

— 総説 —

## 高齢不妊女性に対するサプリメントの有用性 Usefulness of supplements for elderly infertile women

山口 祐之<sup>1,2</sup>・佐藤 可野<sup>1</sup>・河村 和弘<sup>1\*</sup>

Yusuke Yamaguchi<sup>1,2</sup>, Yorino Sato<sup>1</sup> and Kazuhiro Kawamura<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>国際医療福祉大学大学院医学研究科 〒286-8686 成田市

<sup>2</sup>あすか製薬株式会社創薬研究本部応用創薬研究部 〒251-8555 藤沢市

<sup>1</sup>Graduate School of Medicine, International University of Health and Welfare, Narita, Chiba 286-8686, Japan

<sup>2</sup>Innovative Drug Discovery Division, Drug Development Department, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan

**要旨：**近年、不妊患者の増加と共に、生殖医療技術は目覚ましい進歩を遂げてきたが、不妊患者全体の妊娠率や出生率は向上していない。その要因として、女性の妊娠希望年齢が上昇し、卵巣機能が低下した難治性の不妊が増加したことが関与していると考えられる。これまでの基礎研究により、加齢に伴い卵巣機能が低下する過程で活性酸素による過剰な酸化ストレスが蓄積し、DNA障害、脂質過酸化、タンパク質の損傷などによって卵胞内環境が悪化することで卵子の質が低下する可能性が示唆されている。そのため高齢不妊に対する不妊治療では、卵子の質の改善を期待して、抗酸化剤やホルモンを中心としたサプリメントの服用が試みられている。本総説では、サプリメントに含まれる各種成分について、加齢による卵巣機能低下に対する有効性を実験動物などで検証した前臨床試験や、ヒト臨床試験などの最近の研究報告について概説する。

**キーワード：**サプリメント、酸化ストレス、高齢不妊、卵巣機能低下、卵子の質

**Abstract:** In recent years, with the increase in infertile patients, assisted reproductive technology has made remarkable progress, but unfortunately the pregnancy rate and live birth rate of all infertility patients have not improved. It is thought that this is related to an increase in the desired age of pregnancy among women and an increase in refractory infertility with ovarian dysfunction. According to basic research, excessive oxidative stress due to the accumulation of reactive oxygen species in the process of ovarian aging is detrimental to the environment inside the follicle, causing DNA damage, lipid peroxidation, protein damage and so on. It has been suggested that the quality of oocytes may deteriorate with aging. Therefore, in treatments for elderly infertile patients, supplemental diets, such as antioxidants and hormones, has been prescribed with the expectation of improving the quality of oocytes. This review outlines recent research reports such as preclinical animal and clinical human studies examining the efficacy of various components in supplemental diets administered for age-related ovarian dysfunction.

**Key words:** Supplemental diets, Oxidative stress, Aging infertility, Ovarian dysfunction, Oocyte quality

### はじめに

卵巣の主たる機能は、卵胞発育と生殖に必要な性ホルモンの産生である。卵巣機能は35歳頃から低下をはじめ、多くの女性では50歳頃には閉経を迎える<sup>1)</sup>。卵巣は、他臓器と比較しても最も早期に老化する臓器の一つと考えられている。卵巣の老化により、①残存卵胞数の減少、②卵子の質の低下が起こることが知られているが、このことにより妊孕

(受付 2021年9月24日／受理 2021年10月4日)  
別刷請求先：〒286-8686 千葉県成田市公津の杜4-3  
国際医療福祉大学大学院医学研究科

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: kazuhironanami@gmail.com

性は低下し、高齢不妊の原因となる<sup>2,3)</sup>。実際に、高齢女性では卵胞発育を促す性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン製剤)や抗エストロゲン製剤などの排卵誘発剤を用いた卵巣刺激に抵抗性を示して発育する卵胞数が少なくなる<sup>4,5)</sup>。加えて、卵子の質が不良なため、妊娠率は低く、流産率、染色体異常率も高いことから<sup>6)</sup>、高齢不妊は不妊治療における最大の問題となっている。

近年、先進国では女性の出産年齢の高齢化が進んでいる。わが国においても、体外受精を含む高度生殖医療を受ける患者年齢の多くは40歳前後であり、社会情勢の変化を受けながら年々高齢化している。卵巣機能低下に対する有効な治療法を確立することは重要な課題であり、これまでに我々は残存卵胞数減少による不妊に対し、新たな治療法を開発して(卵胞活性化療法, IVA: *In Vitro* Activation)臨床応用に成功した<sup>7,8)</sup>。

加齢に伴う卵子の質の低下には、卵子内のミトコンドリア機能とそれに伴い発生する活性酸素(酸化ストレス)の細胞毒性が関与することが示されている<sup>9,10)</sup>。また、老化卵子では染色体不分離による胚の異数性が増加して、初期の流産率が増加することが明らかにされている<sup>11,12)</sup>。高齢不妊に対する治療では、若年女性から提供された卵子を用いて夫の精子と体外受精を行い、受精卵(胚)を移植する方法(卵子提供)が行われているが、自己卵子の質を改善する治療は未だ確立されていない。そこで、不妊治療の場では、抗酸化作用やアンチエイジング効果を期待して、サプリメント投

与により卵子の質の低下を改善し、生殖補助医療の治療成績を向上させる試みが行われている。本稿では、これらのサプリメントの分子作用機序、ヒト培養細胞や実験動物などで検証した前臨床試験や、ヒト臨床試験などの最近の研究報告について概説する。

## ジヒドロエピアンドロステロン (DHEA: dehydroepiandrosterone)

### 1) 分子作用機序

DHEAは副腎皮質や卵胞莢膜細胞から分泌されるホルモンであり、テストステロンやエストラジオールの前駆物質である<sup>13)</sup>。血中では多くが硫酸化体(DHEA-S)として存在するが、20代で最も高値に達した後、加齢とともに低下し、40代で約半減する<sup>14)</sup>。DHEAから代謝されるテストステロンは、顆粒膜細胞のFSH(Follicle Stimulating Hormone)受容体の発現を誘導し、FSHに対する卵胞の感受性を高めることで前胞状卵胞の発育や卵子の成熟を促す(図1)<sup>15,16)</sup>。加えて、DHEAには、顆粒膜細胞増殖・卵胞発育を促すIGF-1(Insulin like Growth Factor-1)の血中濃度をヒトで上昇させる作用や<sup>17)</sup>、卵丘細胞で代謝リプログラミングを誘導することでミトコンドリア新生を促す作用などが報告されており<sup>18)</sup>、卵巣機能を改善するメカニズムは多岐に渡る可能性が考えられている。

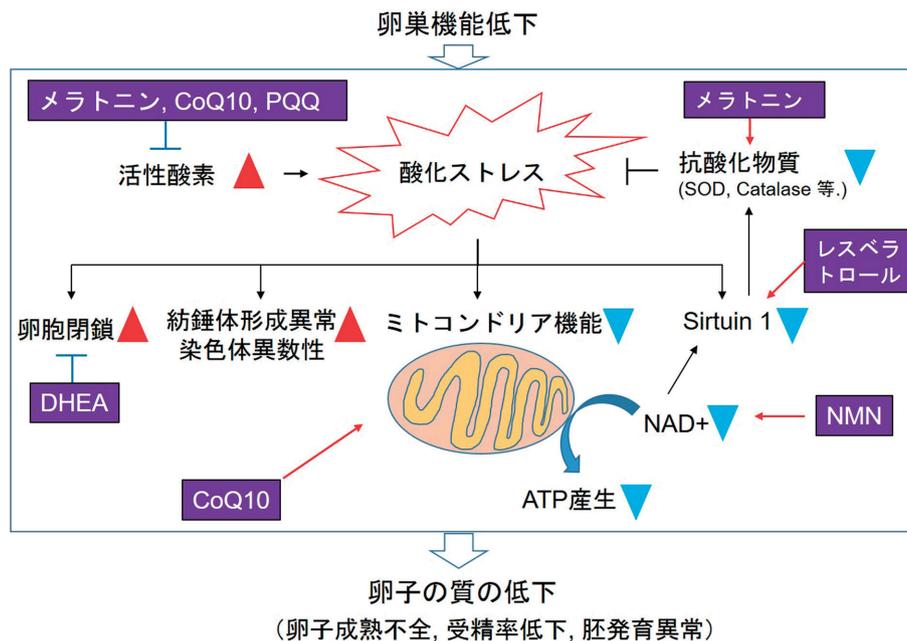


図1 高齢卵巣機能低下に対するサプリメントの作用メカニズム

高齢卵巣機能低下では、酸化ストレスの蓄積によって卵胞内環境が悪化し、卵子の質が低下する。サプリメントの主な作用点を示す。赤△：卵巣機能低下に伴い増加。青▽：卵巣機能低下に伴い低下。SOD: Superoxide dismutase.

## 2) 前臨床試験

片側卵巣を摘除して卵巣機能を低下させた羊 (24か月齢) に DHEA を10週間皮下投与すると, 卵胞発育の改善, 顆粒膜細胞の増殖促進作用を示すことが報告されているが, 投与量に関する明確な記載は無い<sup>19)</sup>. 同様に, 4-vinylcyclohexenediepoide を投与した後, 片側の卵巣を摘除することで卵巣機能を低下させたラットに, DHEA を60 mg/kgの用量で45日間皮下投与すると, アポトーシスを起こす卵胞数が有意に減少する<sup>20)</sup>. また高齢女性から採取した子宮内膜間質線維芽細胞を, 脱落膜化を誘導する際に培養液に DHEA 10 nmol/l を添加して8日間培養すると, 脱落膜化マーカーであるIGFBP1 (Insulin like Growth Factor Binding Protein 1) や子宮内膜受容能マーカーであるSpp1 (Secreted Phosphoprotein 1) 発現がコントロールと比べて増加することが報告されており<sup>21)</sup>, DHEA には着床を促進する作用も期待される.

## 3) 臨床試験

卵巣機能低下症例を対象にした9つのランダム化比較試験のメタ解析によると, DHEA 服用群で臨床妊娠率や獲得卵子数が増加するものの出生率は変化しない<sup>22)</sup>. 一方, 4つのランダム化比較試験を対象にした別のメタ解析では, DHEA を補充しても臨床妊娠率に変化が無いとの報告がある<sup>23)</sup>. また, 卵子の質に関しても, ランダム化比較試験で DHEA 服用後の IVF (*In Vitro* Fertilization) 成績が報告されているが, 受精卵子数が増加した試験<sup>24)</sup>と, 増加しなかった試験が報告されており<sup>25)</sup>, 一定の見解が得られていない (表1). なお, 早発卵巣不全 (POI: premature ovarian insufficiency) の患者 (31名) を対照にした前向き観察研究では, DHEA を12か月間服用しても卵状卵胞数や血中AMH (Anti-Müllerian Hormone) 濃度に変動はなく, 卵巣機能の改善は見られなかったとの報告が有り (表1), 卵巣機能不全の患者では DHEA の効果が低い可能性も示唆されている<sup>26)</sup>. ヒト卵巣機能低下症例では, 卵子の質の改善も含めて DHEA の有効

性を示唆する臨床試験結果は散見される. しかしながら, 出生率の改善まで検証した試験は少なく, 臨床妊娠率を改善しないとの報告もあることなどから, 高齢不妊に対する DHEA の有効性については更なる検証が必要と考えられる.

## メラトニン

### 1) 分子作用機序

松果体から産生されるメラトニンは, 明暗周期や光刺激で分泌が調節されるホルモンであり, 睡眠や覚醒, 体温などの概日リズム (サーカディアンリズム) の調節に関与する. また, メラトニンは活性酸素種などに対し直接的にラジカルスカベンジャーとして働き, 強い抗酸化作用を有する (図1)<sup>27)</sup>. 加えて, メラトニン受容体 (MT1, MT2) を介して抗酸化酵素である SOD (Superoxide dismutase) や GPX (Glutathione Peroxidase) の酵素活性と mRNA 発現の両方を増加させ, 間接的な抗酸化作用も有する (図1)<sup>28)</sup>. メラトニンはヒトの卵胞液中にも存在しており, メラトニン受容体が卵子や顆粒膜細胞にも発現していることから, 卵巣局所で直接的な抗酸化作用を発揮している可能性が報告されている<sup>29, 30)</sup>. 抗酸化作用の他, DNA 修復やテロメア長の維持, またミトコンドリアの発生と機能に関与する Sirtuin 活性化など, 卵巣機能低下予防に複数のメカニズムが関与している可能性も示されている<sup>30)</sup>.

### 2) 前臨床試験

ヒト以外の哺乳動物において, 未成熟卵の体外成熟培養 (IVM: *In Vitro* Maturation) の培養液にメラトニンを添加することで, 受精卵子の成熟が促進され, 胚盤胞への発育も促進されることの報告が有る<sup>31, 32)</sup>. また, マウス (6か月齢) から採取した卵子をメラトニン 10 μmol/l 存在下で培養することでミトコンドリア機能の改善を示唆する結果も報告されている<sup>33)</sup>. 動物実験では, メラトニンをマウス (2~3か月齢) に12か月間飲水投与 (10 mg/kg/日相当) すると, 加

表1 卵巣機能低下に対するサプリメントの臨床試験成績

サプリメント	患者	試験デザイン	例数	服用[用量, 期間]	結果	年	筆者[文献]
DHEA	卵巣機能低下	ランダム化比較	140 (70S/70C)	75 mg/日, 3か月	増加: 臨床妊娠率, 回収卵子数, 受精卵子数 減少: ゴナドトロピン総投与量および投与期間	2016	Kotb [24]
DHEA	卵巣機能低下	二重盲検ランダム化比較	32 (16S/16C)	75 mg/日, 12週	改善なし: ゴナドトロピン総投与量, 卵状卵胞数, 血中AMH濃度, 回収卵子数, 受精卵子数	2014	Yeung [25]
DHEA	早発卵巣不全	前向き観察	31 (31S)	75 mg/日, 12か月	改善なし: 卵状卵胞数, 血中AMH濃度	2018	Wong [26]
メラトニン	卵巣機能低下	二重盲検ランダム化比較	66 (32S/34C)	3 mg/日, 月経5日目から卵子採取まで連日	増加: 成熟卵子数, 良好胚数 改善なし: 臨床妊娠率	2017	Jahromi [36]
CoQ10	卵巣機能低下	ランダム化比較	169 (76S/93C)	600 mg/日, 60日	増加: 採卵数, 受精率, 良好胚数 低下: ゴナドトロピン総投与量	2018	Xu [43]

S: サプリメント, C: コントロール.

齢に伴う腹仔数低下、卵巣内残存卵胞数の減少、胚盤胞到達率低下が抑制されることが報告されている<sup>34)</sup>。このとき、ミトコンドリア機能の改善、活性酸素産生の減少、ATP産生の増加などがみられている。また、MT1 knock outマウスを用いた検討により、高齢マウスに対するメラトニンの卵巣機能改善作用には、卵子におけるMT1とAMPKシグナル経路が重要である可能性が示されている<sup>35)</sup>。以上、メラトニンは卵子のIVMの培養液に添加して成熟、受精能、胚発育を向上させること、あるいは長期間服用することでも加齢に伴う卵子の質の低下を改善し、卵胞数の減少も抑制する可能性が報告されている。

### 3) 臨床試験

DOR (Decreased Ovarian reserve) の女性66人を対象に二重盲検ランダム化比較試験が実施されている。メラトニン (3 mg/日、月経5日目から卵子採取まで連日、32名) を併用しながら卵巣刺激-体外受精胚移植を実施すると、コントロール群 (34名) と比べて成熟卵子数、良好胚数が増加したが、臨床妊娠率には変化がないとの報告がある (表1)<sup>36)</sup>。他に、DORやPOI症例に対して実施された臨床試験はない。なお、前回のIVF-ET (*In Vitro Fertilization-Embryo Transfer*) が不成功に終わり受精率が50%未満であった56名の症例を対象とした試験では、メラトニン (3 mg/日) を、月経5日目から卵子採取まで連日服用することで、受精率が有意に向上したとの報告もあるなど<sup>37)</sup>、不妊症患者におけるIVF-ETの治療成績を向上させるとの報告は散見されるが、高齢不妊に対しては未だエビデンスが少ない。

## コエンザイムQ10 (CoQ10: Coenzyme Q10)

### 1) 分子作用機序

CoQ10はユビキノンとも呼ばれる脂溶性成分であり、主に生体内で合成され、ヒト卵胞液中にも存在している<sup>38)</sup>。CoQ10は、ミトコンドリア電子伝達系の必須成分としてATP (Adenosine Triphosphate) 合成の効率を高める補酵素として機能する (図1)。また、ATP産生に伴い生じる活性酸素に対しても、フリーラジカルスカベンジャーとして抗酸化作用を発揮する (図1)。加齢に伴い、臓器中のCoQ10含量が低下することから<sup>39)</sup>、CoQ10補充により抗酸化作用やATP産生亢進の両面からミトコンドリア機能を改善することで卵巣機能低下を遅らせる効果が期待されている。

### 2) 前臨床試験

38歳以上の不妊患者から採取した未成熟卵をCoQ10 50  $\mu\text{mol/l}$  存在下でIVMを行うと、卵子成熟率が高まり、減数分裂後の染色体異数性が減少するとの報告がある<sup>40)</sup>。同様に、39歳以上の高齢不妊患者から採取した顆粒膜細胞では、若年層と比べてミトコンドリア電子伝達系が機能低下しており、この機能低下はCoQ10の可溶性類似体であるCoQ1の添加によって回復することが報告されている<sup>41)</sup>。また、長期間のCoQ10服用によっても加齢に伴う卵巣機能低下を防止

しうる可能性がマウスを用いた検討で明らかにされている。マウスにCoQ10を22 mg/kgの用量で15週間皮下投与すると、加齢に伴う排卵数減少や産仔数減少が抑制され、妊孕能が改善する結果が示されている<sup>42)</sup>。CoQ10は、顆粒膜細胞や卵子のミトコンドリア機能を改善することで卵子の質を改善し、長期服用によって卵巣機能低下を防止する可能性が報告されている。

### 3) 臨床試験

生殖補助医療施行予定の患者 (169名) に対するCoQ10補充の効果について、35歳未満のDOR患者を対照にしたランダム化比較試験が実施されている (表1)<sup>43)</sup>。CoQ10を600mg/日、60日間内服した群 (76名) は、コントロール群 (93名) に比べて卵巣刺激に要したゴナドトロピン製剤の量が有意に少なく、採卵数に加えて、受精率、良好胚数が増加している。胚移植あたり及び治療周期あたりの妊娠率や出産率も有意ではないもののCoQ10補充群で高く、卵子の質の低下を改善する可能性が示されている。しかしながら、本試験以外に高齢卵巣機能低下症例を対象にした臨床試験の報告がなく、CoQ10のヒトでの有効性を証明するためには更なるエビデンスの蓄積が必要である。

## レスベラトロール

### 1) 分子作用機序

レスベラトロールは、ブドウの果皮や赤ワイン、ピーナッツ等に含まれる天然ポリフェノールである。レスベラトロールは、 $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であるSirtuin 1 (SIRT1) を活性化し、抗酸化作用を発揮すると共に、ミトコンドリア新生や機能増強を促す (図1)。レスベラトロールは、顆粒膜細胞や卵子でもSIRT1活性化を介して、卵巣機能低下を予防する作用が期待される<sup>44)</sup>。

### 2) 前臨床試験

顕微授精施行中の38～45歳の女性 (64名) から採取したGV期の未熟卵子のIVMの際に、レスベラトロール 1  $\mu\text{mol/l}$  を含む培養液を用いた群では、非添加群と比べてミトコンドリア機能が上昇し、紡錘体形成や染色体分布が異常である卵子の割合が低下する<sup>45)</sup>。この報告では、高齢マウス (48～52週齢) から採取した卵子を体外培養する検討も実施している。レスベラトロール 1  $\mu\text{mol/l}$  を含む培養液を用いた群で、卵子成熟、受精率、胚盤胞到達率が上昇すると共に、SIRT1の他、抗酸化酵素であるSOD、GPX4 (Glutathione Peroxidase 4) およびCAT (catalase) のmRNA発現が増加する結果が示されている。また、マウス (2～3か月齢) にレスベラトロール (30 mg/l) を12～14か月間飲水投与すると、コントロール群と比べたときの卵巣内卵胞数や、雄と交配させたときの産児獲得率および産児数が増加し、長期投与によって卵巣機能低下を防止する可能性が示されている<sup>46)</sup>。

### 3) 臨床試験

これまでに、高齢卵巣機能低下に対するレスベラトロールの効果を検証した臨床試験は実施されていない。但し、胚移植周期の黄体期にレスベラトロールを200 mg/日の用量で連日服用した検討では(102例, 204周期)、臨床妊娠率が低下し、流産率が上昇したとの報告が有る<sup>47)</sup>。レスベラトロールにはヒト子宮内膜の膜脱落を抑制する作用があるため<sup>48)</sup>、服用する際は着床時期を避けるなどの注意が必要かもしれない。

## ニコチンアミド・モノヌクレオチド (NMN: Nicotinamide mononucleotide)

### 1) 分子作用機序

NMNは、生体内でニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼによる代謝を受け、NAD<sup>+</sup>となる。NAD<sup>+</sup>は、ミトコンドリア内で電子供与体としてATP産生に関与するとともに、ヒストン脱アセチル化酵素であるSirtuinの補酵素として機能する。NMN投与によって、加齢に伴い低下した卵巣内NAD<sup>+</sup>を補給し、ミトコンドリア機能の改善、Sirtuin活性化を介して卵巣機能を改善することが期待される(図1)。

### 2) 前臨床試験

NMNを200 mg/kgの用量で高齢マウス(64~68週齢)に腹腔内投与すると、コントロールと比べて卵子中のNAD<sup>+</sup>濃度が回復し、排卵数の増加、卵子のfragmentationが抑制される結果が示されている<sup>49)</sup>。また、高齢マウスの受精卵をNMN 1 μmol/lを含む培養液でIVMを行うと、非添加群と比べて胚盤胞到達率が上昇する結果が示されており、卵子の質を直接改善する効果も期待される<sup>49)</sup>。さらに、NMN(0.5g/l)を4週間飲水投与した高齢マウス(14~16か月齢)を雄と交配させると、コントロール群と比べて産児獲得率や産児数が増加し、NMN摂取により高齢マウスの妊孕能が改善するとの結果も示されている<sup>50)</sup>。しかしこれまで、NMNが卵子の質を改善する結果は報告されているが、いずれもヒト以外の哺乳動物での検討である。

### 3) 臨床試験

卵巣機能低下に対するNMNの臨床効果を検証したデータは未だ報告されていない。

## ピロロキノリンキノン (PQQ: pyrroloquinoline quinone)

### 1) 分子作用機序

PQQはバクテリアで発見され、酸化還元補酵素として機能するビタミン様化合物である。卵巣保護作用の作用機序としては、フリーラジカルスカベンジャーとして顆粒膜細胞の分裂時に生じる過剰な活性酸素を除去することで、アポトーシスやミトコンドリア変性を抑制する作用が報告されている(図1)<sup>51)</sup>。また、Nrf2活性化による抗酸化遺伝子

群発現誘導といった間接的な抗酸化作用に加え<sup>52)</sup>、PGC-1α依存的にミトコンドリア新生を促す作用なども明らかにされており<sup>53)</sup>、これらも卵巣機能低下防止に寄与する可能性が考えられる。

### 2) 前臨床試験

PQQをマウス(20日齢)に2 mg/kg/日で4日間飲水投与した後、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)を投与すると、非投与群と比較してTUNEL陽性顆粒膜細胞の減少、排卵前卵胞数の増加がみられる<sup>51)</sup>。また、排卵数もPQQ投与群で有意に増加するが、得られた卵子を体外受精しても受精率と胚盤胞到達率はコントロール群と差がなく、PQQは卵子の質に悪影響を及ぼさないことが示されている<sup>51)</sup>。したがってPQQ投与により、卵巣刺激下において、より多くの卵子が得られる可能性が考えられる。

### 3) 臨床試験

臨床では、0.2 mg/kgの用量でPQQを単回経口摂取すると血中のPQQ濃度が上昇するとともに、脂質過酸化物の分解中に生じるチオバルビツール酸反応性物質(Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS)の血中濃度が低下する知見が得られており、PQQの抗酸化作用はヒトでも有効であると思われる<sup>54)</sup>。しかしながら、ヒト卵巣機能不全患者に対する有効性を検証した試験は未だ報告がない。

## まとめ

高齢卵巣機能不全では、卵胞発育を促す性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン製剤)や抗エストロゲン製剤などの排卵誘発剤を用いた卵巣刺激に抵抗性を示す。そのため、ゴナドトロピン製剤の投与量や投与回数を増やした卵巣刺激治療が行われるが、その治療効果は限定的であり、治療が長期に渡ることあることから、患者やパートナーにとって経済面・精神面での負担が大きくなる。このような状況下、患者が妊孕能の改善効果を期待してサプリメントを摂取する場面は多い。サプリメントは比較的安価であり、複数の選択肢の中から本人の意思で購入できるため、患者にとっては利便性が良い。しかしながら、本稿で示した通り、サプリメントは動物実験では一定の効果が確認されているが、ヒトでは有効性についてエビデンスがない、あるいは一定の結論が得られていない状況である(表1)。この要因として、DORやpoor responderについて統一された診断基準がないことや、サプリメントの最適な用量、服用期間が明らかにされていないことなども影響していると考えられる。今後、高齢卵巣機能不全に対するサプリメントの有効性について、ヒトでのより多くのエビデンスの蓄積が必要である。

## 文献

- 1) Leridon, H. (2004): Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. Hum. Reprod.,

- 19, 1548–1553.
- 2) Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W. and Lambalk, C.B. (2006): A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update*, 12, 685–718.
  - 3) Gougeon, A. (1998): Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas*, 30, 137–142.
  - 4) Ferraretti, A.P., Marca, A. La., Fauser, B.C., Tarlatzis, B., Nargund, G. and Gianaroli, L. (2011): ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum. Reprod.*, 26, 1616–1624.
  - 5) Jacobsk, S.L., Metzger, D.A., Dodson, W.C. and Haney A.F. (1990): Effect of age on response to human menopausal gonadotropin stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71, 1525–1530.
  - 6) Gleicher, N., Weghofer, A. and Barad, D.H. (2011): Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 9, 23.
  - 7) Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S. Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B. and Hsueh, A.J. (2013): Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, 17474–17479.
  - 8) Hsueh, A. J., Kawamura, K., Cheng, Y. and Fauser, B. C. (2015): Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr. Rev.*, 36, 1–24.
  - 9) Grondahl, M. L., Andersen, C. Y., Bogstad, J., Nielsen, F.C., Meinertz, H. and Borup, R. (2010): Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum. Reprod.*, 25, 957–968.
  - 10) Bentov, Y. and Casper, R.F. (2013): The aging oocyte--can mitochondrial function be improved? *Fertil. Steril.*, 99, 18–22.
  - 11) Nagaoka, S.I., Hassold, T.J. and Hunt, P.A. (2012): Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.*, 13, 493–504.
  - 12) Mikwar, M., MacFarlane, A.J. and Marchetti, F. (2020): Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, 785, 108320.
  - 13) Kroboth, P.D., Salek, F.S., Pittenger, A.L., Fabian, T.J. and Frye, R.F. (1999): DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.*, 39, 327–348.
  - 14) Enomoto, M., Adachi, H., Fukami, A., Furuki, K., Satoh, A., Otsuka, M., Kumagae, S., Nanjo, Y., Shigetoh, Y. and Imaizumi, T. (2008): Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels predict longevity in men: 27-year follow-up study in a community-based cohort (Tanushimaru study). *J. Am. Geriatr. Soc.*, 56, 994–998.
  - 15) Nielsen, M.E., Rasmussen, I.A., Kristensen, S.G., Christensen, S.T., Mollgard, K., Andersen, E.W., Byskov, A.G. and Andersen, C.Y. (2011): In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Mol. Hum. Reprod.*, 17, 63–70.
  - 16) Garcia-Velasco, J.A., Rodriguez, S., Agudo, D., Pacheco, A., Schneider, J. and Pellicer, A. (2012): FSH receptor in vitro modulation by testosterone and hCG in human luteinized granulosa cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 165, 259–264.
  - 17) Xie, M., Zhong, Y., Xue, Q., Wu, M., Deng, X., Santos, H.O. Tan, S.C. Kord-Varkaneh, H. and Jiao P. (2020): Impact of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on serum levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1): A dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp. Gerontol.*, 136, 110949.
  - 18) Li, C., Lin, L. and Tsui, K. (2021): Dehydroepiandrosterone Shifts Energy Metabolism to Increase Mitochondrial Biogenesis in Female Fertility with Advancing Age. *Nutrients*, 13, 2449.
  - 19) Narkwicheck, A., Jayaprakasan, K., Maalouf, W.E., Hernandez-Medrano, J.H., Pincott-Allen, C. and Campbell, B.K. (2014): Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development. *Hum. Reprod.*, 29, 146–154.
  - 20) Ozatik, F.Y., Ozatik, O., Yigitaslan, S., Kaygisiz, B. and Erol, K. (2020): Do Resveratrol and Dehydroepiandrosterone Increase Diminished Ovarian Reserve? *Eurasian J. Med.*, 52, 6–11.
  - 21) Gibson, D.A., Simitsidellis, L., Kelepouri, O., Critchley, H. and Saunders, P. (2018): Dehydroepiandrosterone enhances decidualization in women of advanced reproductive age. *Fertil. Steril.*, 109, 728–734.
  - 22) Lin, J., Dang, Y., Guo, G. and Wang, Z. (2017): The influence of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for in vitro fertilization in women with diminished ovarian reserve: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 10, 15878–15885.
  - 23) Qin, J.C., Fan, L. and Qin, A.P. (2017): The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.*, 46, 1–7.
  - 24) Kotb, M., Hassan, A. and AwadAllah, A. (2016): Does dehydroepiandrosterone improve pregnancy rate in women undergoing IVF/ICSI with expected poor ovarian response according to the Bologna criteria? A randomized controlled trial. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 200, 11–15.
  - 25) Yeung, T., Chai, J., Li, R., Lee, V., Ho, P. and Ng, E. (2014): A randomized, controlled, pilot trial on the effect of dehydroepiandrosterone on ovarian response markers, ovarian response, and in vitro fertilization outcomes in poor responders. *Fertil. Steril.*, 102, 108–115.
  - 26) Wong, Q., Yeung, T., Yung, S. Ko, J., Li, H. and Ng, E. (2018): The effect of 12-month dehydroepiandrosterone supplementation on the menstrual pattern, ovarian

- reserve markers, and safety profile in women with premature ovarian insufficiency. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 35, 857–862.
- 27) Poeggeler, B., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D. and Manchester, L.C. (1993): Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J. Pineal. Res.*, 14, 151–168.
- 28) Moniruzzaman, M., Ghosal, I., Das, D. and Chakraborty, S.B. (2018): Melatonin ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFκB pathway. *Biol. Res.*, 51, 17.
- 29) Niles, L.P., Wang, J., Shen, L., Lobb, D.K. and Younglai, E.V. (1999): Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 107–110.
- 30) Tamura, H., Jozaki, M., Tanabe, M., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Tamura, I., Maekawa, R., Sato, S., Taketani, T., Takasaki, A., Reiter, R.J. and Sugino, N. (2020): Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. *Int. Mol. Sci.*, 21, 1135.
- 31) Keshavarzi, S., Salehi, M., Farifteh-Nobijari, F., Hosseini, T., Hosseini, S., Ghazifard, A., Novin, M.G., Fallah-Omrani, V., Nourozian, M. and Hosseini, A. (2018): Melatonin modifies histone acetylation during in vitro maturation of mouse oocytes. *Cell J.*, 20, 244–249.
- 32) Marques, T.C., da Silva Santos, E.C., Diesel, T.O., Leme, L.O., Martins, C.F., Dode, M., Alves, B.G., Costa, Fph., de Oliveira, E.B. and Gambarini, M.L. (2018): Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.*, 53, 226–236.
- 33) Almohammed, Z., Moghani-Ghoroghi, F., Ragerdi-Kashani, I., Fathi, R., Tahaei, L.S., Naji, M. and Pasbakhsh, P. (2020): The Effect of Melatonin on Mitochondrial Function and Autophagy in In Vitro Matured Oocytes of Aged Mice. *Cell J.*, 22, 9–16.
- 34) Song, C., Peng, W., Yin, S., Zhao, J., Fu, B., Zhang, J., Mao, T., Wu, H. and Zhang, Y. (2016): Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci. Rep.*, 6, 35165.
- 35) Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., Tian, X., Yao, Y., Ji, P. and Liu, G. (2019): Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway. *J. Pineal. Res.*, 66, e12550.
- 36) Jahromi, B.N., Sadeghi, S., Alipour, S., Parsanezhad, M.E. and Alamdarloo, S.M. (2017): Effect of Melatonin on the Outcome of Assisted Reproductive Technique Cycles in Women with Diminished Ovarian Reserve: A Double-Blinded Randomized Clinical Trial. *Iran. J. Med. Sci.*, 42, 73–78.
- 37) Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J. and Sugino, N. (2008): Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal. Res.*, 44, 280–287.
- 38) Akarsu, S., Gode, F., Isik, A.Z., Dikmen, Z.G. and Tekindal, M.A. (2017): The association between coenzyme Q10 concentrations in follicular fluid with embryo morphokinetics and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 34, 599–605.
- 39) Hernandez-Camacho, J.D., Bernier, M., Lopez-Lluch, G. and Navas, P. (2018): Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease. *Front. Physiol.*, 9, 44.
- 40) Ma, L., Cai, L., Hu, M., Wang, J., Xie, J., Xing, Y., Shen, J., Cui, Y., Liu, X.J. and Liu, J. (2020): Coenzyme Q10 supplementation of human oocyte in vitro maturation reduces postmeiotic aneuploidies. *Fertil. Steril.*, 114, 331–337.
- 41) Ben-Meir, A., Yahalomi, S., Moshe, B., Shufaro, Y., Reubinoff, B. and Saada, A. (2015): Coenzyme Q-dependent mitochondrial respiratory chain activity in granulosa cells is reduced with aging. *Fertil. Steril.*, 104, 724–727.
- 42) Ben-Meir, A., Burstein, E., Borrego-Alvarez, A., Chong, J., Wong, E., Yavorska, T., Naranian, T., Chi, M., Wang, Y., Bentov, Y., Alexis, J., Meriano, J., Sung, H., Gasser, D.L., Moley, K.H., Hekimi, S., Casper, R.F. and Jurisicova, A. (2015): Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. *Aging Cell*, 14, 887–895.
- 43) Xu, Y., Nisenblat, V., Lu, C., Li, R., Qiao, J., Zhen, X. and Wang, S. (2018): Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 16, 29.
- 44) Han, Y., Luo, H., Wang, H., Cai, J. and Zhang, Y. (2017): SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF-κB signaling with anti-inflammatory functions. *Apoptosis*, 22, 1260–1272.
- 45) Liu, M., Sun, A., Zhao, S., Liu, H., Ma, S., Li, M., Huai, Y., Zhao, H. and Liu, H. (2018): Resveratrol improves in vitro maturation of oocytes in aged mice and humans. *Fertil. Steril.*, 109, 900–907.
- 46) Liu, M., Yin, Y., Ye, X., Zeng, M., Zhao, Q., Keefe, D. L. and Liu, L. (2013): Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum. Reprod.*, 28, 707–717.
- 47) Ochiai, A., Kuroda, K., Ikemoto, Y., Ozaki, R., Nakagawa, K., Nojiri, S., Takeda, S. and Sugiyama, R. (2019): Influence of resveratrol supplementation on IVF-embryo transfer cycle outcomes. *Reprod. Biomed. Online*, 39, 205–210.
- 48) Ochiai, A., Kuroda, K., Ozaki, R., Ikemoto, Y., Murakami, K., Muter, J., Matsumoto, A., Itakura, A., Bosens, J.J. and Takeda, S. (2019): Resveratrol inhibits decidualization by accelerating downregulation of the CRABP2-RAR pathway in

- differentiating human endometrial stromal cells. *Cell Death Dis.*, 10, 276.
- 49) Bertoldo, M.J., Listijono, D.R., Ho, W., Riepsamen, A.H., Goss, D.M., Richani, D., Jin, X. L., Mahbub, S., Campbell, J.M., Habibalahi, A., Loh, W., Youngson, N.A., Maniam, J., Wong, A., Selesniemi, K., Bustamante, S., Li, C., Zhao, Y., Marinova, M.B., Kim, L., Lau, L., Wu, R.M., Mikolaizak, A.S., Araki, T., Le Couteur, D.G., Turner, N., Morris, M.J., Walters, K.A., Goldys, E., O'Neill, C., Gilchrist, R.B., Sinclair, D.A., Homer, H.A. and Wu, L.E. (2020): NAD<sup>+</sup> Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging. *Cell Rep.*, 30, 1670–1681.
- 50) Miao, Y., Cui, Z., Gao, Q., Rui, R. and Xiong, B. (2020): Nicotinamide Mononucleotide Supplementation Reverses the Declining Quality of Maternally Aged Oocytes. *Cell Rep.*, 32, 107987.
- 51) Hoque, S.A., Umehara, T., Kawai, T. and Shimada, M. (2021): Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries. *Free Radic. Biol. Med.*, 163, 344–355.
- 52) Huang, C., Fan, Z., Han, D., Johnston, L. J., Ma, X. and Wang, F. (2021): Pyrroloquinoline quinone regulates the redox status in vitro and in vivo of weaned pigs via the Nrf2/HO-1 pathway. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 12, 77.
- 53) Chowanadisai, W., Bauerly, K.A., Tchapanian, E., Wong, A., Cortopassi, G.A. and Rucker, R.B. (2010): Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression. *J. Biol. Chem.*, 285, 142–152.
- 54) Harris, C.B., Chowanadisai, W., Mishchuk, D.O., Satre, M.A., Slupsky, C.M. and Rucker, R.B. (2013): Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects. *J Nutr. Biochem.*, 24, 2076–2084.