. 2010).

U kobiet z POF następuje przyspieszona menopauza, która w sposób fizjologiczny ogranicza możliwość prokreacji. Jest to związane przede wszystkim ze stopniowym wygasaniem cyklu menstruacyjnego.

Szybkość i liczba aktywowanych oraz podlegających atrezji pęcherzyków, jest modulowana przez czynniki regulatorowe, głównie AMH. Pozwala to na optymalizację zarządzania potencjałem rozrodczym podczas okresu reprodukcyjnego w życiu kobiety. Pankhurst (2017) przedstawił ciekawą hipotezę odnoszącą się do założenia, że kobiety z dużą rezerwą jajnikową posiadają efektywne mechanizmy regulatorowe hamujące pierwotną aktywację pęcherzyków jajnikowych w celu przedłużenia okresu reprodukcyjnego i zachowania wysokiej płodności. Słaba perspektywa zachowania długiego okresu reprodukcyjnego wobec niskiej rezerwy jajnikowej u kobiet z POF i relatywnie wczesnego jej wyczerpania została wyjaśniona faktem, że niskie stężenie AMH promuje przyspieszoną rekrutację pierwotnych pęcherzyków jajnikowych. Może to poprawić sprawność reprodukcyjną ale w stosunkowo krótszym czasie w porównaniu do kobiet z prawidłową funkcją jajników. Jest to pewien koszt utrzymania płodności w przypadku POF (Pankhurst 2017). Brak mocnego sygnału ze strony AMH powoduje wzrost stężenia FSH co aktywuje kaskadę sprzężeń zwrotnych

i możliwość wystąpienia owulacji. Modułacja pierwotnych wskaźników rekrutacji za pośrednictwem AMH może być ważne dla zarządzania potencjałem reprodukcyjnym przez całe życie kobiety.

Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki pokrywają się z wynikami innych autorów. Analiza AMH w grupie kobiet z POF w trzech klasach wieku: 23-30, 31-35 i 36-46 lat wykazała, że stężenie AMH w surowicy krwi w najmłodszej grupie kobiet było 3,4 razy niższe niż w grupie kontrolnej. Ta tendencja została również potwierdzona w przedziale wiekowym 31-35 lat gdzie badane z POF wykazały 3,3 razy niższy poziom tego hormonu w porównaniu z grupą z prawidłową funkcją jajnika. Natomiast w najstarszej grupie różnica w stężeniach AMH zwiększyła się, bowiem odzwierciedla liczbę pęcherzyków w jajnikach. Zaobserwowano spadek stężenie AMH z wiekiem, co jest zgodne z pracami poprzedników. Poziom hormonu był 3,8 razy niższy w grupie badanych z POF w odniesieniu do kontroli. Istnieje prawdopodobieństwo, że ze względu na zbyt małą liczebność badanych w analizowanych grupach wiekowych oraz niewystarczającą czułość testu *post-hoc*, analiza nie wykazała różnicy statystycznej w poziomie AMH pomiędzy grupą z POF i kobietami zdrowymi w analizowanych przedziałach wieku ($p > 0,05$). Przyspieszone wygasanie rezerwy jajnikowej w najstarszej grupie badanych z POF potwierdza wyraźnie podwyższony w stosunku do kontroli, poziom FSH. Jest on 1,5 razy wyższy w porównaniu do grupy z prawidłową funkcją jajnika ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnicy w stężeniach FSH w porównywanych grupach kobiet z POF i prawidłowo funkcjonującymi jajnikami w średnim przedziale wieku a w najmłodszej grupie była ona nieznaczna.

FSH jest niezbędnym czynnikiem odpowiadającym za wzrost komórek ziarnistych w pęcherzyku i warunkującym prawidłowo przebiegającą rekrutację do kolejnych stadiów rozwoju, a następnie selekcji pęcherzyków antralnych. Warunkuje to prawidłowy przebieg cyklu menstruacyjnego w regularnych odstępach czasu. Niektórzy autorzy utrzymują, że obecność FSH jest również niezbędna w aktywacji pęcherzyków pierwotnych wbrew przyjętej ogólnie koncepcji stadium wzrostu pęcherzyków FSH-niezależnych (Meduri i wsp. 2008). FSH pełni wraz z androgenami oraz czynnikami pozajajnikowymi ważną rolę w jakościowym i ilościowym monitorowaniu podstawowej fazy wzrostu pęcherzyków podczas folikulogenezy. Obecnie fazę tę określa się jako FSH-odpowiadającą lub FSH-zależną. Wobec zmniejszonej ilości lub

braku FSH zmniejsza się wydajność pęcherzykowa (Dewailly i wsp. 2016, Kumar i wsp. 2018).

Proces folikulogenezy oraz dokładne ścieżki molekularne wpływające na promowanie pęcherzyków i owulację oraz czynniki wpływające na występowanie zaburzeń związanych regularnością cykli miesięczkowych nie są jeszcze dokładnie poznane.

Badania stężenia FSH w odniesieniu do regularności występowania miesiączek nie wykazały istotnych statystycznie zależności. Warto zwrócić uwagę na zależność pomiędzy występowaniem regularnych miesiączek i stężeniem AMH u kobiet z POF, PCOS i w grupie kontrolnej. U kobiet z POF i w kontroli nie zaobserwowano zależności pomiędzy stężeniem AMH i regularnością występowania cykli menstruacyjnych, podczas gdy w przypadku grupy badanych z PCOS takie powiązanie wystąpiło ($p < 0,05$). Średnia poziomu stężenia AMH u kobiet nieregularnie miesiączkujących była istotnie wyższa ($8,80 \pm 5,22$ ng/ml) w porównaniu do badanych z regularną miesiączką ($6,25 \pm 6,22$ ng/ml) ($p < 0,05$).

Poziom AMH i FSH u kobiet z POF nie zależał od wieku menarche. U kobiet z menarche po 14 roku życia poziom AMH był o prawie połowę niższy ($0,34 \pm 0,33$ ng/ml) w porównaniu do badanych z menarche wieku 12-14 lat ($0,60 \pm 0,30$ ng/ml). Nie wykazano wprawdzie istotnych statystycznie różnic ale tendencja do niższych poziomów AMH u kobiet, które późno zaczęły miesiączkować, wskazuje kierunek zmian.

Zmienność hormonów AMH i FSH w PCOS

Negatywny wpływ skumulowanych czynników endo- i egzogennych może doprowadzić do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu jajników i być przyczyną powszechniej występującej wśród pacjentek w wieku rozrodczym endokrynopatii-PCOS. Zaburzenie to charakteryzuje wysokie stężenie AMH i androgenów co blokuje przejście pęcherzyków do dalszego etapu rozwoju oraz ich kumulację w stadium preantralnym wczesnym antralnym podczas folikulogenezy (Carlsen i wsp. 2009; Cessar i wsp. 2014; Pigny i wsp. 2003; Piltonen i wsp. 2005). Catteau-Jonard (2008) udowodnił, że w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych podniesiona jest ekspresja AMH mRNA, co skutkuje nie tylko nadprodukcją tego hormonu ale również

zwiększeniem masy warstwy granulozy co jest charakterystyczne dla morfologii jajników w PCOS. Podobne obserwacje opisali inni autorzy (Eldar-Geva i wsp. 2005; Homburg i wsp. 2013; Tal i wsp. 2014). AMH oddziałuje parakrynnie na komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka, inicjując obecność receptorów AMHR-II w warstwie ziarnistej. Powoduje to zaburzenie kruchej równowagi hormonalnej i w konsekwencji wystąpienie PCOS (Ingraham i wsp. 2000).

Badania kliniczne przeprowadzone przez zespół Guedikian dotyczyły grupy 7 kobiet z PCOS w wieku 20-34 lata i BMI w normie, u których zaobserwowano dwukrotnie podwyższony poziom AMH ($14,8 \pm 2,6$ ng/mL) w odniesieniu do grupy kontrolnej dopasowanej pod względem wieku i normy BMI ($p < 0,01$) (Guedikian i wsp. 2018). Przeprowadzone badanie dotyczyło kobiet w przedziale wiekowym 23-30 lat i potwierdzono w nim wyniki przedstawione przez zespół Guedikian. Należy podkreślić znacznie wyższą liczebność grupy badawczej ($n=390$) gdzie PCOS występował u 39,4% kobiet. Uzyskany wynik wykazał, że średnie stężenie AMH w młodszej grupie zbadanych kobiet z PCOS ($n=43$) było również 2,5 razy wyższe niż w grupie kontrolnej ($n=36$) natomiast wśród kobiet pomiędzy 31 a 35 rokiem życia wystąpiła tendencja wzrostowa dysproporcji i zaobserwowano 3,2 razy większe stężenie hormonu. Poziom AMH wśród kobiet z PCOS w wieku 36-46 lat jest 4,1 razy większe niż u kobiet z prawidłową funkcją jajników. Jak pokazały powyższe analizy, czynnik wieku badanych kobiet odgrywał ważną rolę w uzyskanych wynikach, co nie było uwzględniane w dotychczasowych publikacjach.

Wyjaśnienie związku AMH z symptomami PCOS wymaga dodatkowych badań. o stabilności hormonalnej w pęcherzyku jajnikowym decyduje wiele czynników związanych z regulacją przemian troficznych jak na przykład FSH. Aby dokładniej zbadać aktywność jajników w niniejszej pracy, oprócz markera AMH przyjęto drugi wskaźnik standardowo wykorzystywany do oceny aktywności jajników - FSH. Pozostaje on w ujemnej korelacji z AMH ($p < 0,05$) (Pigny i wsp. 2003). Sowers z zespołem (2010) uzyskali zbliżone wyniki badania. Analiza stężenia AMH u 20 nieregularnie miesiączkujących (co może już świadczyć o pewnej dysfunkcji czynności jajników) kobiet w przedziale wieku 20-30 lat również nie potwierdziła wzoru starzenia się jajników zgodnego z wiekiem chronologicznym (Sowers i wsp. 2010). Podobną tendencję w grupie kobiet z PCOS zaobserwował Sova z zespołem (2019), który również potwierdził negatywną korelację pomiędzy markerami kondycji jajników:

AMH i FSH ($r=-0,13$, $p<0,05$) jednak badanie dotyczyło tylko grupy kobiet z PCOS, gdzie średnia wieku wynosiła 28,1 lat ($n=319$) i 26 lat dla kobiet zdrowych ($n=96$). W grupie kobiet z PCOS w odniesieniu do kontroli nie wykazano istotnej różnicy na podstawie stężenia FSH, podczas gdy bardziej czuły marker rezerwy jajnikowej - AMH wykazał taką różnicę na wysokim poziomie istotności ($p<0,001$) (Sova i wsp. 2019).

W literaturze przedmiotu brakuje porównywalnych badań oceniających profile hormonalne wśród kobiet w wieku rozrodczym z dysfunkcją jajnika jak również brak kompleksowych danych dla kobiet z prawidłową czynnością jajników. Zbliżone analizy dotyczą wybranej grupy związanej z dysfunkcją jajników raczej w aspekcie pojedynczej endokrynopatii.

Otrzymane w niniejszej analizie wyniki stężenia AMH i FSH wykorzystano do porównania grupy kobiet z PCOS ($n=69$) i kontroli ($n=79$) w wieku 31-35 lat. Zarówno w tej jak i w pozostałych grupach wiekowych kobiet z PCOS ($n=154$) nie wykazano tendencji obniżania się poziomu FSH z wiekiem ($6,0\pm 2,00$) mIU/ml. Wyniki uzyskane przez Grossman i wsp. (2008) wskazywały na wzrastanie poziomu AMH u kobiet z PCOS w badanej grupie w wieku 28-37 lat. Zwiększony poziom AMH odpowiada za wzmożoną rekrutację i wzrost pęcherzyków pierwotnych. Hormon poprzez inhibicję receptorów FSHR blokuje działanie FSH-zależnej aromatazy (CYP19), co powoduje zmniejszony poziom E_2 . Podanie egzogennej AMH w hodowanych kulturach komórek granulocyty nie wpłynęło na proliferację komórek ziarnistych zarówno w obecności jak i bez udziału FSH. Inni autorzy zakładają, że zawarte w płynie pęcherzykowym inhibitory endogenne są powodem zaburzenia prawidłowej syntezy E_2 (Jakimiuk i wsp. 1999).

Przyjęte w tej pracy kategorie wieku: 23-30, 31-35 oraz 36-46 lat umożliwiły dokładniejsze prześledzenie fluktuacji stężenia FSH w odniesieniu do grupy z prawidłową funkcją jajników. Okazało się, że wysoce istotna statystycznie różnica ($p<0,01$) wystąpiła jedynie w grupie kobiet 31-35 lat, podczas gdy w najmłodszej i najstarszej grupie nie zaobserwowano różnic pomiędzy poziomem FSH u kobiet z PCOS a badanymi z prawidłową funkcją jajnika. Wzrost stężenia AMH z wiekiem nie był ujemnie skorelowany z FSH u kobiet 36-46 lat. Przemawia to za większą wartością predykcyjną AMH w szacowaniu kondycji biologicznej jajników. Według niektórych autorów to wzmożona inhibicja FSH poprzez AMH jest powodem dysfunkcji jajników (Jonard i Devailly 2004).

W literaturze przedmiotu pojawiły się interesujące doniesienia, mówiące o tym, że niższy poziom AMH (w zakresie stężeń referencyjnych) jest skorelowany z podwyższonym ryzykiem wystąpienia syndromu metabolicznego u pacjentek z PCOS natomiast u kobiet bez objawów PCOS rośnie ryzyko wystąpienia chorób sercowo – naczyniowych (Feldman i wsp. 2017; de Kat i wsp. 2017).

Hormony AMH i FSH są czułymi markerami opisującymi fizjologiczną zmienność związaną ze starzeniem reprodukcyjnym jak również zmienność związaną z nieprawidłowym funkcjonowaniem gonad u kobiet z POF i PCOS.

AMH i FSH a wybrane cechy okresu rozrodczości u kobiet z POF i PCOS

Aby zbadać okres rozrodczości u kobiet z POF i PCOS dokonano analizy takich cech jak: wiek menarche, regularność miesiączkowania, długość cyklu, liczba poronień czy liczba urodzonych dzieci oraz poziomu AMH i FSH. Dane porównawcze okazały się niepełne, bowiem wyniki innych autorów dotyczyły tylko wybranych cech i grupy kobiet z PCOS lub z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami bez podziału na grupy wieku.

Jedno z obszerniejszych badań przeprowadził Bragg z zespołem (2012). Autorzy ocenili wpływ cech cyklu menstruacyjnego oraz diety na zmienność AMH i FSH. Wyniki uzyskane przez Bragg sugerują, że u kobiet z prawidłową funkcją jajników i z wcześniejszą menarchą, stężenie AMH było istotnie wyższe niż młodych kobiet, które rozpoczęły miesiączkowanie w wieku 12-14 lat ($p < 0,05$)

Wyniki uzyskane przez Dólleman (2013) były odmienne od przedstawionych w niniejszym badaniu, w którym uwzględniono regularność miesiączkowania i średnie wartości dla AMH z wyłączeniem czynnika wieku. W przypadku badanych z PCOS poziom AMH był wyższy u kobiet nieregularnie miesiączkujących w porównaniu do kobiet z regularną miesiączką co znalazło potwierdzenie także w odniesieniu do grupy kontrolnej. Badania przeprowadzone przez zespół Dólleman (2013) wykazały, że nieregularne cykle miesiączkowe w grupie z PCOS są skorelowane z niższym poziomem AMH w porównaniu do kobiet regularnie miesiączkujących ze średnią wieku $44,6 \pm 9$ lat. Autorzy sugerują, że otrzymany wynik dla AMH dotyczący kobiet z nieregularną miesiączką może mieć częściowo związek z wystąpieniem perimenopauzy u niektórych kobiet w grupie badawczej. Hagen z zespołem (2012)

stwierdzili wyższy poziom AMH u kobiet z PCOS i brakiem regularnej miesiączki w porównaniu z badanymi z regularnym miesiączkowaniem w grupie kobiet ze średnią wieku 26,6 lat, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi w niniejszym badaniu. Odwrotną zależność zaobserwowano u kobiet z POF nieregularnie miesiączkujących, u których poziom AMH był niższy w porównaniu do badanych z regularnym cyklem menstruacyjnym.

Długość cyklu jest regulowana przez hormony AMH i FSH pozostające ze sobą w ujemnej korelacji. Obniżenie przez AMH wrażliwości małych pęcherzyków antralnych i pęcherzyków wzrastających na FSH, skutkuje wydłużeniem fazy folikularnej w odniesieniu do raczej stałej fazy lutealnej cyklu menstruacyjnego. U kobiet z dysfunkcją jajników częściej stwierdza się występowanie dłuższych cykli (Szamatowicz 2005; Robak-Chołubek i wsp. 2007). Jeśli faza folikularna jest krótsza, to można zaobserwować wyższy poziom FSH i relatywnie niższy AMH (McGee i Hsueh 2000; Windham i wsp. 2002). Rezultaty badań innych autorów wykazały, że krótsza długość cyklu często wskazuje na brak owulacji. Niektórzy autorzy sugerują, że zarówno długie jak i krótkie cykle zmniejszają szansę na wystąpienie owulacji o 10-30% (Hambridge i wsp. 2013).

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdziły powyższe stwierdzenie, bowiem krótsza długość cyklu wystąpiła u połowy badanych z POF w przeciwieństwie do faktu, że wydłużona długość cyklu niemal nie pojawiła się w tej kategorii.

Badania własne wykazały również, że cechą która istotnie różnicuje grupę kobiet z POF, PCOS i kontrolną jest długość cyklu menstruacyjnego. Warto zwrócić uwagę na fakt, że zaobserwowana istotna statystycznie różnica ($p < 0,05$) dotycząca stężenia AMH w trzech kategoriach długości cyklu: < 28 , $28-32$, > 32 dni wystąpiła wyłącznie u kobiet w grupie kontrolnej. Brak różnic w poziomie AMH w korelacji z długością cyklu w grupie badanych z POF i PCOS może stanowić pewną wartość diagnostyczną. Analiza nie wykazała powiązania pomiędzy poziomem FSH i czynnikiem długość cyklu.

Istnieją sprzeczne dane na temat zależności poziomu AMH i liczby posiadanych dzieci. Niektórzy badacze twierdzą, że wraz z liczbą posiadanych dzieci maleje stężenie AMH inni zaś są zdania, że macierzyństwo nie wpływa na fluktuacje profilu hormonu. Wynik ten trudno jednoznacznie zinterpretować albowiem nie ma zgodności wśród badaczy co do tej kwestii. W niniejszej pracy nie uzyskano potwierdzenia dla

powiązania stężenia AMH z liczbą dzieci. Pewnym ograniczeniem była zbyt mała liczebność próby ze względu na specyfikę placówek klinicznych gdzie przeprowadzono badania. Wobec takiej sytuacji nie zebrano wystarczającej liczby danych do analizy statystycznej. Duży odsetek kwestionariuszy ankietowych został zwrócony bez odpowiedzi na pytanie dotyczące rozrodczości. Około 80% kobiet, które odpowiedziały na pytanie dotyczące rozrodczości - nie miało dzieci.

Wyniki uzyskane przez Dólleman (2013) sugerują, że stężenie AMH wzrasta wraz z większą liczbą dzieci i jest skorelowane z wiekiem, ale nie potwierdziły tego w równym stopniu zastosowane analizy. Można to wyjaśnić specyficzną dla okresu ciąży gospodarką hormonalną, gdzie ujemnie skorelowany z AMH – FSH podlega czasowej supresji. Wówczas istniałaby możliwość wzrostu stężenia AMH (Weghofer i wsp. 2011). Odmienne wyniki uzyskał Bragg z zespołem, który utrzymuje, że kobiety z dwojgiem ($p<0,05$) lub więcej dzieci ($p<0,01$) mają znacznie niższy poziom AMH niż kobiety bezdzietne (Bragg i wsp. 2012). U kobiet w wieku rozrodczym wczesne menarche, nie miało wpływu na rozrodczość i spadek stężenia AMH (Bragg i wsp. 2012). Wyniki uzyskane przez Kerkhof z zespołem (2010) wykazały odwrotną zależność pomiędzy wiekiem menarche a poziomem AMH.

5.2. Socjoekonomiczne uwarunkowania zmienności AMH i FSH

Modulujący wpływ czynników socjoekonomicznych (SES) na stężenie hormonów AMH i FSH rzadko opisywany jest w literaturze przedmiotu. Z nielicznych badań wynika, że warunki bytowe rodziny mają wpływ na prawidłowy rozwój i dojrzewanie, a następnie kondycję rozrodczą kobiet (Siniarska 1994; Siniarska i Wolański 2005; Piouka i wsp. 2009). W niniejszych badaniach analizowano takie zmienne jak: wiek, stan cywilny, miejsce zamieszkania i wykształcenie. Zmienną kontrolowaną we wszystkich analizach był wiek, który najsilniej różnicuje markery rezerwy jajnikowej: AMH i FSH ($p<0,05$). Panujący wśród kobiet trend związany z przesunięciem w czasie decyzji o macierzyństwie, może przyczynić się do wystąpienia problemów z zajściem w ciążę (Bączkowski i Kurzawa, 2012; Radwan 2011). W literaturze przedmiotu zbyt mało jest danych dotyczących powiązania AMH i FSH oraz SES. Wiadomo, że warunki socjoekonomiczne mogą modulować zmienność hormonów. W tym badaniu nie wykazano takiej zależności. Może to wynikać ze względnej jednorodności grupy pod względem takich czynników jak stan cywilny i wykształcenie. Blisko 100% kobiet we

wszystkich analizowanych kategoriach funkcjonowania jajników zadeklarowało, że jest w związku. W badaniu Studzińskiej–Niedoberek i zespołu (2004) wyższe wykształcenie, wśród kobiet z zaburzoną płodnością miało 43%, natomiast 5,3% zawodowe. Podobne dysproporcje w otrzymanych wynikach zaprezentowali inni autorzy (Sołtysiak i wsp. 2005; Makara-Studzińska i wsp. 2012). Wynik otrzymany w niniejszej pracy nie różnił się od przedstawionych, bowiem we wszystkich kategoriach statusu funkcjonowania jajników istniały wyraźne dysproporcje pomiędzy najwyższym i najniższym poziomem wykształcenia, które w grupie PCOS i kontrolnej były bardzo zbliżone: około 75% i blisko 4,5%. Nieco mniejszy odsetek ale podobne proporcje prezentuje grupa z POF: 65% i 10%. Wobec oceny statusu jajników na podstawie poziomu AMH podobny wynik zaprezentował Dólleman z zespołem (2013), gdzie nie wykazano istotnej zależności pomiędzy poziomem wykształcenia i zależnym od czynnika wieku - AMH. Aby uchwycić potencjalną różnicę badacze odwrócili analizę i modelowali zmienną AMH. Wśród wartości zmiennych liniowych nadal nie zaobserwowano różnicy. Według Kerkhof z zespołem niski poziom AMH jest powiązany z niskim statusem SES prezentowanym przez takie czynniki jak wykształcenie i miejsce zamieszkania (Kerkhof i wsp. 2010). Taki wynik potwierdzają badania Jasińskiej z zespołem (2006), gdzie zwrócono uwagę na dostępność energii potrzebnej na wzrost, dojrzewanie i prokreację, której dostarcza środowisko. Badacze zauważyli, że czynniki SES warunkują aktywność osi metabolicznej co wiąże się bezpośrednio z potencjałem energetycznym, który przekłada się w dużym stopniu na kondycję rozrodczą. Zaobserwowano, że wcześniejsza menarche z większą częstością pojawiała się wśród dziewcząt, które pochodziły z rodzin lepiej wykształconych i zamieszkujących większe aglomeracje.

Wśród badanych w niniejszej pracy kobiet z POF, blisko 44% pochodziło z terenów słabiej zurbanizowanych (wsie i małe miasta), co odpowiada odsetkowi kobiet w grupie kontrolnej. Pochodzenie z terenów dużych aglomeracji miejskich zadeklarowało ponad 30% respondentek z POF oraz z PCOS z tym, że w grupie PCOS aż 50% pochodziło ze wsi i małych miasteczek. Podobny wynik otrzymał zespół Makara-Studzińskiej (2012) gdzie grupa kobiet z problemem niepłodności i zaburzeniami płodności w równej części zamieszkiwała tereny większych miast oraz wsi. Odwrotną tendencję opisał Ćwiek z zespołem (2009). Badanie wykazało, że 86%

kobiet zamieszkiwało miasta i tylko 14% pochodziło ze wsi. Podobny wynik otrzymali inni badacze (Studzińska-Niedoborek i wsp. 2004; Sołtysiak i wsp. 2005).

Trudno o jednoznaczną interpretację wyników, w których badaną zmienną jest miejsce zamieszkania. Obserwowana współcześnie tendencja do opuszczania większych aglomeracji na rzecz zamieszkania na mniej zurbanizowanych terenach podmiejskich, dostępność środków komunikacji oraz szybki przepływ informacji powodują zacieranie granic pomiędzy cechami biologicznymi, społecznoekonomicznymi i kulturowymi wśród mieszkańców wsi i miast. Dowodzą tego otrzymane w pracy wyniki, z których wynika, że nie wystąpiły różnice w zależności od miejsca zamieszkania pomiędzy grupami kobiet POF i kontrolną. Zaobserwowano tylko niewielkie odchylenia wśród kobiet z PCOS w porównaniu do kobiet z prawidłową funkcją jajników. Analiza pozostałych zmiennych dotyczących statusu socjoekonomicznego kobiet, pomimo braku istotnych statystycznie zależności sugeruje, że nie pozostają one bez wpływu na kondycję biologiczną kobiet. Urbanizacja terenów podmiejskich ogranicza szkodliwy wpływ miejskiego zanieczyszczenia środowiska. Poziom wykształcenia oraz stan cywilny warunkują pewien dobrostan organizmu, co sprzyja jego rozwojowi i osiągnięciu optymalnej kondycji zdrowotnej kobiet w wieku rozrodczym.

5.3. Somatyczne uwarunkowania zmienności AMH i FSH

Obecność tkanki tłuszczowej jest kluczowa w składzie ciała kobiety zarówno pod względem fizjologicznym jak i kulturowym w ujęciu niemal uniwersalnym, dotyczącym doboru płciowego i płodności (Dufour i Slather 2002) Cechy somatyczne określane przez takie wskaźniki jak BMI, WHR czy BF% wydają się być bardzo istotne dla procesu rozrodczości (Singh i Randal, 2007). Kobiety z wysokim BMI są narażone na wystąpienie otyłości i związanych z nią zagrożeń zdrowotnych. Wskaźnik BMI, pomimo niedoskonałości jak na przykład brak uwzględnienia wpływu takich czynników jak: wiek, płeć czy masa mięśniowa, ma dużą wartość predykcyjną.

Rozmieszczenie oraz grubość tkanki tłuszczowej jest elementem dymorfizmu płciowego i ma znaczenie dla oszacowania kondycji biologicznej kobiet. Tkanka tłuszczowa jest źródłem cholesterolu, który jest podstawowym substratem do przemian w procesie steroidogenezy. Wartość krytycznie niskiej masy ciała (48 kg) oraz procentowy udział tkanki tłuszczowej (BF - 22%) stanowią próg, poniżej którego

zwiększa się ryzyko wystąpienia problemów z prawidłowym cyklem menstruacyjnym (Pawelczyk 1998). Badania wykazały, że u kobiet ze zmniejszonym udziałem tkanki tłuszczowej oraz niedowagi czas zajścia w ciąży wydłużał się do około 29 miesięcy w porównaniu do kobiet z prawidłowym BMI (Kelly-Weeder i O'Connor 2006). Jest to spowodowane z zaburzeniem konwersji androgenów do estrogenów i wystąpieniem zaburzeń w osi płciowej.

W niniejszej pracy wykazano, że prawidłowa i nieprawidłowa funkcja jajników nie zależy od BMI. Wynik ten został również potwierdzony analizą regresji logistycznej dla dwóch kategorii zmiennej wyznaczonej według statusu jajnika: Prawidłowy i Nieprawidłowy oraz BMI ($p > 0,05$). Zmienna BMI nie miała istotnego wpływu na AMH.

W badaniu przeprowadzonym przez Lambert-Messerlian w grupie 45 kobiet w wieku 18-45 lat z normalnym cyklem menstruacyjnym otrzymano podobny wynik (Lambert-Messerlian i wsp. 2016). Sova i zespół potwierdzili, że AMH koreluje negatywnie z otyłością (Sova i wsp. 2019). Na podstawie porównania grupy z PCOS z grupą kontrolną wykazali ujemną korelację pomiędzy AMH i BMI na wysokim poziomie istotności ($r = -0,26$, $p < 0,001$) czego nie potwierdziły analizy przeprowadzone w niniejszej pracy ($p > 0,05$). W kolejnych badaniach wskazali również, że istnieje zależność pomiędzy AMH i wskaźnikiem WHR ($r = -0,13$, $p = 0,028$). Grupę kobiet z PCOS ($n = 319$) ze średnią wieku $28,1 \pm 4,3$ lat podzielili na podstawie trzech kryteriów diagnostycznych, ustalonych według wytycznych opracowanych na konferencji dotyczącej PCOS w Rotterdamie: oligomenorrhea (OA), hyperandrogenizm (HA) i morfologia policystycznych jajników w badaniu USG (PCOM). W przypadku oligomenorrhea odstęp pomiędzy kolejnymi miesiączkami waha się w przedziale od 35 dni do 6 miesięcy. W badaniu grupę kontrolną ($n = 96$) stanowiły kobiety w przedziale wieku 18-39 lat ($26,0 \pm 5,2$ średnia wieku) i z BMI: 19-35 kg/m^2 . Porównanie grupy kobiet z PCOS z przyjętymi przez badaczy dwoma kryteriami (według wytycznych z Rotterdamu), z grupą z trzema kryteriami klasyfikacji PCOS - nie wykazało istotności statystycznej. Porównanie grup badawczych z PCOS podzielonych według kolejnych analizowanych kryteriów jak normoandrogenizm i hyperandrogenizm, również nie wykazało zależności statystycznej. Przeprowadzone przez Sova i zespół analizy dowodzą, że otrzymane w niniejszej pracy wyniki odpowiadają stawianym wymogom. w badanej grupie z PCOS nie zastosowano podziału według klasyfikacji rotterdamkiej.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdziły wcześniejsze badanie Guedikian z zespołem (2018) dotyczące związku poziomu AMH i FSH z takimi czynnikami somatycznymi jak otyłość brzuszna (WHR) oraz procentowy udział tkanki tłuszczowej (BF%) u kobiet z PCOS. Czynniki WHR w większym stopniu niż BF% był powiązany ze zmiennością AMH. Uzyskane wyniki wskazały na zależność występującą pomiędzy AMH a WHR oraz AMH i BF%. Czynniki BMI nie był statystycznie istotny ($p>0,05$), co potwierdziły wcześniejsze prace jednak otrzymane wyniki odnosiły się do grupy kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajnika (Dólleman i wsp. 2013; Skałba i wsp. 2011; Halawaty i wsp. 2010).

Nieprawidłowa interakcją pomiędzy hormonami AMH i FSH regulującymi funkcję jajników może przyczynić się do wystąpienia PCOS i w konsekwencji, problemów z zajściem w ciążę. Na wystąpienie dysfunkcji jajników mogą mieć również wpływ takie czynniki metaboliczne jak grubość tkanki tłuszczowej czy insulinooporność. Według niektórych autorów zakres i siła związku AMH z BMI u kobiet z PCOS pozostają na różnym poziomie (Garg i Tal, 2016). Sova z zespołem (2019) dowiedli, że w grupie z PCOS z prawidłową masą ciała - AMH jest istotnie wyższe w porównaniu do kobiet z nadwagą oznaczoną na podstawie BMI. Ta negatywna korelacja wykazała charakter liniowy, co pozwala wnioskować, że spadek poziomu AMH wiąże się ze wzrostem ryzyka wystąpienia syndromu metabolicznego w PCOS. I tak na przykład poziom AMH w obserwowanej grupie z BMI $<25 \text{ kg/m}^2$ wynosił $10,6 \pm 7,57 \text{ ng/ml}$ i obniżył się do poziomu $8,13 \pm 4,90 \text{ ng/ml}$ u kobiet z BMI $>25 \text{ kg/m}^2$ podczas gdy w grupie z otyłością gdzie BMI $>30 \text{ kg/m}^2$ stężenie AMH wynosiło $7,28 \pm 4,90 \text{ ng/ml}$. (de Kat i wsp. 2015, Lefebvre i wsp. 2017).

Jak wykazano, kobiety z POF i PCOS nie różniły się istotnie pod względem BF% co jest zgodne z wynikami innych autorów (Sova i wsp. 2019). Tkanka tłuszczowa jest podstawowym źródłem cholesterolu, który w obecności cytochromu P450 podlega konwersji w hormony płciowe. Brak zależności pomiędzy udziałem tkanki tłuszczowej w masie ciała a wystąpieniem dysfunkcji jajników może świadczyć o zaburzeniu ze strony aparatu pęcherzykowego podczas folikulogenezy i zachwianiu gospodarki hormonalnej.

Wyniki badania Jasińskiej z zespołem (2004) wskazują na ważny aspekt jakim jest dystrybucja tkanki tłuszczowej u kobiet w wieku rozrodczym. Wyższe stężenie FSH-zależnych estrogenów odpowiada za blokowanie wisceralnego odkładania się

tkanki tłuszczowej na rzecz dystrybucji pośladkowo-udowej. Badania wykazały, że wąska talia (niższy WHR) stanowi ważny wyznacznik w doborze płciowym. Optymalny poziom stężenia E_2 skorelowany z prawidłowym poziomem FSH i AMH, warunkuje prawidłowy przebieg cyklu menstruacyjnego. Niski poziom estrogenów odpowiada za słabszą przepuszczalność śluzu szyjki macicy i obniżoną perfuzję macicy, co może utrudniać zajście w ciążę.

W niniejszej pracy zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy podwyższonym otłuszczeniem sylwetki i nieco wyższym, aczkolwiek mieszczącym się w granicach normy, poziomem AMH wśród kobiet z prawidłową funkcją jajników ($n=196$) i gynoidalnym typem otłuszczenia. Zaobserwowany poziom stężenia AMH u zdrowych kobiet, warunkuje według hipotezy wysuniętej przez Pankhursta (2017), optymalny czas utrzymania płodności. Twierdzi on, że zachowanie rezerwy jajnikowej jest korzystne, kiedy jest ona duża co przekłada się na potencjalnie wysoką płodność. Hughes i Gallup (2003) proponują uznać czynnik WHR jako identyfikator zajścia w ciążę i zdolności do naturalnego porodu.

W badanej grupie z PCOS poziom AMH był najwyższy u kobiet z androidalnym typem sylwetki (WHR) oraz podwyższonym udziałem procentowym tkanki tłuszczowej (BF%), co znalazło potwierdzenie również w wynikach uzyskanych przez innych badaczy (Guedikian i wsp. 2018). Obserwację tę potwierdza Sova z zespołem (2019), podkreślając powiązanie stężenia AMH z otyłością brzusznią (typ androidalny). Nie zaobserwowano istotnych różnic dotyczących procentowego udziału gynoidalnego rozmieszczenia tkanki tłuszczowej w trzech badanych grupach kobiet z dysfunkcją jajników i kontroli, co jest zgodne z wynikami wymienionych autorów.

Porównanie wartości predykcyjnych analizowanych w pracy cech somatycznych wykazało, że WHR ma większą moc niż BF%. Potwierdziła to analiza ANOVA. Wynik badania dotyczącego powiązania czynników somatycznych z AMH i FSH wskazał na zależność pomiędzy AMH a czynnikiem WHR ($p<0,05$) w grupie kobiet z prawidłową funkcją jajnika. Nieco wyższy w granicach referencyjnych poziom AMH korelował z gynoidalnym typem otłuszczenia.

Charakterystyczną cechą kobiet z PCOS jest występowanie otyłości brzusznej (WHR) i podwyższonej wartości wskaźnika BF%. Interesujący jest fakt, że w wielu badaniach wykazano większą wartość predykcyjną otyłości centralnej. Potwierdziły to wyniki otrzymane w niniejszej pracy. Poziom AMH był najwyższy u kobiet

z androidalnym typem sylwetki i podwyższonym BF%. U kobiet z wysokim BF% i gynoidalnym typie dystrybucji tkanki tłuszczowej również zaobserwowano podwyższony poziom AMH w osoczu krwi, jednak był on niższy niż w przypadku androidalnego typu sylwetki. Zbliżone wyniki uzyskał Sova z zespołem (2019). Zwiększona grubość tkanki tłuszczowej predysponuje do występowania zaburzeń metabolicznych. Insulinooporność jest jedną z głównych przyczyn występowania PCOS i podwyższonego poziomu AMH wskutek zatrzymania pęcherzyków na etapie rozwoju pęcherzyka preantralnego i małego antralnego (de Kat i wsp. 2017).

Wyniki badań Garg`a i Tal`a (2016) sugerują, że poziom AMH jest istotnie wyższy u kobiet z PCOS jednak zakres i siła związku z BMI pozostają na różnym poziomie. Sova z zespołem (2019) dowiedli, że w grupie kobiet z PCOS z normalną wagą – poziom AMH jest istotnie wyższy w porównaniu do kobiet z nadwagą oznaczoną na podstawie BMI. Ta negatywna korelacja wykazała charakter liniowy, co pozwala wnioskować, że spadek poziomu AMH wiąże się ze wzrostem ryzyka wystąpienia syndromu metabolicznego w PCOS. i tak na przykład poziom AMH w obserwowanej grupie z BMI <25 kg/m² wynosił 10,6±7,57 ng/ml i obniżył się do poziomu 8,13±4,90 ng/ml u kobiet z BMI >25 kg/m², podczas gdy w grupie z otyłością gdzie BMI >30kg/m² stężenie AMH wynosiło już tylko 7,28 ±4,90 ng/ml (de Kat i wsp. 2015; Lefebvre i wsp. 2017). Odwrotny wynik uzyskano w Japonii. Badanie przeprowadzone z udziałem 2319 pacjentek klinik leczenia zaburzeń płodności dowiodło, że kobiety (36,15±4,64 lat) z BMI poniżej 25,00 miały wyższy poziom AMH niż te z nadwagą czy otyłością (Nakayama i wsp. 2014).

Wyniki badań Ziomkiewicz i zespołu (2008) dowodzą, że zarówno zbyt niski jak i za duży udział tkanki tłuszczowej w masie ciała wiąże się z obniżeniem kondycji biologicznej kobiet ze względu na istotnie niższe poziomy E₂ we krwi w stosunku do badanych z prawidłowym BMI. Odchylenia od prawidłowej masy ciała u kobiet przyczyniają się do zaburzeń procesu owulacji a wpływ masy ciała na płodność widoczny jest na każdym etapie okresu rozrodczości. Ważny dla zdrowia reprodukcyjnego jest fakt, że z wysokim wskaźnikiem rozrodczości łączy się dodatni bilans energetyczny, bowiem kobiety z ujemnym bilansem prezentowały aż o 10% niższy poziom estrogenów (Ziomkiewicz i wsp. 2008). AMH wpływa pośrednio na FSH-zależny poziom estrogenów podczas cyklu płciowego kobiet, co sugerowałoby jego podwyższone stężenie. Masa ciała i dodatni bilans energetyczny to czynniki,

których wagę podkreślają również inni autorzy (Seredyńska i wsp. 2008; Wickiewicz i Zimmer 2008).

Należy podkreślić, że dla utrzymania optymalnej wydolności rozrodczej korzystne jest utrzymanie prawidłowej masy ciała co zapobiega chorobom układu krążenia oraz normalizuje i podnosi sprawność układu neuroendokrynnego. Istotnym aspektem dla zoptymalizowania rozrodczości jest zachowanie dodatniego bilansu energetycznego. Pozwoli to zachować standaryzowaną na wiek ilość tkanki tłuszczowej, oznaczonej przez wskaźnik BF%, która stanowi źródło do przemian związanych ze szlakiem steroidogenezy. Dla utrzymania odpowiedniej kondycji biologicznej wskazana jest stała kontrola wskaźników somatycznych jak BMI, BF% i reakcja na pojawiające się odstępstwa poprzez zmianę nawyków żywieniowych oraz podejmowanie aktywności fizycznej w stopniu umiarkowanym.

5.4. Wybrane czynniki stylu życia a zmienność AMH i FSH

Palenie papierosów

Nie wykazano powiązań AMH i FSH z elementami stylu życia. Trudno było oczekiwać różnicującego wpływu palenia papierosów, skoro zdecydowana większość kobiet zadeklarowała, że nie pali. Podobny wynik uzyskała Lambert-Messerlian z zespołem (2016). Wśród badanych, podobnie jak w grupie kobiet, które uczestniczyły w niniejszym badaniu, zanotowano mały odsetek osób palących, co pozwala wnioskować, że wśród kobiet utrzymuje się duża tendencja do niepalenia. Wcześniejsze badania przeprowadzone na grupie 760 kobiet dotyczące wpływu palenia papierosów na kondycję rozrodczą udowodniły, że nikotyna redukuje warstwę komórek ziarnistych w pęcherzyku jajnikowym, co skutkuje szybszym wyczerpaniem rezerwy jajnikowej (Lambert-Messerlian i wsp. 2006; Plante i wsp. 2010).

Wyniki uzyskane przez Dólleman i zespół (2013) wskazują, że u kobiet aktualnie palących poziom AMH w odniesieniu do wieku był znacząco niższy niż u badanych, które nigdy nie paliły papierosów ($p < 0,05$). Podobny zakres poziomu AMH zaobserwowano zarówno w grupie kobiet niepalących jak i tych, które w przeszłości paliły. Interesujący jest fakt, że na obniżenie poziomu AMH nie miała wpływu liczba wypalonych papierosów w ciągu jednego dnia ($p = 0,05$). Niektórzy autorzy sugerują, że dopiero przekroczenie pewnego progu jakim jest liczba powyżej 10 paczek na dobę

w ciągu roku (paczkolata), może znacząco wpłynąć na obniżenie poziomu AMH (Plante i wsp. 2010; Shaw i wsp. 2011; Schuh-Huerta i wsp. 2012).

Toksyczny wpływ palenia na pęcherzyki jajnikowe dotyczy stadium antralnego podczas folikulogenezy (Mattison i Thorgeison 1978; Lambert-Messerlian i wsp. 2006; Schuh-Huerta i wsp. 2012). Zmniejszona wskutek uszkodzenia pula pęcherzyków antralnych nie jest w pełni wydolna i nie może w pełni efektywnie uczestniczyć w kolejnych stadiach rekrutacji ze względu na upośledzone wydzielanie estrogenów oraz zaburzenie ze strony sprzężeń zwrotnych w osi płciowej. Taka sytuacja może skutkować wystąpieniem zaburzeń płodności czy też bezpłodnością. Pęcherzyki primordialne nie podlegają toksycznemu wpływowi nikotyny, co tłumaczy fakt szybkiej odbudowy puli pęcherzyków preantralnych i antralnych u pacjentek, które rzuciły palenie papierosów. Znajduje to potwierdzenie w powrocie do prawidłowego poziomu AMH po fakcie rzucenia palenia. Odbudowa puli pęcherzyków jajnikowych, które uczestniczą w cyklu menstruacyjnym jest swoistą strategią biologiczną w celu utrzymania prawidłowej kondycji biologicznej kobiet.

Wśród kobiet tylko niewielka grupa zgłosiła palenie papierosów, gdzie badane z PCOS i prawidłowym funkcjonowaniem jajnika stanowiły w równych częściach 8,5% grupy badawczej. Nieco większy odsetek, bo 10% kobiet aktualnie palących, znalazło się w kategorii POF. W odniesieniu do badań wcześniej zaprezentowanych, można zaryzykować stwierdzenie, że używanie tytoniu mogło przyczynić się do obniżenia poziomu AMH wśród kobiet z małą rezerwą jajnikową. Znajduje to odzwierciedlenie w obniżonym potencjale rozrodczym kobiet z POF. Raport sporządzony dla WHO dotyczący palenia w Polsce potwierdził tendencję zmniejszania odsetka osób palących, w tym kobiet w wieku rozrodczym (Czapiński 2011).

Aktywność fizyczna

Aktywność fizyczna w znacznym stopniu przyczynia się do poprawy zdrowia i jakości życia, jak również wpływa na dobrostan układu rozrodczego kobiet. Według wytycznych WHO już 30 minut aktywności fizycznej o umiarkowanym natężeniu, poprawia wydolność krążeniową usprawniając funkcjonowanie całego organizmu. Ma to szczególne znaczenie dla kobiet, bowiem występuje u nich fizjologiczna tendencja do odkładania tkanki tłuszczowej (Dufour i Slather 2002). Jest ona niezbędna do

konwersji hormonów płciowych jednak nadwaga i otyłość powodują zaburzenia, a nawet i blokady, w prawidłowym funkcjonowaniu układu neuroendokrynnego. Włączenie umiarkowanej aktywności fizycznej poprawia kondycję i funkcjonowanie organizmu. Zwiększona cyrkulacja krwi w bogato zaopatrzonych w naczynia krwionośne rdzeniach jajników jest istotna dla ich sprawnego funkcjonowania. Podjęcie codziennej aktywności ruchowej przyczynia się do redukcji tłuszczu wisceralnego, co ogranicza ryzyko wystąpienia otyłości, wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, otyłości czy insulinooporności, co ma związek z zaburzeniami profilu hormonalnego i może wpływać na zaburzenia funkcjonowania jajników (Wolin i wsp. 2008).

Badanie populacyjne przeprowadzone przez Topolską z zespołem (2011) dotyczące aktywności fizycznej wśród kobiet w przedziale wieku 19-65 lat pokazało, że aktywność wśród zdrowych kobiet okazała się najniższa w grupie 19-24 lata. Wydaje się to być zaskakujące ze względu na fakt, że okres ten cechuje najwyższy życiowy potencjał biologiczny. Największą aktywność w życiu codziennym wykazała grupa w przedziale wieku 25-34 lat, która jednocześnie w zakresie uprawiania sportu i rekreacji plasowała się na najniższej pozycji. Polki pod względem podjętej aktywności fizycznej znalazły się na wyżej pozycji niż Brytyjki czy Włoszki ale wypadły znacznie gorzej w porównaniu do kobiet pochodzących z takich krajów jak: Niemcy, Belgia czy Francja.

W celu zbadania aktywności fizycznej wyróżniono dwie kategorie: wystarczająca i niewystarczająca. Odsetek badanych z niewystarczającą aktywnością fizyczną, określoną według wskaźnika MET, był o połowę niższy od grupy kobiet, które zgłosiły wystarczającą aktywność fizyczną, obejmującą zarówno ruch związany z codzienną egzystencją jak i aktywnością podejmowaną w ramach dodatkowych zajęć. W trzech badanych grupach wystarczającą aktywność zadeklarowało w równym stopniu 68% kobiet. Zbliżony wynik otrzymał zespół Dólleman (2013). Aktywność fizyczną podzielono według czterech kategorii: nieaktywna, umiarkowanie nieaktywna, umiarkowanie aktywna i aktywna. Wśród badanych grup nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności ($p > 0,05$).

O ile umiarkowana aktywność fizyczna jest niezbędna dla podtrzymania dobrej kondycji biologicznej kobiet o tyle nadmiernie intensywny wysiłek fizyczny, wydaje się być elementem niepożądanym w perspektywie rozrodczości, doprowadzając

w skrajnych przypadkach do wystąpienia zaburzeń miesiączkowania i braku miesiączki (Warren i Goodman 2003). Odpowiedzią organizmu na aktywność fizyczną jest złożona reakcja obejmująca również funkcjonowanie osi płciowej podwzgórze-przysadka-jajniki. W przypadku umiarkowanego wysiłku fizycznego następuje poprawa funkcjonowania układu neuroendokrynnego w ramach fizjologicznego szlaku rozrodczego. Aktywuje go pulsacyjne wydzielanie gonadoliberyn przez podwzgórze, co wyznacza rytm biologiczny związany z cyklem menstruacyjnym (Stoddard i wsp. 2007).

Intensywny i długotrwały wysiłek fizyczny związany jest z zaburzeniem amplitudy wydzielania gonadoliberyn co skutkuje nieprawidłową sekrecją gonadotropin z przysadki. Konsekwencją zbyt niskiego stężenia FSH w osoczu krwi jest zaburzenie związane z wydzielaniem estradiolu przez pęcherzyki jajnikowe co znajduje przełożenie na brak wystąpienia piku LH, który jest sygnałem do uwolnienia oocyta z pęcherzyka Graafa (Mastorakos i wsp. 2005). Wskutek niedoboru estrogenów podnosi się poziom androgenów oraz obniża się poziom białek wiążących hormony płciowe SHGB.

Aktywności fizyczna pozytywnie wpływa na zdrowie i pozwala utrzymać prawidłowy bilans energetyczny. Podczas umiarkowanego wysiłku fizycznego, dostępność energii w dodatnim bilansie sprzyja utracie zbędnej masy ciała, wzmacnia układ krążenia i poprawia kondycję rozrodczą kobiet podczas gdy ujemny bilans wywołany zapotrzebowaniem na energię powoduje w konsekwencji zaburzenia na poziomie metabolicznym i neuroendokrynnym (Ziomkiewicz i wsp. 2008). Nadmierna tkanka tłuszczowa predysponuje do zaburzeń natury metabolicznej co skutkuje często dysfunkcją ze strony układu rozrodczego. Umiarkowana aktywność fizyczna przynosi również dodatkowe korzyści związane z poprawą samopoczucia i samooceny oraz wpływa na redukcję lęku i poziomu stresu, co również ma duże znaczenie dla kondycji biologicznej kobiet. Należy podkreślić, że zbyt intensywne treningi mogą stwarzać ryzyko androgenizacji organizmu i doprowadzić do zaburzeń natury endokrynej, co jest szczególnie istotne dla kobiet w wieku rozrodczym.

Stres a rozrodczość

Kobiety, ze względu na konstytucję psychofizyczną łatwiej niż mężczyźni ulegają emocjom i impulsywnie reagują na stres. Wystąpienie zaburzeń płodności, szczególnie w odniesieniu do kobiet po 35 roku życia, jest sytuacją silnie stresogenną (Lynch i wsp.

2014; Mitsi i Efthimiou, 2014; Peterson i wsp. 2006). Wystąpienie przewlekłej reakcji stresowej częściej pojawia się u kobiet z fizjologicznie zwiększoną reakcją na stres (Rao 2009). Stres oraz zaburzenia psychiczne i seksualne mogą przyczynić się do wystąpienia zaburzenia prawidłowego funkcjonowania jajników ze względu na wzajemne oddziaływanie osi płciowej oraz osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) (Skrzypczak i wsp. 1998).

Badania wykazały powiązanie stresu psychicznego ze spadkiem potencjału rozrodczego, który prezentuje rezerwa jajnikowa. Zespół Yue-zhi Dong (2017) zbadał skutki stresu za pomocą markera AMH w kohorcie 576 kobiet. Poziom stresu oceniono badaniem alfa-amylazy w ślinie, której stężenie jest powiązane z wydzielaniem hormonów z kory nadnerczy. Wynik jednoznacznie sugerował, że wyższy poziom stresu ($r=-0,315$, $p<0.01$) był skorelowany z niższym poziomem AMH u kobiet z dysfunkcją jajników. Fizjologiczna odpowiedź układu rozrodczego na przewlekły stres jest związana z reakcją osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (Wurtman 2002). Wpływ kortyzolu powoduje stłumienie osi podwzgórze-przysadka-jajniki w związku z czym obniża się wydolność układu rozrodczego poprzez fluktuacje hormonów GnRH i LH, których pik odpowiada za uwolnienie oocytu z pęcherzyka Graafa (Chrousos i wsp. 1998, Ferin 1999).

W pracy wykazano, że w badanej grupie aż u 72% kobiet z PCOS i z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami, nie wystąpiły żadne z symptomów depresji. Badane odpowiedziały na pytania zawarte w kwestionariuszu ankietowym. Oceny poziomu depresji dokonano za pomocą skali depresji Becka. Status kondycji jajników określono na podstawie stężenia AMH, dlatego można stwierdzić, że nie było istotnej statystycznie zależności pomiędzy czynnikiem stresu a AMH w grupie z PCOS oraz w grupie kontrolnej. Nieznacznie mniej, bo 67,5% kobiet z POF nie wykazało objawów depresji jednak w tej grupie odsetek z łagodną depresją był najwyższy w porównaniu do PCOS i zdrowych kobiet, chociaż różnice nie były istotne statystycznie ($p>0,05$). W niewielkim procencie wśród badanej grupy kobiet wystąpiła umiarkowana bądź też ciężka depresja.

Podobny wynik uzyskał Lynch gdzie w grupie badawczej złożonej z 339 kobiet, które planowały ciążę, podniesiony poziom stresu badany na podstawie stężenia α amylazy we krwi nie wykazał korelacji z wydolnością rozrodczą, określoną na podstawie wyrzutu LH oznaczonego za pomocą testu ciążowego (Lynch i wsp. 2014).

Inne badanie natomiast dowiodło, że istnieje ścisła zależność pomiędzy płodnością a stresem (Wasselink i wsp. 2017). Wśród kobiet z dysfunkcją jajników, u których pojawiły się oznaki depresji, dość często występuje poczucie winy, niska samoocena oraz nadmierna skłonność do krytykowania siebie. Często tym objawom towarzyszy poczucie lęku (Olajossy-Hilkesberger i wsp. 2004). Z punktu widzenia poprawy słabego samopoczucia i objawów depresji w stopniu lekkim bądź umiarkowanym, co jest spowodowane trudnościami zajścia w ciążę, należy podkreślić rolę grup wsparcia dostępnych w Internecie. Fora dyskusyjne i grupy tematyczne są z reguły pomocne w odbudowie poczucia własnej wartości i bezpieczeństwa (Bidzan i wsp. 2011).

Podsumowując, należy podkreślić, że długotrwały stres oddziałuje niekorzystnie na oś płciową podwzgórze-przysadka-jajniki co prowadzi do obniżonej wydolności rozrodczej. Potwierdziły to badania AMH, który jest bardziej czułym markerem rezerwy jajnikowej niż FSH. Wcześniejsze badania prowadziły do sprzecznych wyników dotyczących wpływu stresu na kondycję rozrodczą ale zastosowane metody nie były tak dokładne. Należy zwrócić uwagę na aspekt łagodzenia skutków stresu w celu poprawienia zdrowia reprodukcyjnego kobiet.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Rosnący odsetek par zgłaszających się do ośrodków leczenia zaburzeń płodności oraz niepłodności jest aktualnym problemem zarówno w skali kraju jak i Europy. Sytuacja ta wymaga prowadzenia intensywnych badań zmierzających do wyjaśnienia przyczyn i przeciwdziałania kryzysowi rozrodczości.

Realizacja głównego celu niniejszej pracy dotyczyła zbadania zmienności profili hormonów AMH i FSH w zależności od wieku, wybranych cech cyklu płciowego, oraz historii rozrodczości kobiet z zaburzoną funkcją jajnika: POF i PCOS na tle grupy kobiet z prawidłową funkcją jajnika.

Cel rozprawy zrealizowano na dwóch poziomach zmienności biologicznej wewnątrzsobniczej (stężenie AMH i FSH, cechy cyklu płciowego) i międzysobniczej (cechy okresu rozrodczości, somatyczne) z uwzględnieniem czynników związanych ze stylem życia. W odniesieniu do pierwszego zadania badawczego, którym było wyznaczenie wartości przeciętnych stężeń AMH i FSH w surowicy krwi w zależności od wieku chronologicznego kobiet z POF i PCOS na tle kobiet z prawidłową funkcją jajników w grupie kobiet z POF nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w porównaniu stężenia AMH u kobiet z POF i z prawidłową funkcją jajnika ($p > 0,05$) w trzech analizowanych przedziałach wieku. Pomimo braku istotności statystycznej wystąpiły duże różnice w stężeniach AMH we wszystkich przedziałach wieku i wynosiły one kolejno dla najmłodszej grupy: 1,7 [ng/ml], 1,45 [ng/ml] i w najstarszej grupie 1,36 [ng/ml]. Poziom FSH był istotnie wyższy w grupie z dysfunkcją niż w grupie kontrolnej ($p < 0,05$) jedynie w odniesieniu do najstarszej grupy kobiet, natomiast w grupach wiekowych 23-30 i 31-35 lat nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy porównywanymi grupami.

Założenie przyjęte w Hipotezie 1 dotyczące podwyższonego stężenia FSH u kobiet z POF w porównaniu do grupy kontrolnej, potwierdzono jedynie w odniesieniu do kobiet w dojrzałym wieku reprodukcyjnym podczas gdy analizowany we wszystkich przedziałach wieku poziom AMH – był zdecydowanie niższy niż w grupie kontrolnej. Hipoteza zakładająca, że kobiety z POF wykazują niższy poziom surowiczego stężenia AMH i wyższe stężenie FSH w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej, została warunkowo przyjęta.

Poziom surowiczego stężenia AMH u kobiet z PCOS we wszystkich klasach wieku różni się wysoce istotnie statystycznie ($p < 0,01$) od stężenia AMH występującego

u kobiet z prawidłową funkcją jajnika. W odniesieniu do FSH nie wykazano różnic w porównaniu stężenia hormonu pomiędzy kobietami z PCOS, a badanymi z grupy kontrolnej w dwóch przedziałach wieku: 23-30 i 36-46 lat. Pomimo braku istotności statystycznej, w najstarszej grupie kobiet z PCOS zaobserwowano dużą różnicę pomiędzy średnim stężeniem FSH w porównaniu do grupy kontrolnej, która wynosiła 1,22 [ml/U]. Natomiast istotna statystycznie różnica ($p < 0,01$) wystąpiła pomiędzy badanymi w grupie 31-36 lat i kobietami z grupy kontrolnej.

Hipoteza 2 została warunkowo przyjęta, pomimo częściowej niezgodności z założeniem, dotyczącym niższego stężenia FSH, które nie zostało potwierdzone w najmłodszej grupie kobiet. Pozomy AMH były istotnie wyższe zgodnie z testowanym założeniem.

Kolejne zadanie badawcze polegało na zbadaniu czynników potencjalnie różnicujących poziom stężeń AMH i FSH w wymienionych grupach kobiet takich jak: cechy cyklu płciowego, okresu rozrodczości, somatyczne i związane z elementami stylu życia. Wykazano istotną zależność pomiędzy stężeniami AMH a długością cyklu menstruacyjnego u kobiet z prawidłową funkcją jajników. Długość cyklu menstruacyjnego okazała się być czynnikiem, który w największym stopniu różnicował badane grupy kobiet. Zaobserwowane różnice dotyczą trzech przyjętych długości cyklu. Największa statystycznie istotna różnica ($p < 0,01$) wystąpiła pomiędzy kobietami w grupie kontrolnej z najkrótszym oraz najdłuższym cyklem menstruacyjnym. Obserwacja ta nie przekłada się na otrzymane wyniki u kobiet z POF i PCOS, gdzie nie wystąpiły istotne różnice w poziomie AMH w zależności od długości cyklu. W odniesieniu do stężenia FSH nie wystąpiły żadne interakcje dotyczące długości cyklu. Poziom FSH nie różnił się również w porównaniu takich cech historii rozrodczości jak występowanie bądź brak regularnego miesiączkowania. Stężenie hormonu AMH różniło się u kobiet z PCOS w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Wiek menarche nie wpłynął na zmianę w poziomach hormonów u kobiet z dysfunkcją jajników oraz w grupie kontrolnej. Cechy historii rozrodczości, jak zajście w ciążę czy liczba ciąż oraz liczba urodzonych dzieci, nie wykazały związku z poziomem stężenia hormonów AMH i FSH u kobiet z POF i PCOS oraz w grupie kontrolnej za wyjątkiem analizowanej cechy jak liczba poronień u kobiet z prawidłowym funkcjonowaniem jajników. Zaobserwowano różnicę w stężeniu hormonu AMH u kobiet z prawidłową funkcją jajnika, gdzie wystąpiło jedno

poronienie ($p < 0,05$). W odniesieniu do cech historii rozrodczości nie wystąpiły żadne fluktuacje w poziomach stężenia FSH. Przedstawione przesłanki pozwoliły przyjąć założenie Hipotezy 3 z pewnymi ograniczeniami. Otrzymane wyniki sugerują, że różnice w poziomach hormonów w trzech grupach kobiet, w zależności od badanych cech, wystąpiły jedynie w przypadku AMH. Dobrym predyktorem występowania potencjalnych fluktuacji poziomu hormonu u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami, jest określenie długości cyklu menstruacyjnego, podczas gdy u kobiet z dysfunkcją jajników długość trwania cyklu nie była istotna. Brak regularnie występujących miesiączek różnicuje AMH tylko u kobiet z PCOS. Fluktuacje poziomu hormonu związane z wystąpieniem w przeszłości poronienia dotyczą jedynie kobiet bez dysfunkcji ze strony jajników.

Zaobserwowano istotną statystycznie zależność ($p < 0,05$) pomiędzy wskaźnikiem WHR i stężeniem AMH u kobiet z prawidłowo funkcjonującymi jajnikami. W tej grupie zmienność AMH jest w większym stopniu wyjaśniana przez czynnik WHR w porównaniu do BF%. Wyższy poziom AMH prezenował typ gynoidalnej dystrybucji tkanki tłuszczowej w porównaniu do androidalnego typu budowy ciała. Nie zaobserwowano fluktuacji AMH w odniesieniu do czynnika BF% w przeciwieństwie do grupy kobiet z dysfunkcją jajników. Zarówno u kobiet z POF jak i PCOS - wskaźnik WHR w marginalnym stopniu tłumaczył zmienność AMH. Uzyskany wynik sugerował, że u kobiet z POF i PCOS, lepszym predyktorem zmienności AMH jest wskaźnik BF%. Wskaźnik BMI okazał się słabszym parametrem do opisanie zależności pomiędzy cechami somatycznymi a stężeniem AMH w porównaniu do BF%. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie związku pomiędzy stężeniem FSH a cechami somatycznymi.

Na oryginalność pracy składa się jej wartość merytoryczna. Zebrano unikalny materiał badawczy, a wieloaspektowe podejście do zmienności AMH i FSH umożliwiło pogłębienie istniejącej wiedzy. Wniesiono nowe, ważne treści do dotychczasowej wiedzy o zdrowiu reprodukcyjnym, co może posłużyć jako narzędzie dydaktyczne budujące świadomość zdrowotną i w ten sposób przyczynić się do poprawy stanu biologicznego kobiet. Znaczenie praktyczne pracy polega na możliwości wykorzystania wyników badań we wczesnej diagnostyce dysfunkcji jajników, takich jak POF i PCOS.

7. WNIOSKI

Dla utrzymania optymalnego potencjału biologicznego kobiet ważne są takie czynniki jak prawidłowa masa ciała, umiarkowana ale systematyczna aktywność fizyczna czy status psychosomatyczny. Należy zwrócić szczególną uwagę na to, że zarówno zbyt intensywne ćwiczenia jak i zupełny brak aktywności fizycznej mogą wpływać niekorzystnie na prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego w powiązaniu z układem neuroendokrynnym. Umiarkowany ruch i przebywanie na świeżym powietrzu poprawia wydolność zarówno fizyczną jak i rozrodczą.

Aktywność fizyczna poprawia samopoczucie i zwiększa samoocenę, powodując tym samym redukcję napięć i lęków, a tym samym minimalizuje ryzyko wystąpienia depresji. Ma to kluczowe znaczenie dla rozrodczości, bowiem zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki oraz badania innych autorów jasno wskazują na powiązanie osi HPO i HPA. Należy również zwrócić uwagę na ważną rolę jaką pełni tkanka tłuszczowa oraz miejsce jej dystrybucji w życiu reprodukcyjnym kobiet. Wskaźnik WHR jako „wskaźnik metaboliczny” powinien służyć jako wyznacznik zdrowych nawyków po to, aby podnieść zdolność reprodukcyjną kobiet. Ważną kwestią dla optymalizacji kondycji biologicznej kobiet jest dodatni bilans energetyczny, o którym należy pamiętać podczas aktywności fizycznej. Era mody na (zbyt) szczupłe i wysportowane ciało niesie ryzyko androgenizacji żeńskiego układu rozrodczego, co prowadzi do zaburzeń cyklu menstruacyjnego. Zarówno otyłość jak i zbyt mała ilość tkanki tłuszczowej w dużym procencie osłabiają kondycję rozrodczą przyczyniając się do dysfunkcji czynności jajników jak POF i PCOS.

Należy rekomendować kobietom w wieku rozrodczym, planującym w przyszłości posiadanie potomstwa, aby podejmowały umiarkowaną aktywność fizyczną jak na przykład chodzenie czy jazda na rowerze, najlepiej przez wszystkie dni tygodnia przez minimum 30 minut.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy podkreślają wagę wczesnej diagnozy zaburzeń funkcjonowania jajników i szybkiego podjęcia leczenia ze względu na czynnik wieku, który okazał się podstawową determinantą wpływającą na spadek kondycji rozrodczej kobiet. Zaprezentowana zmienność profili hormonów AMH i FSH, szczególnie w odniesieniu do AMH, w powiązaniu z cechami cyklu menstruacyjnego, historii rozrodczości oraz cechami somatycznymi stanowić może uzupełnienie stosowanych

dotychczas narzędzi diagnostycznych i wpłynąć na poprawę zdrowia reprodukcyjnego kobiet.

Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań w celu poprawy stanu zdrowia reprodukcyjnego Polek zarówno w aspekcie naukowym jak i praktycznym. Istnieje potrzeba edukacji prozdrowotnej aby poprawić świadomość i zrozumienie wagi czynników, które istotnie wpływają na status biologiczny kobiety, zwiększając szansę na prawidłową ciążę i urodzenie zdrowego dziecka. Należy również podkreślić rolę jaką pełni w perspektywie rozrodu – wiek. Jest to podstawowa determinanta warunkująca największą szansę na macierzyństwo, również w przypadku kobiet z pewną dysfunkcją jajników jak POF i PCOS, u których występuje cykl menstruacyjny.

PIŚMIENNICTWO

1. Aittomäki K, Lucena JD, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Nieschlag, E. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 1995;82(6):959-68.
2. Al-Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R, Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse, *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(6):1335-43.
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, Grundy SM. The IDF consensus worldwide definition of metabolic syndrome. *IDF Task Force on Epidemiology and Prevention*.2006.
4. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Waszyngton: American Psychiatric Publishing, Inc.; 2013.
5. Anasti JN, Premature ovarian failure: an update, *Fertility and Sterility*. 1998;70(1):1-15.
6. Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG , Ernst E. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Human Reproduction*. 2010;25(5):1282-87.
7. Anderson L, Fraser A, McNally W, Sattar N, Fleming R, Lashen H, Nelson SM, Lawlor DA. 2013. Anti-Müllerian Hormone Is Not Associated with Cardiometabolic Risk Factors in Adolescent Females. *PLoS One* 31:8(5).
8. Baarends WM, Van Helmond MJ, Post M, van Der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Meijers JH. a novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. *Development*. 1994;120(1):189-97.
9. Banaszewska B, Spaczyński RZ, Pawelczyk L. Zespół policystycznych jajników (PCOS). *Ginekologia*. Red. Słomko Z., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008, 485-495.
10. Bączkowski T, Kurzawa R. Diagnostyka i leczenie niepłodności w warunkach ambulatoryjnych, *Przewodnik Lekarza*. Wyd.Terrmedia 2012;1: 154-158.
11. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Archives of General Psychiatry*. 1961;4:561–571.

12. Bentley GR, Muttukrishna, S. Potential use of biomarkers for analyzing interpopulation and cross-cultural variability in reproductive aging. *Menopause*. 2007;14(4):668-79.
13. Bentzen, J. G., Forman, J. L., Johannsen, T. H., Pinborg, A., Larsen, E. C., Andersen, A. N., 2013, Ovarian antral follicle subclasses and anti-Müllerian hormone during normal reproductive aging. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;98(4):1602-11.
14. Biason-Lauber A, Chaboissier MC. Ovarian development and disease: the known and the unexpected. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015; 45:59-67.
15. Bidzan M, Podolska M, Bidzan L, Smutek J. Cechy osobowościowe a poczucie osamotnienia kobiet leczonych z powodu niepłodności. *Ginekologia Polska*. 2011; 82:508-13.
16. Biernat E, Stupnicki R, Gajewski AK. *Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej (IPAQ)–wersja polska*. *Wychowanie Fizyczne i Sport*, 2007;51(1):47-54.
17. Biernat E, Stupnicki R, Lebedziński B, Janczewska L. Assessment of physical activity by applying IPAQ questionnaire. *Physical Education and Sport*. 2008;52(2):83-89.
18. Biernat E. Factors increasing the risk of inactivity among administrative, technical, and manual workers in Warsaw public institutions. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2015.
19. Blanke DD, da Costa e Silva V. *Tobacco control legislation: an introductory guide. Tools for advancing tobacco control in the 21st century*. Chapter XII. World Health Organization, Geneva 2004; 184–187.
20. Bragg JM, Kuzawa CW, Agustin SS, Banerjee MN, McDade TW. Age at menarche and parity are independently associated with anti-Müllerian hormone, a marker of ovarian reserve in Filipino young adult women, *American Journal of Human Biology*. 2012;24:739–45.
21. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon, A, Trew G, Olivennes, F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertility and Sterility*. 2010;94(3):1044-51.

22. Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Human Reproduction*. 2014;20(5): 688-701.
23. Brook C, Nicholas Marshall N. *Podstawy Endokrynologii*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2000, wyd.1.
24. Bry-Gauillard H, Larrat-Ledoux F, Levaillant JM, Massin N, Maione L, Beau I, Binart N, Chanson P, Brailly-Tabard S, Hall JE. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Morphology in Women With Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism/Kallmann Syndrome: Effects of Recombinant Human FSH. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017;102(4):1102–11.
25. Carlsen S, Vanky E, Fleming R. Anti-Müllerian hormone concentrations in androgen-suppressed women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2009;24(7):1732-38.
26. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Growth of Human Primordial Ovarian Follicles in Vitro. *Human Reproduction*. 2006;21 (9):2223-7.
27. Cassar S, Teede HJ, Moran LJ, Joham AE, Harrison CL, Strauss BJ, Stepto NK. Polycysticovary syndrome and anti-Müllerian hormone: role of insulin resistance, androgens, obesity and gonadotrophins. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* . 2014;81(6):899-906.
28. Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, di Clemente N. Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008; 93(11):4456-61.
29. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Annals of Internal Medicine*. 1998;129(3):229–240.
30. Cieślak J, Kaczmarek M, Kaliszewska-Drozdowska MD. *Dziecko Poznańskie'90: Wzrastanie, dojrzewanie, normy i metody oceny rozwoju*. Poznań, Wydawnictwo Naukowe Bogucki.1994.
31. Cohen-Haguenaer O, Picard J, Y, Mattéi M, -G, Serero S, Van Cong N, de Tand M, -F, Guerrier D, Hors-Cayla M, -C, Josso N, Frézal J: Mapping of the gene for

- anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenetic and Genome Research*. 1987;44:2-6.
32. Cohen P, Cohen J, Kasen S, Velez CN, Hartmark C, Johnson J, Streuning EL. An epidemiological study of disorders in late childhood and adolescence I. age and gender-specific prevalence. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 1993;34(6):851-867.
 33. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertility and Sterility*. 2000;73(4):859-61.
 34. Costagliola S, Urizar E, Mendive F, Vassart G. Specificity and Promiscuity of Gonadotropin Receptors. *Human Reproduction*. 2005;130 (3):275-81.
 35. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstetrics and Gynecology*. 1986;67(4):604-6.
 36. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Annals of Internal Medicine*. 1998;129(3):229–240.
 37. Czapiński J. *Nikotynizm w Polsce. Raport dla World Health Organization*. Warszawa, 2011.
 38. Ćwiek D, Braniecka-Woźniak D, Fryc D, Grochans E, Rygielska M. Ocena możliwości samoopieki i zapotrzebowania na źródła wsparcia społecznego u kobiet z problemem niepłodności. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. 2009; 55(2):35-38.
 39. Das M, Gillott DJ, Saridogan E, Djahanbakhch, O. Anti-Müllerian hormone is increased in follicular fluid from unstimulated ovaries in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2008;23(9):2122-26.
 40. De Kat AC, Broekmans FJ, Laven JS, Van der Schouw YT. Anti-Müllerian Hormone as a marker of ovarian reserve in relation to cardio-metabolic health: a narrative review. *Maturitas*. 2015;80(3):251-57.
 41. De Kat AC, Dam V, Onland-Moret NC, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, van der Schouw YT. Unraveling the associations of age and menopause with cardiovascular risk factors in a large population-based study. *BMC Medicine*. 2017;15(1):2.
 42. De Kat AC, van der Schouw YT, Eijkemans MJ, Herber-Gast GC, Visser JA, Verschuren WM, Broekmans FJ. Back to the basics of ovarian aging:

- a population-based study on longitudinal anti-Müllerian hormone decline. *BMC Medicine*. 2016;14(1):151.
43. De Kat AC, Verschuren WM, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, & van der Schouw YT. Anti-Müllerian hormone trajectories are associated with cardiovascular disease in women: results from the Doetinchem cohort study. *Circulation*. 2017;135(6):556-65.
 44. De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging, *Fertility and Sterility*. 2002;77(2): 357-62.
 45. Debiève, F, Pampfer S, Thomas K. Inhibin and activin production and subunit expression in human placental cells cultured in vitro. *Molecular Human Reproduction*. 2000;6(8):743-49.
 46. Deurenberg P, Weststrate JA, Seidel JC. Body mass index as measure of body fatness: age and sex- specific formulas. *British Journal of Nutrition*. 1991; 65: 105–14.
 47. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction*. 2016;22(6):709-24.
 48. Di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard JY, Whitty A, Josso N, Pepinsky BR, Cate RL. Processing of anti-Müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- β . *Molecular Endocrinology*. 2010;24(11):2193-206.
 49. Di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Cate R. Cloning expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Molecular Endocrinology*. 1994;8(8):1006-20.
 50. Diamanti-Kandarakis E, Katsikis I, Piperi C, Kandaraki E, Piouka A, Papavassiliou AG, Panidis D. Increase serum advanced glycation end-products is a distinct finding in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS), *Clinical Endocrinology*. 2008;69(4): 634-41.
 51. Dong Y, Zhou F, Sun Y. Psychological stress is related to a decrease of serum anti-müllerian hormone level in infertile women. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15:51.

52. Dólleman M, Verschuren WM, Eijkemans MJ, Dollé ME, Jansen EH, Broekmans FJ, van der Schouw YT. Reproductive and Lifestyle Determinants of Anti-Müllerian Hormone in a Large Population-based Study; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013; 98 (5): 2106–2115.
53. Dufour DL, Slather ML. Comparative and evolutionary dimensions of the energetics of human pregnancy and lactation. *American Journal of Human Biology*. 2002;14:584–602.
54. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Human Reproduction*. 2002;124(5):601-9.
55. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999;140(12):5789-96.
56. Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal M, Ben-Chetrit, A, Algur N, Zylber-Haran E., Spitz IM. Serum anti-Müllerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. *Human Reproduction*. 2005;20(7):1814-19.
57. Faddy MJ, Gosden RG. Physiology: a mathematical model of follicle dynamics in the human ovary. *Human Reproduction*. 1995;10(4):770-75.
58. Faiman C, Winter JS, Reyes FI. Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. *Clinics in Obstetrics and Gynecology*. 1976;3(3):467.
59. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005;433:269–277.
60. Fanchin R., Schonäuer LM ,Righini C ,Guibourdenche, J ,Frydman R, Taieb, J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reproduction*. 2003;18(2):323-27.
61. Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer, J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Human Reproduction*. 2005;20(4):923-27.
62. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, Chang J, Bulent O, Yildiz, Joop SE, Laven, Boivin J, Petraglia F, Wijeyeratne CN, Robert J, Norman J, Dunaif A, Franks S, Wild RA, DumesicD, Barnhart K.

- Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility*. 2012;97(1):28-38.
63. Feldman RA, O'Neill K, Butts SF, Dokras A. Antimüllerian Hormone Levels and Cardiometabolic Risk in Young Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Fertility and Sterility*. 2017; 107(1):276-281.
 64. Ferin M. Stress and the reproductive cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999;84:1768–74.
 65. Fleming R, Kelsey TW, Anderson RA, Wallace WH, Nelson SM. Interpreting human follicular recruitment and antimüllerian hormone concentrations throughout life. *Fertility and Sterility*. 2012;98(5):1097-102.
 66. Foltyn W, Strzelczyk J, Marek B, Kajdaniuk D, Siemińska L, Zemczak A, Blicharz-Dorniak J, Kos-Kudła B. Selected markers of endothelial dysfunction in women with polycystic ovary syndrome, *Endokrynologia Polska*. 2011;62(3):243-48.
 67. Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. Morphometric study of the human neonatal ovary. *The Anatomical Record*. 1991;231(2):201-8.
 68. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72:694-701.
 69. Gardner DG, Shoback D, Lewiński A [red.wyd.pol]. *Endokrynologia ogólna i kliniczna Greenspana*, Tom.II. Wyd.2, Lublin, Wyd. Czelej, 2011.
 70. Garg D, Tal R. The role of AMH in the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *Reproductive Biomedical Online*. 2016;33(1),15-28.
 71. Gassner D, Jung R. First Fully Automated Immunoassay for anti-Müllerian Hormone. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2014;52 (8):1143-52.
 72. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1994;79(4):1158-65.
 73. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 1996; 17(2):121-55.

74. Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture, *Fertility and Sterility*. 2008;89(5):1364-70.
75. Guedikian AA, Lee AY, Grogan TR, Abbott DH, Largaespada K, Chazenbalk GD, Dumesic DA. Reproductive and metabolic determinants of granulosa cell dysfunction in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2018;109(3):508-15.
76. Hadlow N, Longhurst K, McClements A, Natalwala J, Brown SJ, Matson PL. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. *Fertility and Sterility*. 2010;99:1791–97.
77. Hagen K, Sorensen C, Aksglaede L, Main K. Serum levels of anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010;95(11):5003-10.
78. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A. Low concentration of circulating anti-Müllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*. 2012;98:1602–1608.
79. Halawaty S, El Katten E, Azab H, ElGhamry N, Al.-Inany . Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 2010;32:687-690.
80. Hambridge HL, Mumford SL, Mattison DR, Ye A, Pollack AZ, Bloom MS, Schisterman EF. The influence of sporadic anovulation on hormone levels in ovulatory cycles. *Human Reproduction*. 2013;28(6):1687-94.
81. Hanke W. Czynniki zawodowe i styl życia a płodność. *Niepłodność i rozród wspomagany*. Red. Radwan J, Wołczyński S, Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań. 2011;19-23.
82. Hansen, K. R., Hodnett, G. M., Knowlton, N., Craig, L. B. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertility and Sterility*. 2011. 95(1):170-75.
83. Haskell W.L., Lee I.-M., Pate R.R., Powell K.E., Blair S.N., Franklin B.A. i wsp.: Physical activity and public health: Updated recommendation for adults

- from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2007;39:1423–1434.
84. Homburg R, Ray A, Bhide P, Gudi A, Shah A, Timms P, Grayson K. The relationship of serum anti-Müllerian hormone with polycystic ovarian morphology and polycystic ovary syndrome: a prospective cohort study. *Human Reproduction*. 2013;28(4):1077-83.
 85. Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(31):11209-14.
 86. Hughes SM, Gallup GG. Sex differences in morphological predictors of sexual behavior: Shoulder to hip and waist to hip ratios. *Evolution and Human Behavior*. 2003;24:173–78
 87. Ingraham, HA, Hirokawa, Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee, E, Nachtigal, MW, Visser, J. Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*. 2000;55:53-67.
 88. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 5-alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999;84:2414–2418.
 89. James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine*. 2008; 263: 336–352.
 90. Jasienska G, Lipson FS, Ellison PT Thune I, Ziomkiewicz A. Symmetrical women have higher potential fertility. *Evolution and Human Behavior*. 2006;27(5):390-400.
 91. Jasienska G, Ziomkiewicz A, Ellison PT, Lipson SF, Thune I. Large Breasts and Narrow Waists Indicate High Reproductive Potential in Women. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2004;271(1545):1213-17.
 92. Jeppesen, JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, Yding Andersen, C. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*. 2013;19(8):519-27.

93. Jonard, S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Human Reproduction*. 2004;10(2):107-17.
94. Jura C, Klag J, *Podstawy embriologii zwierząt i człowieka*, tom 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005.
95. Juul A, Hagen CP, Aksglaede L, Sørensen K, Mouritsen A, Frederiksen H, Maina KM et al. Endocrine Evaluation of Reproductive Function in Girls during Infancy, Childhood and Adolescence. *Endocrine development Basel*. 2012;22:24–39.
96. Kaczmarek M, The timing of natural menopause in Poland and associated factors. *Maturitas* 2007;57(2):139-53.
97. Kaczmarek M, Zróżnicowanie wieku menopauzy naturalnej wśród polskich kobiet ze względu na historię okresu rozrodczego. *Przegląd Menopauzalny*. 2007;2:69–76.
98. Kaczmarek M. Poznańskie studia z filozofii nauki. *Filozoficzne i metodologiczne konteksty w badaniach biologicznych*. 2014;23(2):119-144.
99. Kaczmarek M, Wolański N. *Rozwój biologiczny człowieka od poczęcia do śmierci*. Warszawa, Wyd. PWN, 2018.
100. Karapanou O, Papadimitriou A. Determinants of menarche, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8(1):115.
101. Kelly-Weder S, O'Connor A. Modifiable Risk Factors for Impaired Fertility in Women: What Nurse Practitioners Need to Know. *American Academy of Nurse Practitioners*. 2006;18(6),268-76.
102. Kelsey TW, Wallace WH. Ovarian volume correlates strongly with the number of nongrowing follicles in the human ovary. *Obstetrics and gynecology international*. Vol.2012:5
103. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. a validated model of serum anti-Müllerian hormone from conception to menopause, *PLoS one*. 2011;6(7): e22024.
104. Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, Nelson SM, Wallace WH. Data-driven assessment of the human ovarian reserve. *Molecular Human Reproduction*. 2012; 18(2):79-87.

105. Kerkhof GF, Leunissen RW, Willemsen RH, de Jong FH, Visser JA, Laven JS, Hokken-Koelega AC. Influence of preterm birth and small birth size on serum anti-Müllerian hormone levels in young adult women. *European Journal of Endocrinology*. 2010;163:937-944.
106. Kevenaar ME, Themmen AP, Laven JS, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Human Reproduction*. 2007; 22(6):1547-54.
107. Kevenaar ME, Themmen AP, van Kerkwijk AJ, Valkenburg O, Uitterlinden AG, de Jong FH, Visser JA. Variants in the ACVR1 gene are associated with AMH levels in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2008;1:24(1): 241-49.
108. Kevenaar ME, Themmen AP, van Kerkwijk AJ, Valkenburg O, Uitterlinden AG, de Jong FH, Laven JS, Visser JA. Variants in the ACVR1 Gene Are Associated With AMH Levels in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction*. 2009;24(1):241-9.
109. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81(5):1946-51.
110. Knight P, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Human Reproduction*. 2006;132(2) :191-206.
111. Kok HS, Onland-Moret NC, van Asselt KM, van Gils CH, van der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PHM. No association of estrogen receptor alpha and cytochrome P450c17alpha polymorphisms with age at menopause in a Dutch cohort. *Human Reproduction*. 2004; 20:536–42.
112. Konturek S., *Fizjologia człowieka*, Wrocław, Wyd. ELSEVIER Urban&Partner, 2007.
113. Kuiri-Hänninen T, Kallio S, Seuri R, Tyrväinen E, Liakka A, Tapanainen J, Dunkel L. Postnatal developmental changes in the pituitary-ovarian axis in preterm and term infant girls, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96(11):3432-39.

114. Kumar A, Kalra B, Patel A, McDavid L, Roudebush WE. Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA. *The Journal of Immunological Methods*. 2010;362(1-2): 51-9.
115. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve, *Fertility and Sterility*. 2008;90(3):737-43.
116. Lefebvre T, Dumont A, Pigny P, Dewailly D. Effect of obesity and its related metabolic factors on serum anti-Müllerian hormone concentrations in women with and without polycystic ovaries. *Reproductive Biomedicine Online*. 2017;35(3):325-330.
117. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, D'Amico R, Volpe A. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction, *Reproductive Biomedicine Online*. 2011;22(4):341-349.
118. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART), *Human Reproduction*. 2009;16(2):113-130.
119. La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?. *Clinical Endocrinology*. 2006;64(6):603-10.
120. La Marca A., Broekmans F. J., Volpe A., Fauser B. C., Macklon N. S., 2009, Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?, *Human Reproduction*. 2009;24(9): 2264-75.
121. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, Heikinheimo M. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(9):3476-83.
122. Lambalk CB, van Disseldorp J, De Koning CH, Broekmans FJ. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. *Maturitas*. 2009;63(4):280-91.
123. Lambert-Messerlian G, Dugoff L, Vidaver J, Canick JA, Malone FD, Ball RH, CH, Nyberg DA, Saade G, Eddleman K, Klugman S, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr RS, Wolfe HM, D'Alton ME. First- And Second-Trimester Down

- Syndrome Screening Markers in Pregnancies Achieved Through Assisted Reproductive Technologies (ART): a Faster Trial Study. *Prenatal Diagnosis* 2006;26(8):672-8.
124. Lambert-Messerlian G, Plante B, Eklund EE, Raker C, Moore RG. Levels of antimüllerian hormone in serum during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. 2016;105(1):208-13.
 125. Lasala C, Schteingart HF, Arouche N, Bedecarrás P, Grinspon RP, Picard JY, di Clemente N, Josso N, Rey RA. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2011 ;301(3):E539-E547.
 126. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstetrical Gynecological Survey*. 2002;57(11):755-67.
 127. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, Van Lingen BL, Jameson JL Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone β -subunit gene. *New England Journal of Medicine*. 1997;337(9):607-11.
 128. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular Human Reproduction*. 2013;19(12):828-37.
 129. Lee JY, Jee BC, Lee JR, Kim CH, Park T, Yeon BR, Seo SY, Lee WD. Age-related distributions of anti-Müllerian hormone level and anti-Müllerian hormone models. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2012; 91:970–75.
 130. Li HW, Anderson RA, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Evaluation of serum antimüllerian hormone and inhibin B concentrations in the differential diagnosis of secondary oligoamenorrhea. *Fertility and Sterility*. 2011;96:774–9.
 131. Li HW, Ng EH, Wong BP, Anderson RA, Ho PC, Yeung WS. Correlation between three assay systems for anti-Müllerian hormone (AMH) determination. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012;29(12):1443-46.
 132. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Themmen AP. Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females:

- a nomogram ranging from infancy to adulthood, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012;97(12):4650-55.
133. Lin YT, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Current opinion in Genetics and Development*. 2015 ;32: 144-52.
 134. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Dutertre M, Rey, R. Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Müllerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH Gene. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(4):550-61.
 135. Lynch CD, Sundaram R, Maisog JM, Sweeney AM, Buck Louis GM. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study—the life study. *Human Reproduction*. 2014;29:1067–75.
 136. Łomnicki A, *Wprowadzenie do statystyki*, Warszawa, Wyd. Nauk. PWN SA 2003.
 137. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinge, K, Chang RJ, Erickson GF. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(11):5321-27.
 138. Makara-Studzińska M, Wdowiak A, Bakalczuk G, Bakalczuk S, Kryś K. Problemy emocjonalne wśród par leczonych w powodu niepłodności. *Seksuologia Polska*. 2012; 10(1):28-35.
 139. Macklon NS, Fauser BC. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Archives of Medical Research*. 2001;32:595–600.
 140. Marchewka A., Dąbrowski Z., Żołądź J., *Fizjologia starzenia się. Profilaktyka i rehabilitacja*. Warszawa, Wyd. PWN, 2013.
 141. Martin R., Saller K. (1957—1966): *Lehrbuch der Anthropologie*. Bd. III. Stuttgart
 142. Massagué J. TGFβ signaling: receptors, transducers, and Mad proteins, *Cell*. 1996;85(7):947-50.
 143. Massagué J. TGFβ signalling in context, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(10): 616.

144. Mastorakos G, Pavlatou M. Exercise as a Stress Model and the Interplay Between the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal and the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axes. *Hormon and Metabolic Research*. 2005;37(9):577-84.
145. Mattison DR, Thorgeirsson SS. Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *The Lancet*. 1978;1:187-188.
146. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, Chatterjee VK. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the β -subunit of follicle-stimulating hormone. *Nature Genetics*. 1993;5(1):83.
147. McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss III JF. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015; 26(3):118-124.
148. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles, *Endocrine Reviews*. 2000;21(2):200-14.
149. McLaughlin EA, McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Human Reproduction*. 2009;137(1):1-11.
150. Meduri, G, Massin N, Guibourdenche J, Bachelot A, Fiori O, Kuttenn F, Touraine P. Serum anti-Müllerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2007;22(1):117-123.
151. Meduri G, Bachelot A, Cocca MP, Vasseur C, Rodien, P, Kuttenn, F. Molecular pathology of the FSH receptor: new insights into FSH physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008;282(1-2):130-42.
152. Meduri, G, Massin N, Guibourdenche J, Bachelot A, Fiori O, Kuttenn F, Touraine P. Serum anti-Müllerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Human Reproduction*. 2007;22(1):117-123.
153. Mitsi C, Efthimiou K. Infertility: psychological-psychopathological consequences and cognitive-behavioural interventions. *Psychiatriki*. 2014; 25:293–302.
154. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Familial concordance for age at natural menopause: results from the Breakthrough Generations Study. *Menopause*. 2011;18(9):956-961.
155. Munsterberg AN, Lovell-Badge RO. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation, *Development*. 1991;113(2): 613-24.

156. Muttukrishna S. Role of inhibin in normal and high-risk pregnancy. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2004;22(3):227-234.
157. Nakayama M, Kamisawa E, Kawauchi H, Asada Y. The effect of lifestyle factors on anti-müllerian hormone (AMH) levels in infertile Japanese women. *Fertility and Sterility*. 2014;102(3):107.
158. Nelson RJ. *An introduction to behavioral endocrinology*. Sinauer Associates. 2005.
159. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy. *Human Reproduction*. 2007;22(9):2414-21.
160. Nelson SM, Messow MC, Wallace AM, Fleming R, McConna-chie, A, Nomogram for the decline in serum antimüllerian hormone: a population study of 9601 infertility patients. *Fertility and Sterility*. 2011;95:736–741 (e1–3).
161. Olajossy-Hilkesberger L, Pawłowska B, Studzińska-Niedoborek A, Tkaczuk-Włach J, Jakiel G. The image of self in women treated due to infertility. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska [Med]* 2004; 59,14,(329): 236-240.
162. Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp, WJ, Wijdeveld ME, van Disseldorp J, van Dulmen-den Broeder E, Lambalk CB. Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*. 2012; 24(6): 664-69.
163. Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2013;305(10):E1241-47.
164. Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle, *Physiological Reports*. 2016;4(9):e12783.8.
165. Pankhurst MW, Clark CA, Zarek J, Laskin CA, McLennan IS. Changes in circulating proAMH and total AMH during healthy pregnancy and post-partum: a longitudinal study. *PloSone*. 2016;11(9):0162509.

166. Pankhurst MW, Leathart BL, Batchelor NJ, McLennan IS. The anti-Müllerian hormone precursor (proAMH) is not converted to the receptor-competent form (AMHN, C) in the circulating blood of mice. *Endocrinology*. 2016;157(4):1622-29.
167. Pankhurst MW. a putative role for anti-Müllerian hormone (AMH) in optimising ovarian reserve expenditure. *Journal of Endocrinology* 2017;233(1): R1-13.
168. Pankhurst MW, Shorakae S, Rodgers RJ, Teede HJ, Moran LJ. Efficacy of predictive models for polycystic ovary syndrome using serum levels of two anti-Müllerian hormone isoforms (proAMH and AMHN, C). *Fertility and Sterility*. 2017;108(5):851-857.
169. Parnowski T, Jernajczyk W. Inwentarz Depresji Becka w ocenie nastroju osób zdrowych i chorych na choroby afektywne (ocena pilotażowa). *Psychiatria Polska*. 1977;11:417–25.
170. Pawelczyk L. Zaburzenia cyklu miesięczkowego. *Położnictwo i ginekologia*. Red. Pisarski T., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998, 232-301.
171. Pawelczyk L, Sokalska A, Serdyńska M. Płodność u kobiet w wieku przedmenopauzalnym. *Przegląd Menopauzalny*. 2003;1:14-18.
172. Pawlikowski M. *Zaburzenia hormonalne*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.2003.
173. Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason, H. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(1): 240-45.
174. Pellatt L, Rice S, Mason HD. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high?. *Human Reproduction*. 2010;139(5):825-33.
175. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat, M, Mason HD. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2011;96(5);1246-51.
176. Peterson BD, Newton CR, Rosen KH, Skaggs GE. Gender differences in how men and women who are referred for IVF cope with infertility stress. *Human Reproduction*. 2006;21:2443–9.
177. Pierre ^a, Peigné M, Grynberg M, Arouche N, Taieb J, Hesters L, Gonzalès J, Picard JY, Dewailly D, Fanchin R, Catteau-Jonard S,di Clemente N. Loss of

- LH-induced Down-Regulation of anti-Müllerian Hormone Receptor Expression May Contribute to Anovulation in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Human Reproduction*. 2013;28 (3):762-9.
178. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-Müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003;88(12):5957-62.
 179. Piltonen, T, Morin-Papunen, L, Koivunen, R., Perheentupa A, Ruukonen, A, Tapanainen, JS. Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2005;20(7): 1820-26.
 180. Piouka, A, Farmakiotis D, Katsikis I, Macut D, Gerou S, Panidis D. Anti-Müllerian hormone levels reflect severity of PCOS but are negatively influenced by obesity: relationship with increased luteinizing hormone levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2009;296(2): E238-43.
 181. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause*. 2010;17:571-576.
 182. Polhemus DW Ovarian maturation and cyst formation in children. *Pediatrics June*. 1953;11 (6):588-594;
 183. Pryse-Davies J, Dewhurst CJ. The development of the ovary and uterus in the foetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study. *The Journal of Pathology*. 1971;103(1):5-25.
 184. Randolph Jr, JF ,Harlow SD, Helmuth ME, Zheng H, McConnell DS. Assays for inhibin B and AMH provide evidence for regular episodic secretion of inhibin B but not AMH in the follicular phase of the normal menstrual cycle. *Human Reproduction*. 2014;29(3):592-600.
 185. Rao K. Recent research in stress, coping and women's health. *Current Opinion in Psychiatry*. 2009;22(2):188–193.
 186. Ray A, Shah A, Homburg R. Is there a role of antimüllerian hormone in diagnosis of PCOS? a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*. 2012;98(3):S53.

187. Rey RA, Campo SM, Ropelato MR, Bergadá I. Hormonal Changes in Childhood and Puberty. *Puberty*. 2016; 23-37.
188. Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F, De Schepper J, Bourgain C, Smits, J. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45 X karyotype. *Fertility and Sterility*. 2004;81(4):1112-19.
189. Robak-Chołubek D, Sobstyl M., Jakiel G. Nieprawidłowe krwawienia maciczne. *Przegląd menopauzalny*. 2007; 4:246-249.
190. Robertson DM, Hale GE, Fraser IS, Hughes CL, Burger HG. Changes in serum antimüllerian hormone levels across the ovulatory menstrual cycle in late reproductive age. *Menopause*. 2011;18(5):521-24.
191. Rosen MP, Johnstone E, McCulloch CE, Schuh-Huerta SM, Sternfeld B, Reijo-Pera RA, Cedars MI. a characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age. *Fertility and Sterility*. 2012;97(1): 238-43.
192. Schmidt H, Schwarz HP. Serum concentrations of LH and FSH in the healthy newborn. *European Journal of Endocrinology*. 2000 143(2):213-215.
193. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Pera RA. Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women. *Human Reproduction*. 2010;27:594-608.
194. Serdyńska M, Pawelczyk L, Jędrzejczak P. *Epidemiologia niepłodności*. Ginekologia, Red. Słomko Z., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2008, 465-470.
195. Shaw CM, Stanczyk FZ, Egleston BL. Serum antimüllerian hormone in healthy premenopausal women. *Fertility and Sterility*. 2011;95:2718-272.
196. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Chambon P. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(1): 224-29.
197. Shinkawa O, Furuhashi N, Fukaya T, Suzuki M, Kono H, Tachibana Y. Changes of serum gonadotropin levels and sex differences in premature and mature infant during neonatal life. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1983;56(6):1327-31

198. Singh D, Randall PK .Beauty is in the eye of the plastic surgeon: Waist-hip ratio (WHR) and women's attractiveness. *Personality and Individual Differences*.2007;43:329–40
199. Siniarska A, Wolański N. Zmiany tempa rozwoju w ontogenezie człowieka i metody jego badania. *Studia Ecologiae et Bioethicae*. 2005;3:45-81.
200. Siniarska, A. Rozwój biologiczny dzieci i młodzieży z kilku wybranych regionów Polski na tle warunków życia rodziny i pewnych cech biologicznych rodziców. *Studies in Human Ecology, Supplement, 1*. 1994; 189-94.
201. Skalba P, Cygal A, Madej P, et al. 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? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011;158(2):254-9.
202. Skalba P, Cygal A, Dąbkowska-Huć A. Wpływ hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) na folikulogenezę, *Ginekologia Polska*. 2008;79:137-40.
203. Skrzypczak J, Pawelczyk L, Pisarski T. *Zaburzenia czynności rozrodczych*. Położnictwo i ginekologia. Red. Pisarski T., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998, 301-322.
204. Sobczyk M. *Statystyka*, Warszawa, Wyd. Nauk. PWN SA, 2007.
205. Sołtysiak E. Wpływ czynników socjoekonomicznych na występowanie niepłodności u kobiet. *Ginekologia Polska*. 2005;76(12):986-990.
206. Sova H , Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Hippeläinen M, Perheentupa A, Tinkanen H Hormone profiling, including anti-Müllerian hormone (AMH), for the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS) and characterization of PCOS phenotypes. *Gynecological Endocrinology*. 2019;35(7):595-600.
207. Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B, McCarthy JD, Randolph JF. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles, *Fertility and Sterility*. 2010;94(4):1482-86.
208. Sowers MR, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Harlow SD, Randolph Jr, JF. Relating smoking, obesity, insulin resistance and ovarian biomarker changes to the final menstrual period (FMP). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1204, 95.
209. Stanisław A, *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny*, Kraków, StatSoft Polska, 2007.

210. Stoddard JL, Dent CW, Shames L, Leslie Bernste L. Exercise training effects on premenstrual distress and ovarian steroid hormones. *European Journal of Applied Physiology*. 2007;99(1):27–37.
211. Streuli, I, Fraisse T, Chapron C, Bijaoui G, Bischof P, De Ziegler D. Clinical uses of anti-Müllerian hormone assays: pitfalls and promises. *Fertility and Sterility*. 2009;91(1): 226-30.
212. Stubbs SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Franks S. Anti-Müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(10):5536-43.
213. Studzińska-Niedoborek A, Tkaczuk-Włach J, Jakiel G. Subjective health selfevaluation by female patients treated due to infertility. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska [Med]* 2004;59,14(533):286-289.
214. Swamy GK, Østbye T, Skjærven R. Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *Journal of the American Medical Association*. 2008;299(12):1429-36.
215. Szamatowicz M. Niepłodność. Położnictwo i ginekologia, red. Bręborowicz G.H., Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa 2005; str.737-754.
216. Szymocha M, Bryła M, Maniecka-Bryła I. Epidemia otyłości w XXI wieku. *Zdrowie Publiczne*. 2009;119(2):207-12.
217. Szwed A, Kosińska M. Biological maturity at birth, the course of the subsequent ontogenetic stages and age at menarche, *HOMO-Journal of Comparative Human Biology*. 2012;63(4):292-300.
218. Tal R, Seifer DB, Khanimov M, Malter HE, Grazi RV, Leader B. Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. (e51-58) *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2014;211:59.
219. Te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction*. 2002; 8(2):141-54.
220. Themmen AP, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews*. 2000;21(5):551-83.

221. Topolska M., Sapuła R., Topolski A., Maciejewski M., Marczewski K. Aktywność fizyczna a zdrowie u kobiet w wieku od 19 do 65 lat w różnych dziedzinach życia. *Zamojskie Studia i Materiały. Fizjoterapia*. 2011;13(34):27-36.
222. Urbanek, M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*. 2007;3(2):103.
223. Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G & Costagliola S. Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *The EMBO Journal*. 2005;24:1954–64.
224. Urrutia M, Grinspon RP, Rey RA. Comparing the role of anti-Müllerian hormone as a marker of FSH action in male and female fertility. *Expertreview of Endocrinology and Metabolism*. 2019;14(3):203-14.
225. Van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Bart JC, Fauser, Axel PN, Themmen , Egbert R, te Velde ER. Antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study, *Fertility and Sterility*. 2005;83(4):979.
226. Van Rooij IA, Broekmans FJ, Te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, De Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve, *Human Reproduction*. 2002;17(12):3065-3071.
227. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. a molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004;29:119–126.
228. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(12): 2622-29.
229. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. (2006). Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91(6): 2100-104.
230. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function, *Reproduction*. 2006;131(1):1-9.
231. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, Themmen AP. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the

- estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology*. 2007;148(5):2301-8.
232. Visser, JA, Themmen, AP. (2014). Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;382(1):460-65.
233. Wang, J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Müllerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium, *Fertility and Sterility*. 2009;91(4):1195-1203.
234. Warren MP, Goodman LR, Exercise-included endocrine pathologies. *Journal of Endocrinological Investigation* 2003;26:873-8.
235. Weghofer A, Dietrich W, Barad DH, Gleicher N. Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Mullerian hormone levels, *Human Reproduction* 2011;26(7):1905-9.
236. Wesselink AK, Rothman KJ, Hatch EE, Mikkelsen EM, Sorensen HT, Wise LA. Age and fecundability in a North American preconception cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2017;217:6:667e1- e8.
237. WHO: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva, WHO Technical Report Series 894, 2000.
238. WHO: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision, volume 2, 2010 Edition, Geneva, 2011.
239. Wickiewicz D, Zimmer M. Otyłość a problem niepłodności u kobiet. *Perinatol Neonatol Ginekol*. 2008;1(2):138-140.
240. Windham GC, Elkin E, Fenster L, Waller K, Anderson M, Mitchell PR, Lasley B, Swan SH, Ovarian Hormones in Premenopausal Women: Variation by Demographic, Reproductive and Menstrual Cycle Characteristics, *Epidemiology*. 2002;13(6):675-684.
241. Winter JS, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C. Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1976;42(4):679-686.
242. Wolin KY, Glynn RJ, Colditz GA, Lee IM, Kawachi I. Long-term physical activity patterns and health-related quality of life in U.S. women. *American Journal of Preventive Medicine*. 2008.

243. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertility and Sterility*. 2008;89(4): 927-33.
244. Wurtman RJ. Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism*. 2002;51:11-14.
245. Zec I, Tišlarić-Medenjak D, Bukovec-Megla Ž, Harni V, Kusić Z. Serum levels of antimüllerian hormone in women with regular menstrual cycles. *Acta clinica Croatica*, 2010;49(4):405-9.
246. Ziomkiewicz^a, Ellison PT, Lipson FS, Thune I, Jasienska G. Body Fat, Energy Balance and Estradiol Levels: a Study Based on Hormonal Profiles From Complete Menstrual Cycles. *Human Reproduction* 2008; 23(11):2555-63.
247. Ziomkiewicz A, Wichary S, Jasienska G. Cognitive costs of reproduction: life-history trade-offs explain cognitive decline during pregnancy in women. *Biological Review*. 2018.