



**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**IVF TEDAVİSİ ALAN KADINLARDA FOLİKÜL SIVISINDAKİ  
FOLLİSTATİN VE AKTİVİN DÜZEYLERİNİN OOSİT  
MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**DR.NEJLA GÜLTEKİN  
UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL, 2009**



**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**IVF TEDAVİSİ ALAN KADINLARDA FOLİKÜL SIVISINDAKİ  
FOLLİSTATİN VE AKTİVİN DÜZEYLERİNİN OOSİT  
MORFOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**DR.NEJLA GÜLTEKİN  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: PROF. DR. MİTHAT ERENUS  
İSTANBUL, 2009**

## ÖNSÖZ

### **TEŞEKKÜRLER**

*Asistanlık eğitimim süresince bana emek veren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocalarım; Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih Durmuşoğlu' na, sayın Prof. Dr. Mithat Erenus 'a, sayın Prof. Dr. Nejat Ceyhan' a, sayın Prof. Dr. Zehra Neşe Kavak' a, Sayın Doç. Dr. Tanju Pekin' e, sayın Doç. Dr. Hüsnü Gökaslan' a, sayın Uz. Dr. Begüm Yıldızhan 'a, sayın Uz. Dr. Tevfik Yoldemir' e teşekkür ederim.*

*Tez çalışmamın şekillenmesinde ve her aşamasında desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Prof. Dr. Mithat Erenusa' a saygılarımı sunarım.*

*Tez çalışmam esnasında her aşamada yardımını esirgemeyen sayın Gözde Erkanlı' ya teşekkür ederim.*

*Yıllarca beraber çalıştığımız ve bu geçen zaman süresince beraber olmaktan büyük keyif aldığım sevgili doktor arkadaşlarıma, tüm hemşirelerimize, Tüp bebek ekibine, personelimize sevgi ve saygılarımı sunarım.*

*Benim bu günlere gelmemde büyük emekleri bulunan, gerek maddi gerek manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim, annem, babam ve kardeşlerime sevgi , saygı ve sonsuz şükranlarımı sunarım.*

Dr. Nejla Gültekin

16.11.2009

## ÖZET

**AMAÇ :** IVF tedavisi alan kadınlarda folikül sıvısındaki follistatin ve aktivin düzeylerinin oosit morfolojisi üzerine etkilerini araştırmak.

**METOD :** Çalışmamıza uzun protokol IVF tedavisi alan 50 kadın alınmıştır. Oosit toplama sırasında en büyük çaptaki folikülden alınan sıvıdaki follistatin ve aktivin düzeyleri ölçüldü. Bu foliküllerden toplanan oosit morfolojisi değerlendirildi. Oosit morfolojisi 4 gruba ayrıldı. Folikül sıvısı ortalama follistatin ve aktivin seviyelerinin oosit morfolojisi üzerine etkileri değerlendirildi.

**BULGULAR:** Folliküler sıvıdaki follistatin ve aktivin seviyeleri oosit morfolojisi iyi olan grupta yüksek bulunmuş, morfolojinin daha kötü olduğu gruplarda foliküler sıvıdaki follistatin ve aktivin seviyeleri de anlamlı olarak düşmüştür.

**SONUÇ:** Folikül sıvılarındaki follistatin ve aktivin seviyeleri iyi morfolojiye sahip oositlerin saptanmasında bir belirteç olabilir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** follistatin ; aktivin ; oosit morfoloji; uzun protokol; IVF.

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE :** The effects of levels of follistatin and activin in follicular fluids on oocyte morphology, during IVF treatment.

**METHODS :** We study 50 patients who are treated with long protocols in IVF. We measured the levels of follistatin and activin in the biggest follicles. Oocyte morphologies are divided into 4 groups. The effects of intrafollicular mean follistatin and activin levels on oocyte morphologies are searched.

**RESULTS:** Follistatin and activin levels in follicle fluids were measured in higher concentrations in good quality oocyte groups, in poor quality oocyte groups follistatin and activin levels were in lower concentrations.

**CONCLUSION:** Follistatin and activin levels in follicle fluid can be a sign of good quality oocytes.

**KEY WORDS:** Follistatin ; activin ; oocyte morphology; long protocol; IVF.

## **KISALTMALAR:**

|              |                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IVF:         | : In vitro fertilizasyon                                                                                                                                                                                                         |
| GnRH         | : Gonadotropin uyarıcı hormon                                                                                                                                                                                                    |
| FSH          | : Folikül uyarıcı hormon                                                                                                                                                                                                         |
| LH           | : Luteinize edici hormon                                                                                                                                                                                                         |
| E2           | : Östradiol                                                                                                                                                                                                                      |
| PCOS         | : Polikistik over sendromu                                                                                                                                                                                                       |
| PCO          | : Polikistik over                                                                                                                                                                                                                |
| OPU          | : Oosit toplama                                                                                                                                                                                                                  |
| G1 (Grade 1) | : Sitoplazması berrak olan ve homojen, az granülasyon gösteren oositler.                                                                                                                                                         |
| G2 (Grade 2) | : Dejenere kutup cisimciği (yada fragmantasyonlu) ve geniş perivitellin aralıklı oositler.                                                                                                                                       |
| G3 (Grade 3) | : Çok sitoplazmik granülerite içeren oositler ; oosit koyu renkli olup granülerite homojen veya oositin merkezinde etrafı parlak renkli bir zon ile çevrilmiş olabilir.                                                          |
| G4 (Grade 4) | : Endositik orijinli sitoplazmik vakül, yoğun granül ve lipit materyali içeren 10 micromilimetre boyutlu refrakter cisimcik veya pronükleer yapı görünümü veren yumuşak endoplazmik retikulum ( SER)keseciklerinden oluşan yapı. |
| SPSS         | : Statistical Package for Social Science                                                                                                                                                                                         |
| MI           | : Metafaz I                                                                                                                                                                                                                      |
| MII          | : Metafaz II                                                                                                                                                                                                                     |

## İÇİNDEKİLER

|                           |      |
|---------------------------|------|
| Önsöz                     | i    |
| Özet                      | ii   |
| İngilizce özet (Abstract) | iii  |
| Kısaltmalar               | iv   |
| İçindekiler               | v-vi |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ                               | 1  |
| 2. GENEL BİLGİLER                              | 6  |
| 2.1. OVER EMBRYOLOJİSİ VE GELİŞİMİ             | 6  |
| 2.1.1. İnsan Overi                             | 6  |
| 2.1.2. Oosit Formasyonu                        | 6  |
| 2.1.3. Folikül Formasyonu                      | 8  |
| 2.1.4. Foliküler Büyüme                        | 8  |
| 2.1.5. Gonadotropinin folikül üzerine etkisi   | 9  |
| 2.1.6. Over Rezervi                            | 9  |
| 2.1.7. Ovulasyon                               | 10 |
| 2.2. HORMON BİYOSENTEZİ VE MEKANİZMASI         | 11 |
| 2.2.1. İki Hücre Teoremi                       | 11 |
| 2.2.2. Aktivin                                 | 13 |
| 2.2.3. Follistatin                             | 13 |
| 3. ARAŞTIRMA BASAMAKLARI                       | 15 |
| 3.1. GEREÇ VE YÖNTEM                           | 15 |
| 3.1.1. Oosit Morfolojisinin Derecelendirilmesi | 15 |
| 3.1.2. Araştırmaya Alınma Kriterleri           | 16 |

|        |                                        |    |
|--------|----------------------------------------|----|
| 3.1.3. | Araştırmadan ıkarılma Kriterleri      | 16 |
| 3.1.4. | Araştırmada Kullanılabilecek Olanaklar | 17 |
| 4.     | BULGULAR                               | 18 |
| 5.     | TARTIşMA                               | 28 |
| 6.     | KAYNAKLAR                              | 33 |
| 7.     | EKLER                                  | 45 |
| 7.1.   | Araştırma Etik Kurul Onayı             | 45 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite 1 yıl korunmasız ilişkiye rağmen spontan gebe kalamama durumu olarak açıklanmaktadır (1). Sağlıklı çiftlerin 1 yıllık korunmasız ilişki ile gebe kalma olasılıkları % 85- % 90' dır. Dolayısıyla çiftlerin % 10- %15' i infertildir (1). 2007' de yapılmış bir araştırmada dünya popülasyonunda 72.4 milyon kişinin infertil olduğu saptanmıştır (2).

İnfertiliteyi etkileyen en önemli faktörlerin başında yaş faktörü gelebilmektedir. Bilindiği üzere kadın fizyolojisinde overdeki oosit sayısı menapoz yaşına doğru ilerledikçe azalmaktadır. Eshre Capri Workshop grup tarafından özellikle 30 yaşın üzerindeki kadınlarda feküditinin azaldığı belirtilmiştir (3). Yaş, over rezervinde önemli olduğu kadar infertiliteyi etkileyen diğer faktör olan oosit kalitesini de etkilemektedir. Chuang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yaşın gebelik potansiyelini gösterdiği ortaya konulmuştur (4). Bukman ve arkadaşları tarafından yaşın hem oosit kalitesini hem de over rezervini belirlediği gösterilmiştir (5). İnfertiliteyi etkileyen diğer faktörler ise oosit kalitesi ve embriyo kalitesidir. Embriyo kalitesi hem oosit kalitesi hem de sperm kalitesi ile bağlantılıdır. Günümüze kadar yapılmış araştırmalar yaşın oosit kalitesini etkilediğini göstermekte olup oosit kalitesini etkileyen diğer faktörler halen araştırılmaktadır. Oosit kalitesi serum ve foliküler sıvıdaki hormonal denge ile ilişkilidir. En çok bilinen hormonlar estradiol, folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH), androjenler olarak sınıflandırılabilirler. Yapılan çalışmalarda bazal östrojen seviyesinin 40 yaş üstü hastalarda stimülasyon parametresi olarak kullanılabileceği (6), bazal antral folikül sayısının siklus iptalini veya zayıf ovaryen cevabı gösterebileceği (7), bazal FSH seviyesinin ise over rezervinin bir bulgusu olabileceği (8) bulunmuştur. Bunların ise oosit kalitesi üzerine etkileri bulunmamıştır (6, 7, 8). Oosit maturasyonunu etkileyen faktörleri anlayabilmek için oosit gelişim prosesi olan folikülogenezi iyi değerlendirmek gerekmektedir.

Folikülogenezin erken safhalarında foliküler büyüme FSH' unundan bağımsız olarak gerçekleşir (9) Çünkü granüloza hücrelerinde preantral evreye kadar FSH reseptörü saptanmamıştır (10). Preantral evreye gelen folikül FSH reseptörlerine sahip olur . Çalışmalarda primer folikülde FSH reseptörlerin bulunmasıyla primer

folikülün büyümesi FSH bağımlı büyüme olduğu (11), Kallmann' s sendromu olan hastalarda sadece bir kaç folikülün primordial fazı geçtiği gözlenmiştir (12). FSH reseptörüne sahip folikül GnRH pulsatile frekansındaki artış ile pitüiterden FSH ve LH üretimini artırmakta (13, 14), FSH kan seviyelerinin artması granüloza hücrelerindeki aromatzasyonu sağlamaktadır (10). LH ise foliküler teka hücrelerini uyarak androjen üretimini sağlar ve androjen granüloza hücresi tarafından östrojen sentezinde kullanılır (15). LH düşük seviyelerde granüloza hücrelerinde aromatzasyonu artırırken yüksek seviyelerde granüloza hücrelerinde 5 $\alpha$ - redüktaz enzimini artırarak androjenin daha potent adrojene dönüşmesini sağlamaktadır (10). Bu androjenik ortam ise folikülün atreziye gitmesine neden olur (10). FSH' daki artış folikülün apoptoza gitmesini önleyerek folikülün büyümesini sağlamaktadır (16). Her 10 folikülden bir tanesi preovulatuvar evreye gelebilmektedir. Bu preovulatuvar evreye gelebilen folikül ise daha fazla miktarda östrojen ve inhibin üreterek androjenik ortamın gelişmesini folikülün apoptoza gitmesini önlemektedir (17, 18). Sadece dominant folikül FSH seviyesi düşse bile büyümeye devam edebilmektedir (19). Dominant folikülün düşük seviyedeki FSH düzeyine cevap vermesi yüksek düzeydeki FSH reseptörlerine veya intrafoliküler büyüme hormonlarına bağlanabilmektedir (18). Dominant folikülün gelişiminin FSH' undan başka otokrin ve parakrin etkiye sahip bazı intrafoliküler peptidlerin etkilerine bağlı olduğu in vitro koşullarda yapılan araştırmada granüloza hücre veya folikül hücre kültürlerine FSH verilmesine ile FSH' unun hücre büyümesine etkisi az olarak saptanması ile gösterilebilmektedir (20). Bilindiği üzere dominant folikül östrojen konsantrasyonu yüksek olan, FSH reseptörü fazla olan ve düşük seviyedeki FSH düzeyine cevap verebilen foliküle denilmektedir. Dolayısıyla östrojenik ortamın artırılmasını sağlayan aromataz enzimini indükleyen faktörler folikülün dominant folikül safhasına geçmesini sağlamaktadır. Aktivinin aromataz enzimini indüklediği yapılmış bir çok çalışmada gösterilmiştir (10, 18). Aktivin bağlayıcı protein olan follistatinin de aktivini inaktive ettiği için bu iki peptidin serum düzeylerinden çok oosit gelişimi üzerindeki etkileri folikül sıvısındaki otokrin ve parakrin etkiye bağlıdır (21).

Aktivin 'transforming growth factor' (TGF- $\beta$ ) ailesinden olduğu için 'transforming growth factor' özelliği olan hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu

etkilerine sahip olup folikül gelişimi üzerinde ‘dual’ ( proliferasyon ve diferansiyasyon ) etkiye sahiptir (22). Aktivin foliküllerdeki granüloza hücrelerinin çoğalmasını, FSH reseptörlerinin artmasını, LH ile indüklenen androjen üretiminin azalmasını ve hipofizden salgılanan FSH sekresyonunun artmasını sağlayarak folikül gelişimini pozitif yönde etkilemektedir (23, 24, 25). İmmatür fareler üzerinde yapılan çalışmada direkt intraovaryen inhibin ve aktivin aplikasyonunun folikülogenezi regüle ettiği ve gonadotropinlerin fonksiyonunu modüle ettiği saptanmıştır (26). Aktivin granüloza hücreleri için sadece mitojenik etkiye sahip değildir. Bunun yanında granüloza hücrelerinin diferansiyasyonunda ve ovaryen folikül morfogenezinde rol almaktadır (27). Primordial folikül mayoz bölünmenin profaz evresinde duraklamış oosit ve tek sıra skuamöz hücre içerir. Folikülogenez ile bu tek sıralı skuamöz hücreler granüloza ve teka hücrelerine dönüşürler. İnsan teka hücre kültürüne rekombinant aktivin A eklenmesi LH ve insülin - benzer büyüme faktörü - 1 (IGF - 1) ile indüklenen androjen üretimini inhibe etmiştir (28). İn vitro koşullarda farelerde aktivinin granüloza hücre üzerine etkisi FSH ile indüklenen aromataz aktiviteyi artırması ile gösterilmiştir (29, 30). Aktivin overyan folikül gelişimini teka hücrelerinden androjen üretimini azaltıp , hipofizden FSH salınımını artırdığı gibi pankreatik  $\beta$ -hücre insülin sekresyonunu da artırarak sağlar (31). Polikistik over sendromu (PKOS) olgularında ise aktivinin aktivitesinin (follistatinin aktivin bağlaması nedeniyle) azaldığı ve PKOS ’ da gözlenen androjenik ortamın arttığı gözlenmiştir (33).

Follistatinin aktivin bağlayıcı protein olduğu ve fonksiyonunun inhibe ettiği kanıtlanmıştır (34-36). Dolayısıyla follistatin intraovaryen bir aktivin regülatörü olarak çalışmakta ve folikül büyümesinde önemli rol oynamaktadır (36-38). Follistatinin birden fazla çeşidi mevcuttur. Aktivin bağlayıcı protein olarak aktivinin aktivitesini nötrleyen (39, 41) ve özellikle de 39-kDa monomerik glikoprotein yapıda olan follistatinin biyokimyasal ve fizyolojik etkisi üzerinde durulmaktadır (41, 43). Follistatinle ilgi yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Memelilerde follistatin iki farklı ‘spliced messenger ribonükleotid asit (mRNA)’ dan üretilmektedir. Bu iki farklı follistatin protein dizilimini kodlayan exon 5 ile ayrılabilir (44). 32kDa ana protein içeren küçük olan follistatin (FS 288) (45) , 35kDa ana protein içeren büyük olan follistatin ise (FS 315) olarak sınıflanmıştır (43, 45). Farklı protein

yapısındaki follistatinlerin aktiviteleri de aynı değildir. Fare pitüiterinde rekombinant FS 315 ' in rekombinant FS 288'den 10 kat daha az aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (43, 45). Follistatin düzeyi yüksek olan hayvanlarda infertilite görülmekle birlikte primer ve sekonder folikül arasında arest saptanmıştır (46). Fareler üzerinde yapılan in vitro çalışmada follistatinin ortadan kaldırılmasının folikülogenezde duraklamaya ve infertiliteye neden olduğu saptanmıştır (47). Normal siklusa sahip hastalarda mid - siklus follistatin artışı izlenirken polikistik over hastalarında bu artış izlenmemiştir (48). İn vitro çalışmalarda follistatinin sadece aktivin bağlayıcı protein olarak çalışmadığı aynı zamanda ön hipofizden hormon sekresyonunu regüle ettiği (49, 52) ve dolaşımdaki aktivinin kleransini sağladığı görülmüştür (53, 54).

İnfertiliteyi etkileyen faktör olan oosit kalitesinin belirlenmesinde önemli role sahip olan aktivinin ve aktivini bağlayıcı fonksiyonu olan follistatinin oosit morfolojisi üzerindeki etkilerini IVF tedavisi altında araştırmayı düşündük. Yapılmış bir çalışmada GnRH ile pitüiter ' down regülasyonu' sonrasında rFSH ile tedaviye alınan kadınlarda sirkülasyonda aktivin A' nın konsantrasyonunun değişmediği saptanmıştır (55). Fakat granüloza hücre kültürlerinde ise aktivin A seviyesinin rFSH ile arttığı saptanmıştır (56). Bu aktivin A' nın granüloza hücrelerinden salındığı, aktivinin ve follistatinin otokrin ve parakrin etkiye sahip olduklarını göstermektedir. Aktivin etkisini sadece aromatizasyonu artırarak değil foliküllerin dominant folikül haline gelebilmesi için gerekli FSH reseptörlerini artırarak folikülün preantral evreden antral, yani gonadotropin dominant, evreye geçmesini sağlayarak da gösterebilmektedir. Yapılmış çalışmalarda undiferansiye fare granüloza hücrelerinde serbest aktivin A seviyesinin gelişmiş foliküllerden daha yüksek oranda bulunmuştur (57, 58). Dolayısıyla aynı mekanizma PKOS hastalarında bulunan foliküler fazdaki düşük serum aktivin A seviyelerinin folikül arestinin nedeni olarak düşünülmektedir (59). IVF tedavisi almış insan kumulus hücre kültürlerinde ise aktivin A sekresyonu iyi kalitedeki oositlerde fazla miktarda bulunmuştur (60). Bu çalışma aktivinin oosit maturasyonunu sağladığını göstermektedir. Yapılmış çalışmalar ışığında IVF tedavisinde aktivinin oosit morfolojisini etkileyebileceğini ve follistatinin de aktivinin inhibe ettiği için oosit morfolojisinin belirlemede rol alabileceğini düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızın amacı; IVF tedavisinde uzun protokol uygulanan infertil kadınlarda oosit toplanması sırasında aspire edilen folliküler sıvıdaki follistatin ve aktivin seviyelerinin oosit morfolojisi üzerine etkilerini araştırmak.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. OVER EMBRYOLOJİSİ VE GELİŞİMİ**

#### **2.1.1. İnsan Overi**

Over 3 ana yapıdan oluşur. Bu yapılar korteks , medulla ve rete ovarii (hilum) olarak isimlendirilmektedir. Hilum overin mezoovariye bağlandığı yerdir. Sinir , damar yapısı

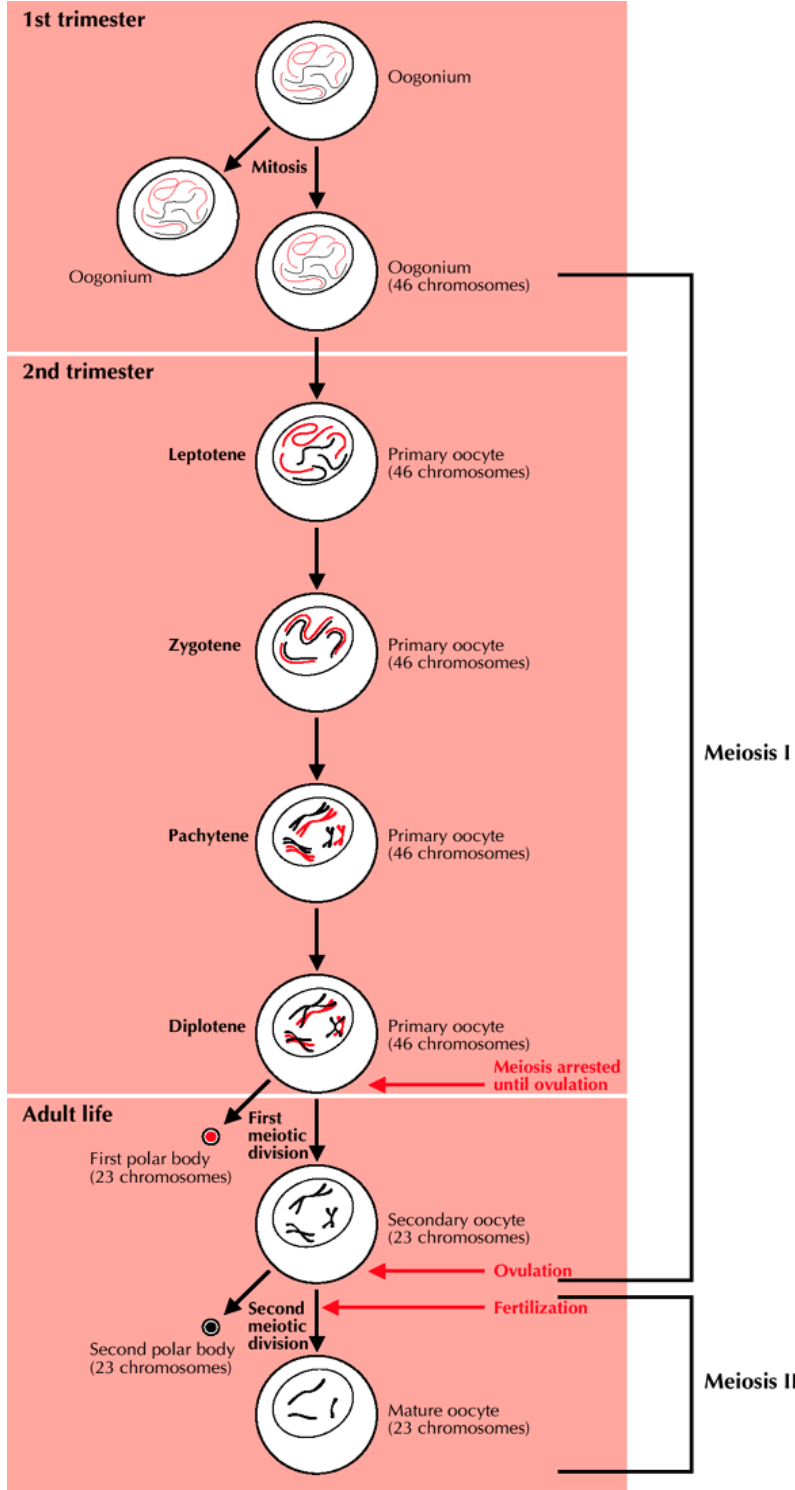
Foliküller korteksin daha iç kısmında stromaya gömülmüş olarak bulunurlar. Overin stroma dokusu konnektif doku ve interstisyel hücreler içerir. Bu interstisyel hücreler mezenkimal hücrelerden oluşur. LH ve insan koryonik gonadotropin (HCG) ile uyarılarak androjen üretimini sağlamaktadırlar (61).

#### **2.1.2. Oosit Formasyonu**

Ovaryen diferansiyasyonunun ilk bulgusu germ hücrelerinin hızlı mitotik bölünmesi olup bu hızlı bölünme ile 16. ve 20. haftalar arasında 6 - 7 milyon oogonia elde edilmektedir (62- 65). Bu sayı gonadın içerdiği maximum oogonia sayısıdır. Bu oogonia' lar 1. mayoz bölünmenin profaz evresine kadar ilerler ve duraklarlar. 1. mayozun profaz evresinde duraklayan oogoniler artık oosit olarak adlandırılırlar (66). 1. mayoz bölünme ovulasyondan önce 2. mayoz bölünme ise sperm penetrasyonu ile gerçekleşmektedir (61). Fazla genetik materyal ise her mayoz bölünmede “polar body” olarak ayrılmaktadır.

Mayoz bölünme ve oosit maturasyonu gonadotropinlerin etkisi ile oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin salgıladığı steroller ile sağlanmaktadır (67, 68). FSH, oosit ve kumulus hücreleri arasında iletişimi sağlayarak mayoz bölünmeyi indüklemektedir (61).

Mitoz bölünme, mayoz bölünme ve folikül yapımı esnasında bir çok germ hücre kaybedilmektedir. En büyük kayıp ise gebeliğin ikinci yarısında olur. Oogonilerin bir kısmı ise mayoz bölünme esnasında granüloza hücresi tarafından çevrelenmedikleri için dejenere olurken oositler folikül ile çevrelendikten sonra da atreziye gidebilirler (61).



Şekil 1b – Oositin geçirdiği mayoz I ve mayoz II' yi anlatmaktadır. (Leon Speroff, Marc A. Fritz : *Infertility. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 2005: 103).

### 2.1.3. Folikül Formasyonu

18.-20. haftalarda over medulladan orijin alan vasküler yapılar kortekse doğru ilerlerler. Bu ilerleme folikül yapımının başladığının bir göstergesidir (69). Kortekse yerleşen perivasküler hücreler mayoz faz I' i tamamlamış oositleri çevrelerler. Buna primordial folikül denir (61). Primordial folikül mayoz bölünmenin profaz evresinde duraklamış oosit ve bunu saran tek sıralı pregranüloza hücresi ve bazment membrandan oluşur. Granüloza hücrelerinin orijini tam olarak bilinmemekle birlikte epitel veya mezenkimal orijinli olduğu düşünülmektedir (61). Primordial folikülün gelişimi oosit diploten faza geçene kadar devam etmektedir. Bu gelişim esnasında skuamöz yapıdaki pregranüloza hücreleri küboidal yapıya dönüşerek granüloza hücresi olarak adlandırılmaktadır (61).

Preantral folikül, prolifer olmuş granüloza hücresi, “cal-exney” yapısı ve teka tabakasından oluşmaktadır (61). Preantral folikülün antral foliküle dönüşmesi teka tabakasının tamamlanması ile olur. Antral folikül diğer bir adı ile graafian folikül iç kısmında sıvı içermektedir (65).

### 2.1.4. Foliküler Büyüme

Foliküler büyüme öncelikle oositin büyümesi ve granüloza hücrelerinin sayısının artmasıyla başlar, teka interna, zona pellucida yapımı ile devam eder (61). Primer folikülden ovulasyona kadar geçen süre yaklaşık 85 gündür (70, 71). Antrum granüloza hücrelerinin sekresyonundan olduğu tahmin edilmekle birlikte 1875 yılında Emma Call & Seigmen Exner in Henna tarafından bulunmuştur (61, 72). İlk önceleri hücre artıklarıyla oluşan sonra içinde sıvı birikmesiyle karakterize olan bu boşluk teka hücrelerinde bulunan vasküler yapılardan granüloza hücrelerine diffüzyon yolu ile hücrelerin oksijenizasyonunun sağlanmasında önemli role sahiptir (61). Granüloza hücreleri avasküler yapılar olup oositin gelişimi ve ovulasyonu için gerekli sinyalleri özel bağlantılarla sağlamaktadır (61). Granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin konsantrasi oosite yakın granüloza hücrelerinde daha az olup bazment membrana yakın olanlarda daha çok konsantrasyonda bulunmaktadır (73).

Folikülün gelişim evreleri esnasında oosit ya ovule olur veya atreziye gider. Atrezi bir apoptotik proses olup özellikle granüloza hücrelerinde gözlenen değişikliktir.

#### **2.1.5. Gonadotropinin folikül üzerine etkisi**

İnsan overinde folikül maturasyonunda endojen hormonların ve otokrin/parakrin peptidlerin etkileri mevcuttur. Foliküler büyüme primordial folikülden preantral foliküle kadar gonadotropinden bağımsız iken preantral folikülden itibaren gonadotropinlere bağımlı hale gelebilmektedir (10). Çünkü granüloza hücrelerinde preantral evreye kadar FSH reseptörü yoktur. Preantral evreye gelen folikül FSH reseptörüne sahip olur ve FSH' unun etkisi ile aromatzasyonu sağlar (10) Böylece androjen aromataz enzimi ile östrojene çevrilerek androjenik ortamın östrojenik ortama dönüşmesi sağlanmış olur. FSH oluşan östrojen hormonu ile sinerjistik etki göstererek granüloza hücresi üzerindeki FSH reseptör sayısını artırır ve folikül dominant folikül haline gelir. LH ise düşük seviyelerde aromatzasyonu artırırken yüksek seviyelerde androjenin 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi ile daha potent androjen oluşmasını sağlar. Eğer LH seviyesi FSH' dan yüksek ise folikül atreziye gider (10). Atretik foliküller yüksek konsantrasyonda androjen içerirken düşük seviyelerde östradiol içermektedir (74, 75, 76). Dominant foliküller ise daha çok sayıda FSH reseptörüne sahip olduğu için düşük FSH düzeylerine cevap verebilmekte ve artmış aromataz enzimi ile teka hücrelerinden gelen androjenin östrodirole dönüşmesini indükler. 1940' dan beri dominant foliküllerin artmış östrojenik ortam ile karakterize olduğu bilinmektedir (77, 78, 79, 80, 81, 82).

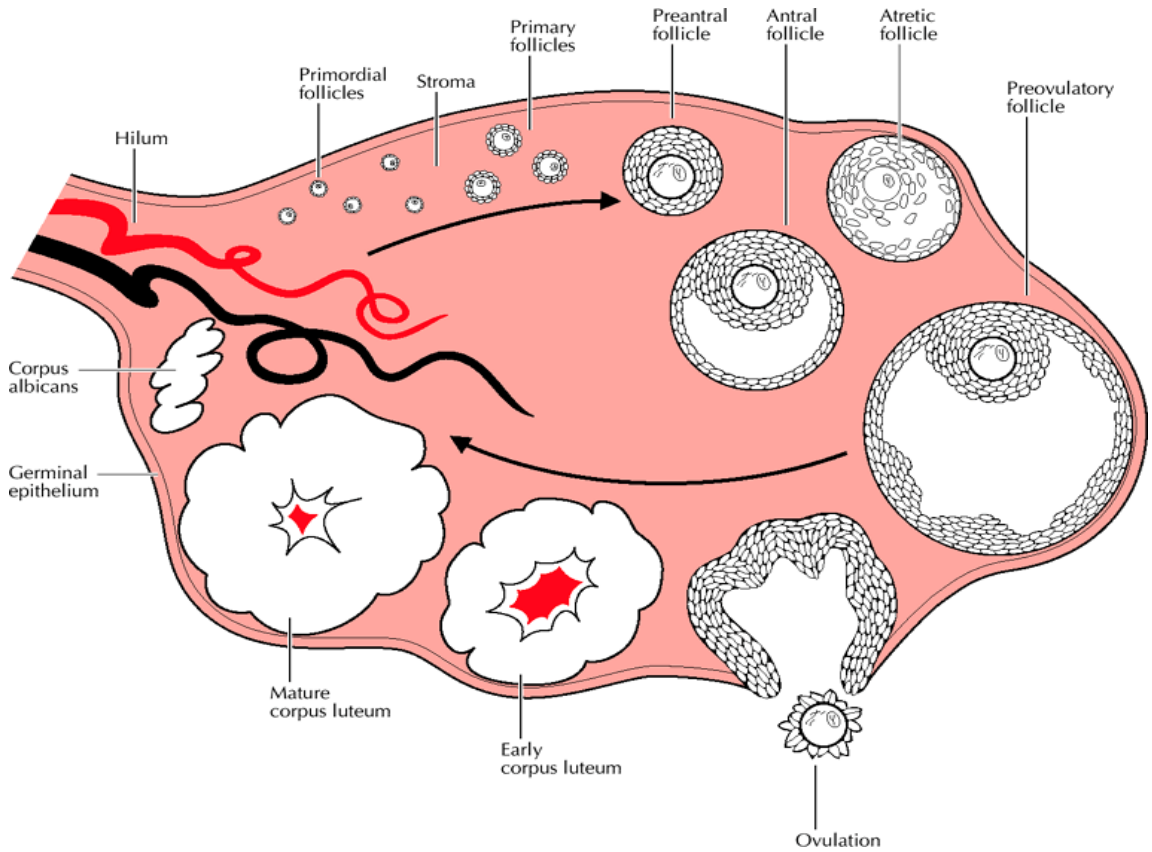
#### **2.1.6. Over Rezervi**

Bazal östrojen, FSH seviyeleri ve yaşın over rezervini gösterdiği bilinmektedir (8). Yaş ile bazal FSH birlikte kullanılırsa fonksiyonel over indeksini yani over yaşını gösterebilmektedir (4). Fakat IVF de gebelik potansiyelini gösteren ise yaştır (4). Çünkü yaş hem over rezervini hem de oosit kalitesini belirler (5). Reuss ve arkadaşları tarafından antral folikül sayısının ise over rezervini gösterdiği (83), diğer

bir çalışmada ise antral folikül sayısının siklus iptalini gösterebileceği savunulmuştur (7) Bazal östrojen seviyesi ise 40 yaş üstündeki kadınlarda stimülasyon parametresi olarak kullanılabileceği oosit kalitesini gösteremediği bildirilmiştir (6).

### 2.1.7. Ovulasyon

Ovulasyon antrumun genişlemesiyle granüloza hücreleri üzerine antral sıvı kompresyon uygulamaktadır. Bu basınç nedeniyle granüloza hücreleri arasındaki iletişim zayıflayarak kesilir ve folikülün rüptürü ile ovulasyon gerçekleşir (61).

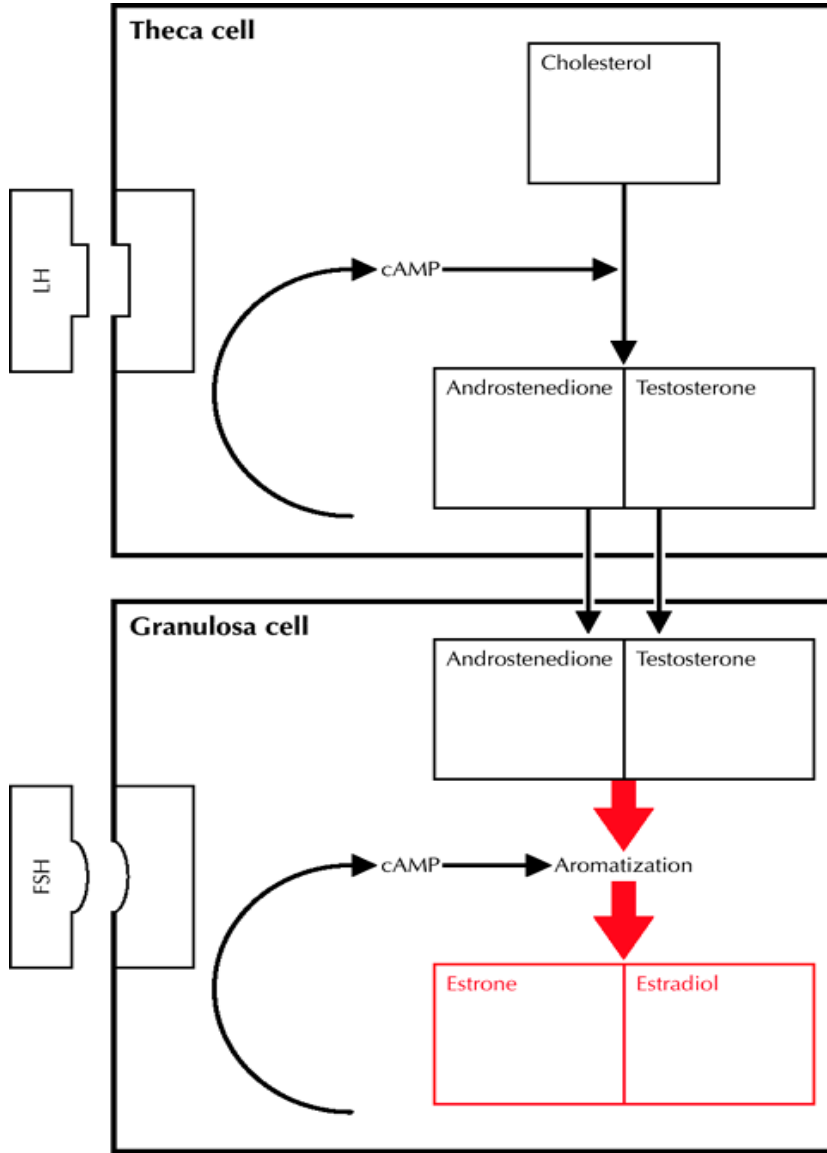


Şekil 3 – Ovulasyon prosesini göstermektedir. (Leon Speroff, Marc A. Fritz : *Infertility. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 2005: 108).

## **2.2. HORMON BİYOSENTEZİ VE MEKANİZMASI**

### **2.2.1. İki Hücre Teoremi**

FSH uyarısı ile granüloza hücreleri üzerindeki FSH reseptörleri artarak granüloza hücre proliferasyonu da tetiklenmektedir. Teka hücrelerinde ise LH reseptörleri mevcuttur. LH reseptörleri ise başlangıçta granüloza hücrelerinde bulunmamaktadır. Teka hücreleri steroidogenezden sorumlu olup LH ile uyarılınca androjen üretimini sağlar. Androjenin östrojene dönüşümünü aromatzasyon yolu ile FSH 'nın indüklediği granüloza hücrelerinde gerçekleşir. Sonuç olarak teka hücrelerinde üretilen androjen granüloza hücrelerine aktararak östrodiol üretimi sağlanır (61). İnhibin ve aktivin FSH ile uyarılan granüloza hücrelerinde üretilir ve üretilen aktivinin otokrin etki ile FSH reseptörlerini granüloza hücrelerinde artırarak FSH 'nın etkisini indüklemektedir (61). İnhibin ise teka hücrelerinde LH stimülasyonunu artırarak androjen sentezini ve dolaylı yoldan artmış aromatzasyon ile östrodiol üretimini artırmaktadır. Bu inhibin ve aktivinin androjen üretimini yapan teka hücreleri üzerindeki parakrin etkileri steroidogenezde önemli yer tutan P450c17 enzimi ile sağlanmaktadır (84).



Şekil 4 – İki hücre teoremini göstermektedir. (Leon Speroff, Marc A. Fritz : *Infertility. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 2005: 44).

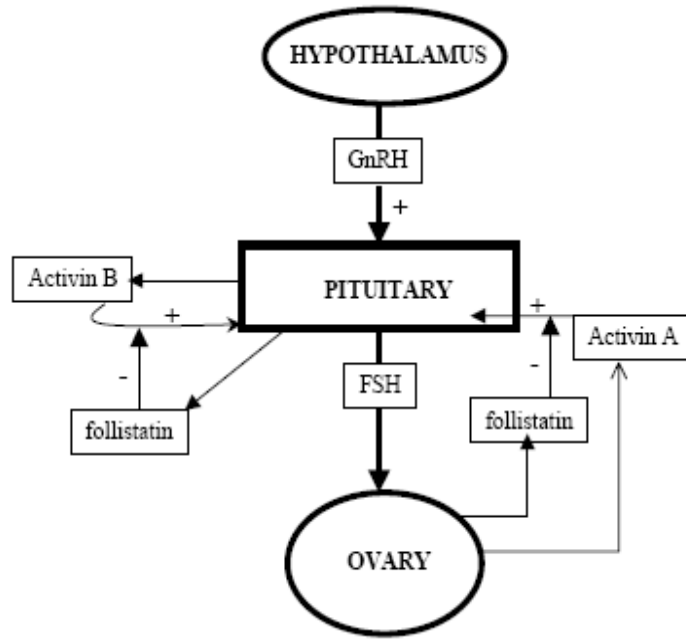
Preovulatuvar dönemde granüloza hücreleri üzerinde oluşan reseptörler sayesinde ovulasyondan sonra granüloza hücreleri LH stimülasyonu ile östrojen ve progesteron üretebilmektedirler (61). Granüloza hücrelerinde P450c17 enzimi olmadığı için bu hücrelerdeki aromatzasyon teka hücrelerinde üretilen androjen substratına bağımlıdır (61).

### **2.2.2. Aktivin**

Foliküler sıvıda ve sirkülasyonda tespit edilen pitüiter FSH salınımını uyaran ve FSH- subunit mRNA ekspresyonunu sağlayan bir proteindir (85, 86). Menstrual siklusta total aktivin seviyelerinin midsiklusda ve luteal fazdan foliküler faza geçiş safhasında sirkülasyonda yüksek seviyelerde saptanmıştır (87). Lüteo- foliküler fazda aktivinin yüksek kan seviyeleri FSH' unun erken foliküler fazda yükselmesinde önemli rol oynadığını gösterebilmektedir (88). Farelerde ve koyunlarda yapılan çalışmada Aktivinin hipofiz hücreleri üzerine direkt etki ederek FSH sekresyonunu artırdığı bulunmuştur (85, 86, 89).

### **2.2.3. Follistatin**

Follistatin anterior hipofiz hücre kültürlerinde üretilen ve hipofizden FSH salınımını inhibe ettiği bilinen folikül sıvısında bulunan sisteinden zengin aktivin yapısına benzemeyen bir moleküldür (90, 91, 92). Follistatin üzerine yapılmış çalışmalarda aktivine yüksek afinite ile bağlandığı bulunmuştur (93). Menstrual siklusta sirkülasyondaki follistatin seviyelerine bakıldığı zaman sadece tek bir çalışmada luteal fazda follistatin seviyesinin düştüğü (94) diğer çalışmalarda ise menstrual siklus boyunca serum düzeyinin değişmediği bulunmuştur (95, 96, 97, 98). Follistatinin hipofiz üzerindeki inhibitör etkisi aktivinin inaktive edilmesi ile sağlanmaktadır (99).



Şekil 1. Aktivin ve Follistatinin Pitüiter üzerine etkisini göstermektedir.

### 3. ARAŞTIRMA BASAMAKLARI

#### 3.1. GEREÇ VE YÖNTEM

İnfertilite nedeniyle IVF tedavisi amacıyla Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi (MÜTF) Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkez'ine yönlendirilmiş tüm kadınlardan kontrollü ovulasyon indüksiyonu öncesinde bazal FSH, LH, östradiol (E2) düzeyleri ölçüldü. Çalışmaya 52 kadın hasta alındı. 2 hasta "coasting" nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya alınan kadınlara MÜTF hastanesinde uygulanan uzun protokol adetini 21. günü lucrin (leuprolid asetat, Abbott, İstanbul) 1 mg IM başlandı ve hasta adetini görene kadar devam edildi. Adet gören hastanın lucrin dozu 0.5 mg 'a düşüldü ve adetinin 3. günü rekombinant FSH (gonal-f, Serono, İstanbul, Türkiye) başlandı. Rekombinat FSH doz aralığı 200 - 300 IU olarak belirlendi.

Folikülometre esnasında ikiden fazla 16.5 mm ve üstünde folikül tespit edildiğinde rekombinant Human Koryonik Gonadotropin (HCG) 10.000 ünite uygulandı. HCG yapıldıktan 34 saat sonra oosit toplama işlemi yapıldı.

Herbir folikülden elde edilen sıvılar - 20 derecede saklandı. Saklanan sıvılarda follistatin ve aktivin seviyelerine eliza yöntemi ile bakıldı.

Folikül sıvısındaki follistatin seviyelerine Human Follistatin ELISA Kit ( Albio kimyevi maddeler İth. ve Tic.A.Ş.,Ankara, Türkiye ) ve Eliza okuyucusu (Microplate reader, Ahato, Çin ) ile bakıldı.

Folikül sıvısındaki aktivin seviyelerine Activin-A Elisa Assay Kit ( Albio kimyevi maddeler İth. ve Tic.A.Ş.,Ankara, Türkiye ) ve Eliza okuyucusu (Microplate reader, Ahato, Çin ) ile bakıldı.

##### 3.1.1. Oosit Morfolojisinin Derecelendirmesi

Çalışma esnasında her bir folikülden çıkan oositler Germinal vesikül (GV) , metafaz I (MI) , metafaz II (MII) olarak sınıflandırıldı. 2 - 4 saat maturasyon süresi içerisinde MII olan oositler için ileri oosit morfolojisi gradleme sistemi uygulandı (100). Tüm oositler, tek bir embriyolog tarafından skorlanmıştır.

#### İleri Oosit Morfolojisi Gradelemesi:

Grade 1 : Sitoplazması homojen (berrak) , az yada hiç granülasyon ve sitoplazmik aktivasyon gösteren oositler.

Grade 2 : Dejenere yada fragmantasyonlu kutup cisimciği ve/veya geniş perivitellin aralığı bulunan oositler.

Grade 3 : Sitoplazmik granülasyon içeren, nispeten büyük refraktil cisimcikli oositler ve/veya koyu renkli sitoplazmalı olup oositin merkezi etrafında parlak renkli bir zon ile çevrilmiş oositler.

Grade 4 : Endositik orijinli sitoplazmik vakuol , yoğun granül ve büyük boyutlu refrakter cisimcik veya pronükleer yapı görünümü veren yumuşak endoplazmik retikulum keseciklerinden oluşan dejeneratif oositler.

#### **3.1.2. Araştırmaya Alınma Kriterleri**

İnfertilite nedeniyle IVF tedavisi amacıyla Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkez'ine başvuran;

- 25- 35 yaş ve yaş grubundaki kadınlar
- Male faktör , açıklanamayan ve tubal faktör infertil kadınlar
- BMI = 25 ve veya küçük olan kadınlar
- Long protokol uygulanan kadınlar
- Antral folikül sayısı 3 den fazla olan kadınlar (101)
- Normal ovarian cevabı olan kadınlar: IVF tedavisi esnasında 3'den fazla 16 mm in üstünde folikül geliştiren kadınlar çalışmaya alındı (101).

#### **3.1.3. Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri**

İnfertilite nedeniyle IVF tedavisi amacıyla Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkez'ine başvuran;

- 35 yaşından büyük olan kadınlar

- Endometirosiz faktör infertil kadınlar
- PCO ve PCOS olan kadınlar
- BMI 25 den büyük olan olan kadınlar
- Zayıf ovaryen cevabı olan kadınlar : IVF tedavisi esnasında 3 ve/veya daha az 16 mm üstünde folikül geliştiren kadınlar

çalışmaya alınmadı (101).

HCG yapıldığı zamanki östrodiol düzeyi çalışma kriteri olarak değerlendirilmedi.

#### **3.1.4. Araştırmada Kullanılabilecek Mevcut Olanaklar**

M.Ü. Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalında kullanılan araç- gereçler ;

- 3.75-MHz transvajinal prop (Logic 500 machine,GE, General Electric, Istanbul, Türkiye)

M.Ü. Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü Tüp Bebek Laboratuvarında kullanılan araç- gereçler ;

- Laminar flow ( K sistem)
- Etüv
- İnkübatör (Heraus BBD 6220, Almanya)
- İnvert mikroskop (Olympus, Japan)
- Stereo mikroskop ( Olympus, Japan)

İmmünoloji-Hematoloji Anabilim dalında kullanılan araç-gereçler ;

- Microplate reader (eliza okuyucusu,ahato, Çin)

İmmünoloji-Hematoloji Anabilim dalında kullanılan kodlar ;

- 100018 Hematoloji-İmmunoloji labratuvar kullanımı
- 100019 Eliza okuyucusu kullanımı
- 100022 Isı döngü cihazı kullanımı

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya uzun protokol IVF tedavisi alan 52 kadın alındı. 2 kadın coasting nedeniyle tedaviden çıkarıldı. Her kadından en iyi bir oosit alındı. Toplam 50 tane oosit toplandı. İleri oosit morfolojisi gradleme sistemine göre çalışmaya alınan kadınlar 4 gruba ayrıldı. Grup a: oosit morfolojisi grade 1 olan grup , grup b: oosit morfolojisi grade 2 olan grup. Grup c: oosit morfolojisi grade 3 olan grup ve grup d: oosit morfolojisi grade 4 olan grup. Grup a’ da toplamda 18 oosit, grup b’ de toplam 12 oosit, grup c’ de toplam 10 oosit ve grup d’ de toplam 10 oosit değerlendirmeye alınmıştır.

Grup a’ daki kadınların yaş ortalamaları  $27,39 \pm 1,54$ , grup b’ de yaş ortalamaları  $28,92 \pm 1,51$ , grup c’ de yaş ortalamaları  $30,9 \pm 2,51$ , ve grup d’deki hastaların yaş ortalamaları  $33,7 \pm 2,26$  olarak saptanmıştır. Grup a’ daki kadınlar, grup c ve grup d’ deki kadınlara göre daha genç idi ( $p= 0,0001$ , Mann-Whitney *U* test). Grup b’ deki kadınlar grup d’ deki kadınlardan daha genç idi (  $p= 0,0001$ , Mann-Whitney *U* test).

Çalışmaya alınan kadınların infertilite süreleri karşılaştırıldı. Grup a’ daki kadınların ortalama infertilite süreleri  $4,44 \pm 0,98$  yıl; grup b’ de ortalama infertilite süreleri  $6,92 \pm 1,68$  yıl; grup c’ de ortalama infertilite süreleri  $7,6 \pm 2,12$  yıl; ve grup d’ de ortalama infertilite süreleri  $9,4 \pm 1,26$  yıl olarak bulundu. Grup a’ daki kadınların ortalama infertilite süreleri diğer 3 gruptaki kadınlara göre istatistiksel olarak daha kısa idi (  $p= 0,0001$ , Mann-Whitney *U* test).

Çalışmamızdaki kadınların gonadotropin tedavi süreleri karşılaştırıldığında grup a ‘ daki kadınların ortalama tedavi süreleri  $8,39 \pm 1,04$  gün; grup b’ deki kadınların ortalama tedavi süreleri  $9,17 \pm 1,19$  gün; grup c’ deki kadınların ortalama tedavi süresi  $10,2 \pm 1,55$  gün;ve grup d’ deki kadınların ortalama tedavi süresi  $10,5 \pm 1,27$  gün olarak saptanmıştır. Grup a’da ortalama stimülasyon süresi grup d’dekinden kısa idi ( $p= 0,0001$ , Mann-Whitney *U* test).

IVF tedavisine başlamadan önce bakılan antral folikül sayılarına göre gruplar değerlendirildi. Grup a’ daki kadınların ortalama antral folikül sayısı  $10,22 \pm 2,62$  ; grup b’ deki kadınların ortalama antral folikül sayısı  $10,75 \pm 2,86$ ; grup c’ deki kadınların ortalama antral folikül sayısı  $9,4 \pm 2,98$ ; grup d’ deki kadınların ortalama

antral folikül sayısı  $11,3 \pm 3,6$  olarak saptandı. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

IVF tedavisine başlamadan önce kadınların siklusun 3.günü FSH düzeyleri ölçülmüştür. Grup a' daki kadınların ortalama başlangıç FSH düzeyi  $4,88 \pm 1,99$  IU/L; grup b' de  $3,8 \pm 1,58$  IU/L; grup c' de  $4,13 \pm 2,13$  IU/L; ve grup d' de  $5,62 \pm 1,85$  IU/L olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Siklusun 3.günü serum östradiol düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Grup a' daki kadınların ortalama başlangıç serum östradiol düzeyi  $40,78 \pm 18,75$  ng/ml; grup b' de  $53,88 \pm 18,94$  ng/ml; grup c' de  $38 \pm 13,99$  ng/ml ;ve grup d' de  $44,44 \pm 16,4$  ng/ml olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

IVF tedavisi esnasında HCG uygulama günü serum östradiol seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Grup a' daki kadınların maksimum ortalama serum östradiol düzeyi  $2316,44 \pm 649,71$  ng/ml; grup b' de  $2302,25 \pm 1025,64$  ng/ml; grup c' de  $2410,1 \pm 155,54$  ng/ml; grup d' de  $2027,9 \pm 559,44$  ng/ml olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

IVF tedavisi süresince kullanılan toplam rekombinant FSH dozu gruplar arasında karşılaştırıldığında grup a' da kullanılan ortalama total rFSH miktarı  $1637,5 \pm 265,44$  IU; grup b' de  $1906,25 \pm 451,78$  IU; grup c' de  $2315 \pm 533,36$  IU; grup d' de  $3065 \pm 363,66$  IU olarak hesaplandı. Grup a'da kullanılan toplam rFSH dozu , grup c ve grup d' de kullanılanlardan az idi ( $p= 0.0001$ , Mann-Whitney *U* test). grup b'de grup d'dekinden (  $p=0,0001$ , Mann-Whitney *U* test), grup c'de grup d'dekinden daha az dozda rFSH kullanıldı ( $p= 0,001$ , Mann-Whitney *U* test).

Tablo1. Çalışma grubunun özellikleri (tüm veriler ortalama ve standart deviyasyonda gösterilmiştir. ) \*

|                                            | <i>Grup a(n=18)</i>        | <i>Grup b(n=12)</i>         | <i>Grup c(n=10)</i>         | <i>Grup d(n=10)</i>           |
|--------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Ortalama yaş (yıl)</b>                  | 27.39±1.54 <sup>a</sup>    | 28.92±1.51 <sup>b</sup>     | 30.9±2.51 <sup>a</sup>      | 33.7±2.26 <sup>a,b</sup>      |
| <b>Siklus 3. günü FSH (IU)</b>             | 4.88±1.99                  | 3.8±1.58                    | 4.13±2.13                   | 5.62±1.85                     |
| <b>Siklus 3. günün estradiol (pg/ml)</b>   | 40.78±18.75                | 53.88±18.94                 | 38±13.99                    | 44.44±16.4                    |
| <b>Antral folikül sayısı (AFS)</b>         | 10.22 ±2.62                | 10.75±2.86                  | 9.4±2.98                    | 11.3±3.6                      |
| <b>Stimülasyon süresi (gün)</b>            | 8.39 ±1.04 <sup>c</sup>    | 9.17±.19                    | 10.2±1.55                   | 10.5±1.27 <sup>c</sup>        |
| <b>Toplam gonadotropin dozu (IU)</b>       | 1637.5±265.44 <sup>d</sup> | 1906.25±451.78 <sup>e</sup> | 2315±533.36 <sup>d, f</sup> | 3065±363.66 <sup>d,e, f</sup> |
| <b>HCG günü ortalama E2 değeri (pg/ml)</b> | 2316.44±649.71             | 2302.25±1025.64             | 2410.1±155.54               | 2027.9±559.44                 |
| <b>Ortalama infertilite süresi (yıl)</b>   | 4.44±0.98 <sup>g</sup>     | 6.92±1.68 <sup>g</sup>      | 7.6±2.12 <sup>g</sup>       | 9.4±1.26 <sup>g</sup>         |

\* Mann-Whitney U test, Bonferroni düzeltmesi p<0.0083 (0.05/6 = 0.0083)

<sup>a,b,c,d,e,g</sup> p= 0,0001

<sup>f</sup> p= 0,001

Oosit toplama günü folikül sıvılarında follistatin ve aktivin seviyelerine bakıldı. Grup a' daki kadınlarda bakılan folikül sıvısındaki ortalama follistatin seviyesi  $4902,77 \pm 439,13$  pg/ml ; grup b' de ortalama follistatin seviyesi  $4024.1667 \pm 1017$  pg/ml; grup c' de ortalama follistatin seviyesi  $3853 \pm 924.60$  pg/ml; grup d' de ortalama follistatin seviyesi  $3278 \pm 928,76$  pg/ml olarak hesaplanmıştır. Grup a'daki seviye diğer gruplardakinden yüksek bulunmuştur. Grup a ile grup b arasında ( $P=0.033$ , Mann-Whitney *U* test); grup a ile grup c arasında ( $p=0.012$ , Mann-Whitney *U* test); grup a ile grup d arasında ( $p= 0.0001$ , Mann-Whitney *U* test) istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır.

Folikül sıvısında bakılan aktivin seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Grup a' daki kadınlarda bakılan folikül sıvısındaki ortalama aktivin seviyesi  $32,69 \pm 11,94$  ng/ml; grup b' de  $9.22 \pm 3.15$  ng/ml; grup c' de  $5.26 \pm 1.85$  ng/ml; grup d' de  $2.32 \pm 0.79$  ng/ml olarak hesaplanmıştır. Grup a'daki ortalama aktivin değeri, diğer gruptakilerdeki değerlerden anlamlı derecede yüksektir. Grup a ile grup b arasında ( $p=0.0001$ , Mann-Whitney *U* test); grup a ile grup c arasında ( $p=0.0001$ , Mann-Whitney *U* test); grup a ile grup d arasında ( $p= 0.0001$ , Mann-Whitney *U* test) istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur.

Tablo 2. Folistatin ve aktivin sonuçları (Veriler ortalama ve standart deviyasyonda gösterilmiştir. ) \*

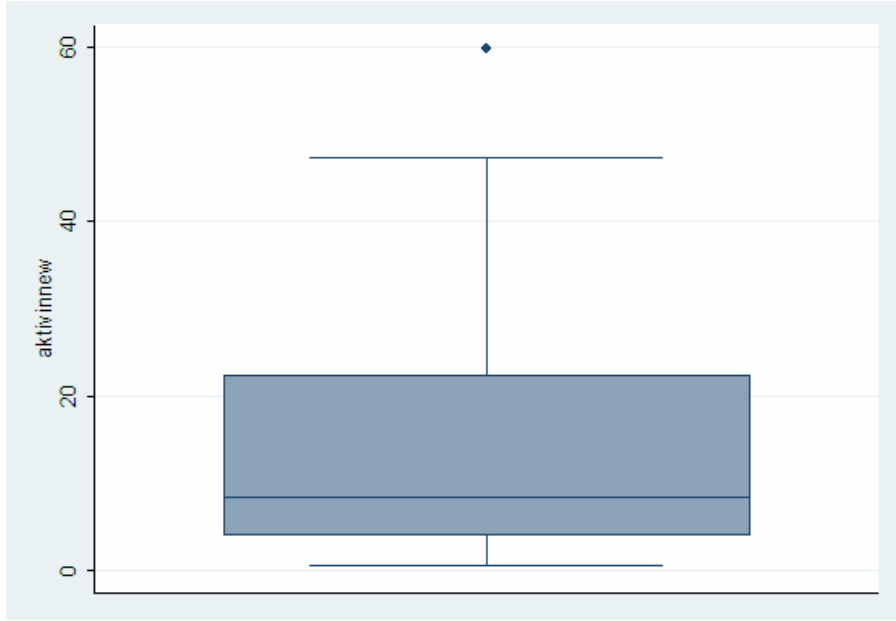
|                           | <b>Grup a(n=18)</b> | <b>Grup b(n=12)</b> | <b>Grup c(n=10)</b> | <b>Grup d(n=10)</b> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Folistatin (pg/ml)</b> | 4902.77±439.13      | 4024.1667±1017      | 3853± 924.60        | 3278±928.76         |
| <b>Aktivin (ng/ml)</b>    | 32.69± 11.94        | 9.22 ± 3.15         | 5.26 ±1.85          | 2.32 ± 0.79         |

\* Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$

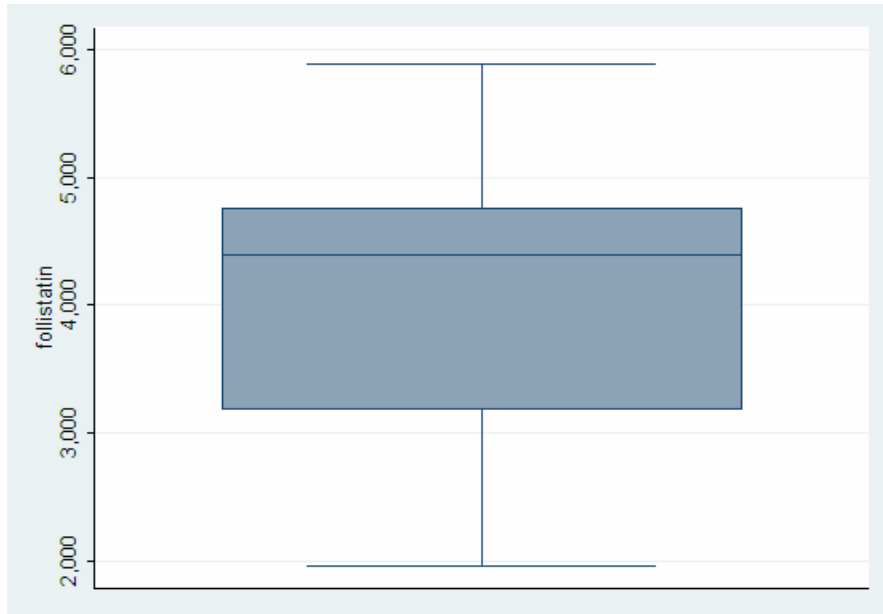
Folistatin için; grup a ile grup b;  $P=0.033$ ; grup a ile grup c;  $p=0.012$ ; grup a ile grup d;  $p= 0.0001$

Aktivin için; grup a ile grup b;  $P=0.0001$ ; grup a ile grup c;  $p=0.0001$ ; grup a ile grup d;  $p= 0.0001$

Aktivin ve folistatin değerlerinin dağılımları grafik 1 ve 2’de gösterilmiştir.

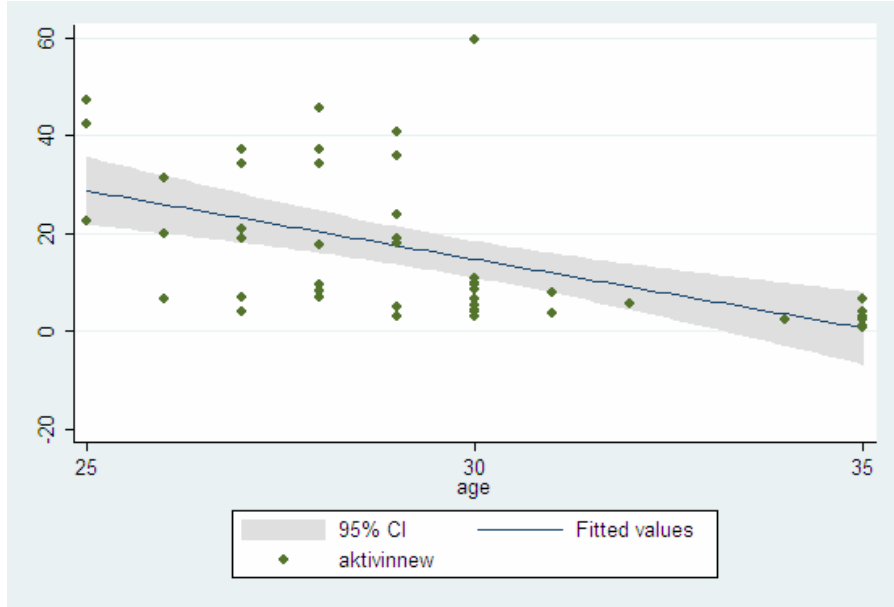


**Grafik 1. Aktivin değerlerinin boksör torbası grafięi**



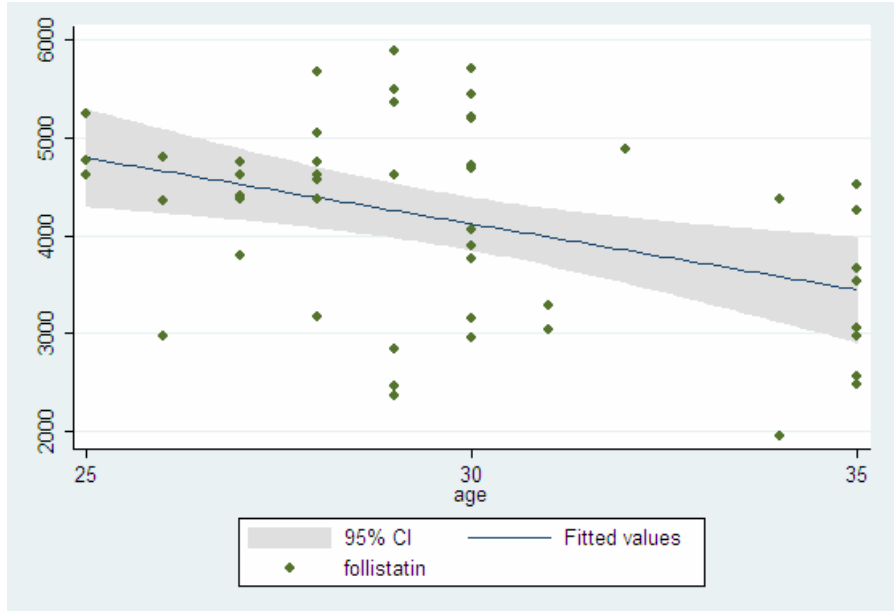
**Grafik 2.Folistatin değerlerinin boksör grafięi**

Yaş arttıkça aktivin seviyelerinde düşüş izlenmiştir (grafik 3).



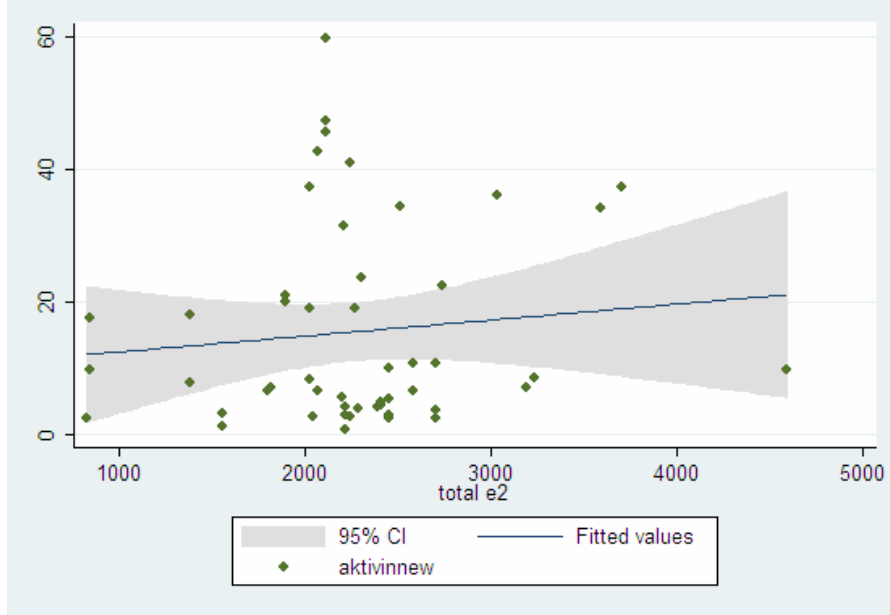
**Grafik 3.** Aktivin ile yaş arasındaki korelasyonu göstermektedir.

Yaş arttıkça follistatin seviyesinde düşüş izlenmektedir (grafik 4).



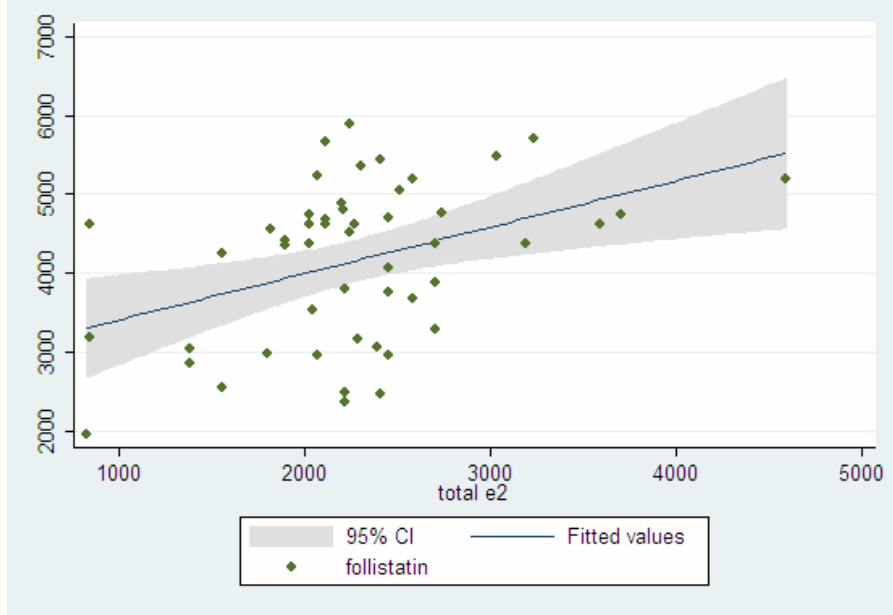
**Grafik 4.** Yaş ile Follistatin arasındaki korelasyonu göstermektedir.

HCG günü ortalama intrafoliküler aktivin düzeyleri HCG günü maksimum serum estradiol düzeyleri arttıkça artmaktadır (grafik 5).



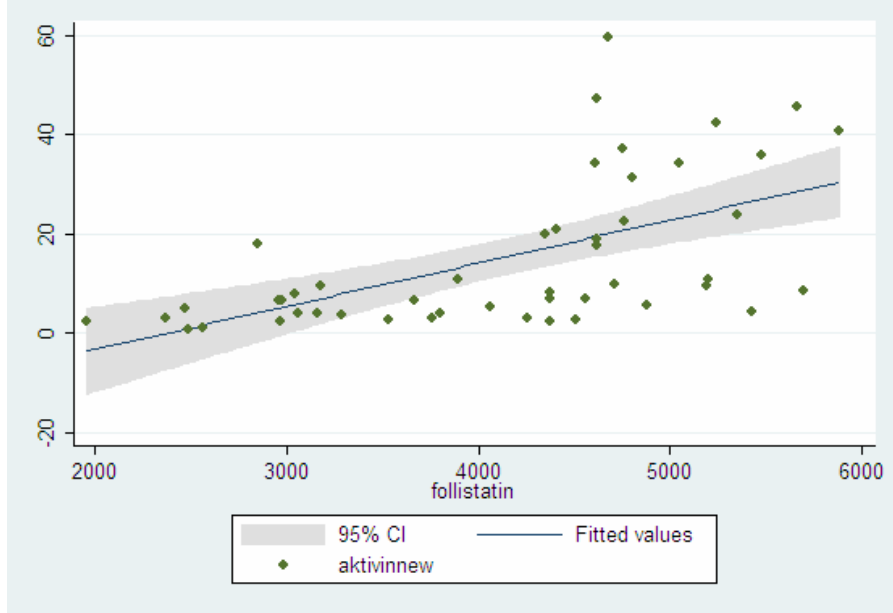
**Grafik 5. Aktivin ile HCG günü serum östradiol düzeylerinin karşılaştırılması**

HCG günü ortalama intrafoliküler follistatin düzeyleri HCG günü maksimum serum estradiol düzeyleri arttıkça artmaktadır (grafik 6).



**Grafik 6.**Follistatin konsantrasyonu ile serum östradiol düzeyi arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

HCG günü ortalama intrafoliküler follistatin seviyesi arttıkça aktivin konsantrasyonu da artmıştır. (Grafik 7).



**Grafik 7. Aktivin ile follistatin konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi göstermektedir.**

## TARTIŞMA

İdeal koşullarda ovulasyon sonucunda oluşan, matür ve fertilizasyon kapasitesi olan oosit gelişimi için, folikülogenez esnasında endokrin ve otokrin-parakrin faktörlerin harmonik olarak düzenlenmesi gerekir. Oositler granüloza hücrelerinin yokluğunda maturasyonlarını tamamlayamazlar ve oositlerin yokluğunda foliküler gelişim olamaz (102). Foliküller ve oosit matürasyon süreci karmaşık bir şekilde birbirine bağlanmış trofik değişiklikler kompleksidir. Granüloza hücrelerinden oosit büyümesini ve matürasyonunu sağlayan faktörlerin üretimi, insan foliküler sıvısı incelenerek foliküler maturasyon ve granüloza hücrelerinin işlevi açıklanabilir. İn vitro çalışmalar oosit nüklear maturasyonu ve kumulus-oosit kompleksinin gelişiminde aktivin ve follistatinin etkisini göstermiştir (103, 104).

Aktivin granüloza hücreleri üzerinde differansiyasyon ve foliküler büyüme açısından önemli role sahiptir. Yapılan çalışmalarda aktivinin granüloza hücrelerinin reagregasyonunu sağladığı gösterilmiştir. (27, 105, 106). Aktivin bu etkiyi FSH ile indüklenen aromataz aktiviteyi artırarak, granüloza hücresindeki FSH reseptör sayısını artırarak ve direkt olarak aktivin reseptörlerine bağlanarak yapmaktadır (107, 27). Dolayısıyla aktivin FSH ile birlikte steroidogenezi indükleyerek östojen ve progesteron yapımını artırır, folikül gelişimini ve oosit maturasyonunu sağlar (27). Aktivinin folikül üzerindeki etkisi granüloza hücresinde aktivin reseptörleri ile sağlanırken oosit üzerine etkisi oositteki aktivin tip 2 reseptörü ile sağlanmaktadır (27, 108). Sonuçta aktivin folikülogenezdeki olumlu etkisini intrafoliküler steroidogenezi artırarak ve aktivin ile FSH reseptörlerini uyarak yapmaktadır (27,108). Çalışmalarda aktivinin oosit maturasyonu üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Fakat oosit morfolojisi üzerindeki etki mekanizması tam bilinmemektedir. Lau ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada oosit kumulus hücrelerinde kumulus hücreleri ile aktivin arasında pozitif etkileşimin bulunması bize muhtemelen aktivinin oosit morfolojisine ve gelecekte bu oosit üzerinden gelişecek olan embriyoya olumlu etkisi olabileceğini düşündürmektedir (60).

Toshihiro ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada overyan stimülasyon tedavisi alan hastalarda bakılan intrafoliküler sıvıda follistatin seviyesi MI ve MII içeren oositlerde yüksek seviyede bulunmuştur (109). Dolayısıyla follistatinin özellikle

oosit kalitesini etkilediği oosit maturasyonu için gerekli olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda grade 1 oosit toplanan folikül sıvısındaki follistatin düzeyi 2-4. kalite oosit gruplarındakinden yüksek bulunmuş; bu farklılık grade 1, grade 2, grade 3 ve grade 4 oosit grupları arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır. Başka bir çalışmada foliküler sıvıda follistatin ve aktivinin m-RNA seviyelerinin oosit maturasyonu, fertilizasyon kapasitesi ve embriyo kalitesi incelenmiştir (110). Sonuç olarak follistatin ve aktivin seviyelerinin iyi oosit ve embriyo gelişimine direkt etkisi olduğu gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan in vitro bir çalışma follistatinin ortadan kaldırılması ile folikülogenezde duraklama ve infertilite olduğunu göstermiştir (47).

Follistatin bir aktivin bağlayıcı protein olduğu için aktivinin etkisini nötürlediği bilinmektedir (111). Lau ve ark. kumulus oosit kompleksinin kültür medyumunda yaptıkları çalışmada iyi kalite oositlerin kültür medyumunda aktivin A seviyesini yüksek bulunmuşlardır (112). Bizim çalışmamızda grade 1 oosit toplanan folikül sıvısındaki follistatin düzeyi 2., 3. ve 4. kalite oosit gruplarındakinden yüksek bulunmuş; bu farklılık grade 1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır. Çalışmamızda iyi kalitedeki oositlerin alındığı tersiyer (graafian) folikül sıvısındaki aktivin A seviyesinin yüksek seviyede bulunması, kumulus oosit komplekslerindeki aktivin A seviyesinin kumulus hücrelerinden salgılanmasından dolayı yükselebileceğini düşündürmektedir.

Farklı yaş grupları arasında foliküler fazda sirkülasyonda bulunan follistatin seviyeleri karşılaştırıldığında genç yaştaki ( yaş ortalaması 23) kadınların serum follistatin seviyeleri perimenopozdaki ( yaş ortalaması 49 ) kadınlardan daha yüksek olarak bulunmuştur (113). Çalışmamızda ise rFSH kullanan kadınlarda folikül sıvılarındaki follistatin ve aktivin seviyelerine bakılmıştır. Yaş arttıkça follistatin ve aktivin seviyelerinde azalma izlenmektedir.

Hipofiz overyan aksta follistatin ve aktivin önemli bir rol üstlenmektedir. Hipotalamusdan sentezlenen GnRH hipofizi uyarmakta ve böylece FSH salgınlamaktadır. FSH overleri uyarak folikül gelişimizi indükler. Overlerden salınan follistatin ve aktivin de hipofizden salgılanan FSH' unun kontrolünde önemli bir rol üstlenir. Foliküllerde bulunan aktivinin hipofizdeki FSH üretimine endokrin etkisi bulunmaktadır (111). 1990' larda çeşitli türlerde yapılan bir çalışmada hipofiz

hücrelerinde inhibin aktivin ve follistatinin varlığı gösterilmiştir. (114, 115, 116, 117) Aktivinin büyük bir kısmını oluşturan aktivin A dolaşımında bulunurken aktivin B ise hipofizde üretilmektedir. Hipofiz-ovaryan aksdaki FSH sekresyonunun regülasyonunu aktivin B otokrin/parakrin olarak, aktivin A ise endokrin olarak kontrolünde rol üstlenmektedir (111).

IVF’ de oosit kalitesini etkileyen faktörler ile ilgili yapılan çalışmalarda bazal FSH, östradiol ve antral folikül sayılarının oosit kalitesini göstermediği bulunmuştur (118,119,120,121). Bazal östradiol seviyesinin düşük ve yüksek seviyeleri IVF’ da siklus iptalini artırdığı gözlenmiştir (118). Bazal FSH seviyesinin overyan rezervi gösterdiği, artmış FSH’ unda overyan rezervin azaldığı, IVF tedavisine cevabın azaldığı, siklus iptalinin arttığı gösterilmiştir (119). Bazal antral folikül sayısı 4 ve daha az olan kadınlarda overyan cevabın anlamlı derecede düştüğü, siklus iptalinin arttığı, gebelik oranlarının azaldığı izlenmiştir (120). Toner ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada 35 yaş altında FSH/ E2 oranı yüksek olan kadınların gebelik oranları 40 yaş ve üstünde FSH/E2 oranları normal olan kadınlardaki gebelik oranlarından daha fazla bulunmuştur. Dolayısıyla IVF başarısının FSH seviyesi ile direkt yoldan ilişkili olmadığı kadın yaşına bağlı olduğu saptanmıştır (121). Bizim çalışmamızda kadın yaşı arttıkça oosit gradenin kötüleştiği, kullanılan rFSH dozunun ve dolayısıyla tedavi süresinin arttığı gözlenmektedir. Buna rağmen bazal FSH, östradiol, antral folikül sayısı ve HCG günü ortalama östradiol seviyeleri arasında fark izlenmemiştir. Çünkü bu veriler bize oosit rezervi hakkında bilgi verir fakat oosit kalitesi hakkında bilgi vermemektedir (4, 6, 8, 83). Çalışmamızda da görüldüğü üzere yaş oosit kalitesini belirleyen önemli bir faktördür.

Çalışmamızda kadın yaşı arttığında, oosit morfolojisinde kötüleşme olduğu ve follistatin ve aktivin seviyelerinin düşmekte olduğu saptanmıştır. Çalışmalarda IVF tedavisi alan hastalarda intrafoliküler follistatin seviyelerinin MI ve MII oosit içeren folliküllerde yüksek olduğu (109) ve rFSH alan hastalarda iyi kalitede oosit kültürlerinde aktivin A seviyesinin yüksek olduğu saptanmıştır (112). Çalışmamızda da oosit kalitesi iyi olan folliküllerde follistatin ve aktivin değerleri yüksek, oosit kalitesi kötü olan folliküllerde follistatin ve aktivin seviyeleri düşük olarak bulunmuştur. Yaşın artmasıyla follistatin ve aktivinde düşüş izlenmektedir.

Dolayısıyla çalışmamızda intrafoliküler follistatin ve aktivin seviyelerinin yaşa bağımlı olarak düşmesinin oosit morfolojisini kötü etkilediği gözlenmiştir.

Çalışmamızda infertilite süresi ile oosit morfolojisi değerlendirildiğinde infertilite süresinin daha uzun olduğu kadınlarda oosit morfolojisinin kötüye gittiği izlenmektedir.

Çalışmamızda HCG günü maksimum serum estradiol değerlerinin gruplarımız arasında benzer olmasına karşın iyi morfoloji olan grupta ortalama kullanılan gonodotropin –rFSH- dozu daha azdır. Aynı şekilde tedavi süresinin de uzaması oosit morfolojisinin daha kötü olacağını düşündürmektedir. Bu bulgulara paralel olarak folikül sıvılarındaki follistatin ve aktivin A seviyesi, kalitesi kötü olan oositlerde düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak uzun protokol overyan stimülasyon tedavisi almış IVF hastaların  $\geq 18$ mm üzerinde alınan folikül sıvılarının follistatin, aktivin A seviyeleri ile oosit morfolojileri karşılaştırıldığında follistatin ve aktivin A seviyesinin iyi oosit morfolojisine sahip foliküllerde yüksek düzeyde olduğu; kötü oosit morfolojisine sahip foliküllerde düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Literatürde aktivinin oosit morfolojisi üzerine etkisini açıklayabilecek çalışma bulamadık. Sadece bir çalışmada Lau ve arkadaşları iyi kalitedeki oosit kumulus hücre kültürlerinde aktivin A seviyesinin yüksek bulmuştur. Bizim çalışmamızda da iyi oosit morfolojisine sahip folikül sıvılarında aktivinin yüksek çıkması, muhtemelen follistatin ve aktivin A seviyesinin kumulus hücreleri üzerinden oosit morfolojisini etkileyebileceğini düşündürmektedir (60). Aktivinin oosit morfolojisi üzerindeki etki mekanizması bilinmemekle birlikte biz bu mekanizmanın aktivinin granüloza hücrelerindeki FSH reseptörlerinin artmasını ve hipofizden salgılanan FSH sekresyonunun artmasını sağlayarak(23, 24, 25), FSH ile indüklenen aromataz aktiviteyi artırarak (29, 30), granüloza hücresinde aktivin reseptörlerine ve oosit üzerindeki aktivin tip 2 reseptörlerine bağlanarak sağladığını düşünmekteyiz (27, 108). 50 hastadan en iyi bir oositlerini aldık. Dolayısıyla her hastadan tek bir follistatin ve aktivin sonucu elde ettik. Yapılacak çalışmalarda bir hastadan birden fazla sayıda oosit toplanarak bu foliküllerin follistatin ve aktivin seviyelerine bakılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz. Aktivin seviyelerinin dominant folikül seçiminde rol aldığını düşünürsek mid-siklusta kan aktivin seviyelerinin ölçülmesi ve oosit morfolojisi

arasındaki ilişkiye bakılması, oosit toplama günü hem kanda hem de foliküler sıvıda aktivin seviyelerine bakılıp oosit morfolojisi ile değerlendirilmesini amaçlayan geniş vaka sayıları olan çalışmaların yararlı olacağını düşünmekteyiz. Midsiklus serum aktivin, oosit toplama günü serum aktivin, foliküler sıvıdaki aktivin seviyeleri ile oosit morfolojisi arasında ilişkinin bulunması ile oosit kalitesini belirleyen marker olarak aktivinin yararlılığının ortaya konulabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Leon Speroff, Marc A. Fritz : The Ovary-Embryology and Development. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 2005: 1013- 1053
2. Jacky Boivin, Laura Bunting, John A. Collins and Karl G. Nygren.: International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility for medical care. Human Reproduction. 2007; 22: 1506- 1512.
3. Eshre Capri Workshop Group.: Fertility and ageing. Human Reproduction Update. 2005; 11: 261-276.
4. Chuang C. C., Chen C. D., Chao K. H., Chen S. U., Ho H. N., Yang Y. S.: Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. Fertil. Steril. 2003; 79: 63-8.
5. A.bukman, M.J. heineman.: Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. 2001; 7: 581-590.
6. John L. F., Paul A. B., Michael R. D., Fady I.S. and Richard T. S.: Evaluation of basal estradiol levels in asisted reproductive technology cycles. Fertility and Sterility 2000; 74: 519- 524.
7. John L. F., Andrew J. L., Bradley T. M., James H. S.: A prospective assessment of the predctive value of basal antral follicle in invitrofertilization cycles. Fertil. Steril. 2003; 80: 350- 355.
8. Buyalos, R. P., Daneshmand, S. and Brzechffa, P. R.: Basal estradiol and follicle-stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. Fertil. Steril. 1997; 68: 272-277.
9. Barnes R. B., Namnoum A. B., Rosenfield R.L., Layman L. C.: The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. Hum Reprod. 2002; 17: 88–91.
10. Leon Speroff, Marc A. Fritz : The Ovary-Embryology and Development. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 2005: 187-224 .

11. Oktay K., Briggs D., Gosden R. G.: Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 3748–3751.
12. Goldenberg R.L., Powell R.D., Rosen S.W., et al.: Ovarian morphology in women with anosmia and hypogonadotropic hypogonadism. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1976; 126: 91–94.
13. Kessel B., Dahl K. D., Kazer R. R., et al.: The dependency of bioactive follicle-stimulating hormone secretion on gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal and cycling women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988; 66: 361–366.
14. Hall J. E., Schoenfeld D.A., Martin K.A., et al. Hypothalamic gonadotropin releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 74: 600–607.
15. Ryan K. J., Petro Z., Kaiser J.: Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1968; 28: 355–358.
16. Macklon N.S., Stouffer R.L., Giudice L.C., Fauser B.C.J.M.. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr. Rev.* 2006; 27: 170–207.
17. Fauser B.C.J.M., van Heusden A.M.: Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* 1997; 18: 71–106.
18. McGee E. A., Hsueh A. J. W.: Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 200–214.
19. Van Santbrink E. J. P., van Dessel H. J. H. M., Hop W. C., De Jong F. H., Fauser B. C. J. M.: Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 37–43.

20. Hsueh A., Adashi E., Jones P., Welsh T.: Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 1984; 45: 76-127.
21. Mather J.P., Woodruff T.K., Krumman L.: Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 201: 1-15
22. Moses H. L., Yang E. Y., Pietenpol J. A.: TGF- $\beta$  stimulation, inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990; 63: 245-247.
23. Li, R., Phillips, D. M. and Mather, J. P.: Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* 1995; 136: 849-856.
24. Silva, C. C. and Knighnt, P. G.: Modulatory action af activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 558-565.
25. Smitz, J., Cortvrindt, R., Hu, Y. *et al.*: Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 50: 294-304.
26. Woodruff T.K., Lyon R.J., Hansen S.E., Rice G.C, Mather J. P. : Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 1990; 127: 3196-3205.
27. Li, R., Phillips, D. M. and Mather, J. P.: Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* 1995; 136: 849-856.
28. Hillier , S.G., Yong, E.L., Illingworth, P.I. *et al.*: Effect of recombinant activin on androjen synthesis in cultured human theca cells. *J. Clin. Endocrinol.* 1991b; 72: 1206-1211.
29. Hutchison, L.A., Findlay, J. K., De Vos, F.L. *et al.*: Effect of bovine inhibin, transforming growth factor- $\beta$  and bovine activin A on granulosa cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 146: 1405-1412.
30. Miro, F., Smyth, C.D. and Hillier ,S.G.: Developmen related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 129: 3388-3394.

31. Florlo, P., Luisi, S., Marchetti, P. *et al.*: Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. *J. Endocrinol. Invest.* 2000; 23: 231-234.
32. Mather, J. P., Moore, A. and Li, R.H.: Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on growing family of regulators. *Poc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 215: 209-222.
33. Eldor T., Geva, Spitz I. M., Groome N. P., Margalioth E. J., Homburg R.: Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Human Reprod.* 2001; 16: 2552-2556
34. Hillier, S. G. and Miro, F.: Inhibin, activin and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; 687: 29-38.
35. de Winter, J. P., ten Dijke, P., de Vries, C. J. *et. al.*: Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996; 116: 105-114.
36. Hillier, S. G.: Intra-gonadal regulation of male and female reproduction. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 1999; 60: 111-117.
37. Findlay, J. K.: An update on the role of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 1993; 48: 15-23.
38. Schneyer, A. L., Hall, H. A., LANBERT-Messerlian, G. *et al.*: Follistatin activin complexes in human serum and follicular fluid differ immunologically and biochemically. *Endocrinology* 1996; 137: 240-247.
39. Kogawa K., Nakamura T., Sugino K., Takio K., Titani K., Sugino H.: Activin –binding protein is present in pituitary. *Endocrinology* 1991; 128: 1434-1440.
40. Nakamura T., Takio T., Eto Y., Shibai H., Titani K., Sugino H.: Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 1990; 247: 836-838.
41. Mather J.P., Roberts P.E., Krummen L.A.: Follistatin modulates activin activity in a cell-and tissue-specific manner. *Endocrinology* 1993; 132: 2732-2734.
42. Esh F.S., Shinasaki S., Mercadao M., Cooksy K., Ling N., Ying S., Ueno N., Guillemin R.: Structural characterization of follistatin: a novel follicle

- stimulating hormone releasing inhibiting polypeptide from the gonad. Mol. Cell. Endocrinol. 1987; 1: 849-855.
43. Inouye S., Guo Y., Depaolo L., Shimonaka M., Ling N., Shimasaki S.: Recombinant expression of human follistatin with 315 & 288 amino acid: chemical & biological comparison with native porcine follistatin. Endocrinology 1991; 129: 815-822.
  44. Shimasaki S., Koga M., Esh F., Cooksey K., Mercado M., Koba A., Ueno N., Ying S.Y., Ling N., Guillemin R.: Primary structure of the human follistatin precursor & its genomic organization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 4218-4222.
  45. Sugino K., Kurosawa N., Nakamura T., Takio K., Shimasaki S., Ling N., Titani K., Sugino H.: Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. J. Biochem. 1992; 68: 15579-15587.
  46. GUO, Q., Kumar, R., Woodruff, T. *et. al.*: Overexpression of Mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. Mol. Endocrinol. 1998; 12: 96-106.
  47. Robert J., Norman, Cylde R. Milner, Nigel P. Groome, David M. Robertson.: Circulating follistatin concentration are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. 2001; 16: 668-672.
  48. Lockwood, G. M., Muttukishna, S. Groome, N. P. *et. al.*: Mid-follicular phase pulses of inhibin B are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: A possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998; 83: 1730-1735.
  49. Ying S., Becker A., Swanson G., Tan P., Ling N., Esch F., Ueno N., Shimasaki S., Guillemin R.: Follistatin specifically inhibits pituitary follicle stimulating hormone release in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 149: 133-139.
  50. Burger H.G., Robertson D.M., Farnworth P.G., Clarke L., Jacobsen J., Cahir N.F., de Kretser D.M.: Effects of bovine 35 kD FSH-suppressing protein on FSH & LH in rat Pituitary cells in vitro: comparison with bovine 31 kDa inhibin. J. Endocrinol. 1990; 124: 417-423.

51. DePaolo L.V., Mercado M., Guo Y., Ling N.: Increased follistatin ( activin-binding protein ) gene expression in rat anterior pituitary tissue after ovariectomy may be mediated by pituitary activin. *Endocrinology* 1993; 132: 2221-2228.
52. Wang Q.F., Farnworth P.G., Findlay J.K., Burger H.G.: Chronic inhibitory effect of follicle stimulating hormone (FSH) suppressing protein (FSP) or follistatin on activin and gonadotropin-releasing hormone stimulated FSH synthesis and secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1990; 127: 1385-1393.
53. Schneyer A.L., O'Neil D.A., Crowley W.F.: Activin-binding proteins in human serum & follicular fluids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 74: 1320-1324.
54. Kruman L.A., Woodruff T.K., DeGuzman G., Cox E.T., Baly D.L., Mann E., Garg S., Wong W.L., Cossum P., Mather J.P.: Identification & characterization of binding proteins for inhibin & activin in human serum & follicular fluids. *Endocrinology* 1993; 132: 431-443.
55. Lockwood, G. M., Muttukrishna, S., Groome, N. P., Knight, P. G., Ledger, W. L.: Circulating inhibins and activin-A during GnRH-analogue down-regulation and ovarian hyperstimulation with recombinant FSH for in vitro fertilization embryo transfer. *Clin. Endocrinol.* 1996; 45: 741-748.
56. Muttukrishna, S., Groome, N. P., Ledger, W. L.: Gonadotrophic control of secretion of dimeric inhibins and activin A by human granulosa-luteal cells in vitro. *J. Asst. Reprod. Genet.* 1997a; 14: 566-574.
57. Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y., Nakamura, T., Sugino, H., Eto, Y., Shibai, H., Igarashi, M.: Induction of follicle-stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 156: 668-674.
58. Xiao, S., Robertson, D. M., Findlay, J. K.: Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1009-1016.

59. Eldar-Geva, T., Spitz, I. M., Groome, N. P., Margalioth, E. J., Homburg, R.: Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 2552–2556.
60. C.P. Lau, W. L. Ledger, N. P. Groome, D. H. Barlow, S. Muttukrishna.: Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Human Reproduction.* 1999; 14: 2525- 2530.
61. Leon Speroff, Marc A. Fritz : *The Ovary-Embryology and Development. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 2005: 97-111.
62. Baker T. G.: A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 1963; 158: 417.
63. Wylie C.: Germ cells. *Cell* 1999; 96: 165.
64. Motta P.M., Makabes , Nottola S.A.: The ultrastructure of human reproduction. The natural history of the female germ cell: origin, migration & differentiation in side the developing ovary. *Human Reprod.* 1997; 3: 281.
65. Gondos B., Bhiraleus P., Hobel C.: Ultrastructural observation on germ cells in human fetal ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1971; 110: 644.
66. Gondos B, Westergaard L., Byska? A., Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986; 155: 189.
67. Byskov A. G., Andersen C. Y., Nordholm L., Thogersen H., Xia G., Wassmann O., Andersen J. V., Guddal E., Roed T.: Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559.
68. Byskov A. G., Andersen C.Y., Leonardsen L.: Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation, *Molec. Cellular Endocrinol.* 2002; 187: 189.
69. Ammini A.C., Pandey J., Vijayaraghavan M., Sabherwal U.: Human female phenotypic development: role of fetal ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 604.
70. Gougeon A.: Dynamics of follicular growth in the human: o model from preliminary results. *Human Reprod.* 1986; 1: 81.

71. Gougeon A.: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocr. Rev.* 1996; 17: 121.
72. Speert H.: *Obstetric & Gynecologic Milestones Illustrated*, The Parthenon Publishing Group, New York, 1996.
73. Lawrence T. S., Dekel M., Beers W. H.: Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli, oophori & granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology* 1980; 106: 1114.
74. Brailly S., Gougeon A., Milgrom E., Bomsel-Helmreich O., Papiernik E.: Androgens and progestins in the human ovarian follicle: differences in the evolution of preovulatory, healthy nonovulatory, and atretic follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53: 128–134.
75. Westergaard L., Christensen I. J., McNatty K. P.: Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women. *Hum. Reprod.* 1986; 1: 227–232.
76. Bomsel-Helmreich O., Gougeon A., Thebault A., Saltarelli D., Milgrom E., Frydman R., Papiernik E.: Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1979; 48: 686–694.
77. Makris A., Ryan K. J.: Aromatase activity of isolated and recombined hamster granulosa cells and theca. *Steroids* 1977; 29: 65–72.
78. Fevold H. L.: Synergism of follicle stimulating and luteinizing hormone in producing oestrogen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1941; 21: 33–36.
79. Greep R. O., van Dyke H. B., Chow B.F.: Gonadotropins of the swine pituitary. I. Various biological effects of purified thylenestrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH). *Endocrinology* 1942; 30: 635–649.
80. Short R.V.: Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A 'two cell type' theory of ovarian steroid synthesis. *J. Endocrinol.* 1962; 24: 59–63.
81. Eshkol A., Lunenfeld B.: Purification and separation of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) from human menopausal gonadotrophin (HMG). 3. Effects of a biologically apparently pure FSH

- preparation on ovaries and uteri of intact, immature mice. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1967; 54: 91–95.
82. Berger M. J., Taymor M. L.: The role of luteinizing hormone in human follicular maturation and function. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1971; 111: 708–712.
  83. Reuss, M. L., Kline, J., Santos, R.: Age and ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonograph. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996; 14: 624–627.
  84. Sawetawan C., Carr B. R., Mc Gee E., Bird I. M., Hong T. L., Rainey W. E.: Inhibin and activin differentially regulate androgen production and 17 $\alpha$ -hydroxylase expression in human ovarian theca-like cells. *J. Endocrinol.* 1996; 148: 213.
  85. Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R.: Pituitary FSH is released by a heterodimer of  $\alpha$  subunits from the forms of inhibin. *Nature (London)* 1986; 321: 779–782.
  86. Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., Spiess, J.: Purification and characterisation of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature (London)* 1986; 321: 776–779.
  87. Muttukrishna, S., Fowler, P.A., George, L., Groome, N.P., Knight, P.G.: Changes in peripheral serum levels of total activin-A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1996; 81: 3328–3334.
  88. Muttukrishna, S., Child, T., Lockwood, G., Groome, N.P., Barlow, D., Ledger, W.: Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, pituitary gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. *Hum. Reprod.* 2000a; 15: 549–556.
  89. Muttukrishna, S., Knight, P.G.: Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* 1991; 6: 171–178.

90. Ying, S.Y.: Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinol. Rev.* 1988; 9: 267–293.
91. Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R.: Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 8282– 8286.
92. Robertson, D.M., Klein, R., de Vos, F.L., McLachlan, R.I., Wettenhall, R.E.H., Hearn, M.T.W., Burger, H.G., de Kretser, D.M.: The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 149: 744–749.
93. Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H.: Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 1990; 247: 836–838.
94. Gilfillan, C.P., Robertson, D.M.: Development and validation of a radioimmunoassay for follistatin in human serum. *Clin. Endocrinol.* 1994; 41: 453–461.
95. Khoury, R. H., Wang, Q. F., Crowley Jr., W. F., Hall, J. E., Schneyer, A. L., Toth, T., Midgley Jr., A. R., Sluss, P. M.: Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1995; 80: 1361–1368.
96. Kettel, L. M., DePaolo, L. V., Morales, A. J., Apter, D., Ling, N., Yen, S.S.C.: Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertil. Steril.* 1996; 65: 472–476.
97. McConnell, D. S., Wang, Q., Sluss, P. M., Bolf, N., Khoury, R. H., Schneyer, A. L., Midgley, A. R., Reame, N. E., Crowley, W. F., Padmanabhan, V.: A two-site chemiluminescent assay for activin-free follistatin reveals that most follistatin circulating in men and normal cycling women is in an activin-bound state. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1998; 83: 851–858.
98. Evans, L. W., Muttukrishna, S., Groome, N. P.: Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for total human follistatin in biological fluids. *J. Endocrinol.* 1998; 156: 275–282.

99. Blumenfeld, Z., Ritter, M.: Inhibin, activin and follistatin in human fetal pituitary and gonadal physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 943: 34–48.
100. Xia P.: Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality *Human Reproduction* 1997; 12: 1750–1755.
101. Anita Kan, Ernest Hung Yu N., William ShuBiu Yeung and Pak Chung Ho : Perifollicular vascularity in poor ovarian responders during IVF.
102. Eppig J. J.: Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Adashi E. Y., Leung P. C. K., eds. *The ovary*. New York: Raven Press, 1993: 185–207.
103. Silva C. C., Knight P. G.: Modulatory actions of activin A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 558–65.
104. Sadatsuki M., Tsutsumi O., Yamada R., Muramatsu M., Taketani Y.: Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 196: 388–95.
105. Mather J. P., Attie K. M., Woodruff T. K., Rice G. C., Phillips D. M.: Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-sertoli cell co-cultures from immature rat testis. *Endocrinology* 1990; 127: 3206-3214.
106. Woodruff T. K., Battaglia J., Mather J. P.: Regulation of human granulosa cells by recombinant human activin A, recombinant human inhibin A. In: Momex R. laffiol C. Leclere I feds Prozress in Endocrinology. Proceedings of-the Ninth International Coniress of Endocrinology Nice. Parthenon, Pearl River, New York. 1992: 605-607.
107. Xiao S., Robertson D. M., Findlay J. K.: Effect of activin and folliclestimulating hormone (PSHI-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1009-1016.
108. Woodruff T. K., Krummen L., Chen S. A., Lyon R., Hansen S. E., Deguzman G., Covello R., Mather J., Cossum P. : Pharnnacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin and activin in the immature rat. *Endocrinology* 1993; 132: 725-734.

109. Toshihiro F., Geralyn L. M., Yisrael S., Lucy L., Keith I., Thomas T., Alan S.: Analysis of follicular fluid hormone concentrations and granulosa cell mRNA levels for the inhibin-activin follistatin system: relation to oocyte and embryo characteristics 2000; 74: 348-355.
110. Fujiwara et al.: The inhibin-activin-follistatin system in human follicles. *Fertil. Steril.* 2000; 74: 12.
111. Muttukrishna: Activin and follistatin in female reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 225: 45-56.
112. Lau et al.: Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Human Reproduction* 1999; 14: 2525-2530.
113. Nancy E. R., Jane L. L., Pamela O., Rudi A., Vasantha P.: Differential Effects of aging on Activin A its binding protein, Follistatin, across the Menopause Transition. *Fertil. Steril.* 2007; 88(4): 1003-1005
114. Mather, J. P., Woodruff, T. K., Krummen, L. A.: Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 201: 1-15.
115. Bilezikjian, L. M., Corrigan, A. Z., Vaughan, J. M., Vale, W. M.: Activin-A regulates follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1993a; 133: 2554-2560.
116. Bilezikjian, L. M., Vaughan, J. M., Vale, W. W.: Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1993b; 133: 2545-2553.
117. Farnworth, P. G., Thean, E., Robertson, D. M., Schwartz, J.: Ovine anterior pituitary production of follistatin in vitro. *Endocrinology* 1995; 136: 4397-4406.
118. John L. Frattarelli, Paul A. Bergh, Michael R. Drews, Fady I. Sharara and Richard T. Scott, Jr., M.D.b,c Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2000; 74: 518-524.
119. La' szlo' F. J. M. M. Bancsi, Frank J. M. Broekmans, Ben W. J. Mol, J. Dik F. Habbema and Egbert R. te Velde. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to

- become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2003; 79: 1091-1100.
120. John L. Frattarelli, Andrew J. Levi, Bradley T. Miller and James H. Segars. A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2003; 80: 350- 355.
121. Follicle-stimulating hormone and estradiol levels independently predict the success of assisted reproductive technology treatment Linda M. Frazier, David A. Grainger, Laura A. Schieve and James P. Toner. *Fertil Steril*. 2004; 82: 834-840.