

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**KONTROLLÜ OVARYAN STİMÜLASYON
SİKLUSLARINDA KİSSPEPTİN DÜZEYİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE GNRH ANTAGONİST
KULLANIMININ KİSSPEPTİN DÜZEYİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. BURAK ARSLAN

İZMİR - 2016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**KONTROLLÜ OVARYAN STİMÜLASYON
SİKLOSLARINDA KİSSPEPTİN DÜZEYİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE GNRH ANTAGONİST
KULLANIMININ KİSSPEPTİN DÜZEYİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. BURAK ARSLAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. UĞUR SAYGILI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	III
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İnfertilite Tanımı.....	4
2.2 Yardımla Üreme Teknikleri.....	4
2.2.1 İn Vitro Fertilizasyon.....	6
2.2.2 İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu.....	6
2.3 Kontrollü Ovaryan Stimülasyon Protokolleri.....	7
2.3.1 Gonadotropinler.....	7
2.3.2 Geleneksel Protokol.....	10
2.3.3 Kronik Düşük Doz Basamaklı Artım (Kronik Low Dose Step up)	11
2.3.4 Step-Down Protokolü.....	12
2.3.5 Klomifen Sitrata ve Gonadotropin ile Ardışık Protokol.....	13
2.3.6 Uzun etkili GnRH Agonistleri ile yapılan Down Regülasyon sonrasında Eksojen Gonadotropin Tedavisi (Long Protokol)	13
2.3.7 GnRH Antagonistleri.....	16
2.3.7.1 Multiple doz GnRH Antagonist kullanımı.....	17
2.3.7.2 Tek doz GnRH Antagonist kullanımı.....	17
2.4 Ovulasyonun Tetiklenmesi.....	18
2.4.1 Hcg	18
2.4.2 Rekombinant LH.....	28
2.4.3 GnRH Agonistleri.....	19
2.5 Luteal Faz Desteği.....	19
2.5.1 Luteal Fazda Progesteron desteği.....	19

2.5.2 Luteal fazla Hcg kullanımı.....	20
2.5.3 Luteal fazda Progesteron Estrogen eklenmesi.....	20
2.5.4 Luteal fazda GnRH kullanımı.....	20
2.6 Tedavi sırasında monitörizasyon.....	21
2.7 Kisspeptin.....	22
2.7.1 Kisspeptin sentez ve yapısı.....	22
2.7.2 Kisspeptin dağılımı ve etkileri.....	23
2.7.3 Kisspeptin ve klinik.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
3.1 Hasta seçimi.....	33
3.2 Çalışma protokolü.....	34
3.3 İstatistik.....	36
4.BULGULAR.....	37
5.TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında olduğu kadar tüm uzmanlık eğitimim boyunca da desteklerini esirgemeyen, bilimsel birikimlerinden ve tecrübelerinden yararlanma imkanı bulduğum başta değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Saygılı'ya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ö. Erbil Doğan'a ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum, uzmanlık eğitimi sürecimde çok değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım Prof Dr. Berrin Acar, Prof. Dr. Bülent Güleklî, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Prof. Dr. Turhan Uslu, Prof Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Sabahattin Altunyurt, Doç. Dr. R. Emre Okyay, Doç. Dr. H. Bahadır Saatlı, Yrd. Doç. Dr. Sefa Kurt, Uzm. Dr. Erkan Çağlıyan ve Uzm. Dr. Semir Köse' ye teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. R. Emre Okyay, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Rıza Şişman ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde çalışan tüm personele teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimi sürecinde birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, tüm görevli hemşire ve personele teşekkür ederim.

Dr. Burak ARSLAN

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Hastaların klinik özellikler ve bazal hormon değerlerinin incelenmesi

Tablo 2: Bazal kisspeptin düzeyi ile yaş, BMI, bazal FSH, bazal LH ve bazal Estradiol arasındaki ilişki

Tablo3:KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

Tablo 4:PKOS'lu olgularda KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

Tablo 5: PKOS'lu olmayan olgularda KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

Tablo 6: Olguların plazma hormon değerleri ile toplam elde edilen oosit sayısının ilişkisinin incelenmesi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: KOS sırasında Kisspeptin düzeyindeki değişimin izlenmesi

Şekil 2: PKOS'lu olgularda KOS sırasında Kisspeptin düzeyindeki değişim

Şekil 3: PKOS'lu olmayan olgularda KOS sırasında kisspeptin düzeyindeki değişim



KISALTMALAR

- BMI:** Beden kitle indeksi
DHEA-SO4: Dehidroepiandrosteron sülfat
ELİSA: Enzyme linked immunosorbent assay
FSH: Folikül stimüle edici hormon
GIFT: Gamet intrafallopian transfer
GnRH: Gonadotropin releasing hormon
hCG: Human koryonik gonadotropin
HMG: Human menapozal gonadotropin
HPG: Hipotalamo-pitüiter- gonadal
ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IU: international unit
IVF: İn vitro fertilizasyon
KP: Kisspeptin
KOS: Kontrollü ovaryan stimülasyon
KNDy: Kisspeptin- Neurokinin B- Dynorphin yolağı
LH: Luteinizan hormon
MPA: Medroksiprogesteron asetat
OHSS: Ovaryan hiperstimülasyon sendromu
POST: Peritoneal oosit ve sperm transferi
rFSH: Rekombinant FSH
SUZİ: Subzonal sperm enjeksiyonu
TAUSG: Trans abdominal ultrason
TET: Tubal embryo transferi
TVUSG: Transvaginal ultrason
PKOS: Polikistik over sendromu
u-FSH: üriner FSH
USG: Ultrason
YÜT: Yardımla üreme teknikleri
ZIFT: Zigot intrafallopian transfer

ÖZET

KONTROLLÜ OVARYAN STİMÜLASYON SIKLUSLARINDA KISSPEPTİN DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE GnRH ANTAGONİST KULLANIMININ KISSPEPTİN DÜZEYİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

AMAÇ: Çalışmanın amacı In Vitro Fertilizasyon/Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu(IVF/ICSI) sikluslarında yapılan Kontrollü Ovaryan Stimülasyon(KOS)'un Kisspeptin düzeyi üzerine olan etkisinin incelenmesi ve GnRH Antagonist uygulaması ile plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin belirlenmesidir.

İnfertilite her altı çiftten birini etkileyen önemli bir problemdir. İnfertilitenin hormonal tedavisi, hipotalamik-pituiter-gonadal(HPG) aks üzerine yapılan manipülasyonlar ile yapılmaya çalışılmaktadır. 1996 yılında Kisspeptin'in bulunması ve HPG üzerine olan etkisinin anlaşılması ile bu hormonun üreme endokrinolojisi ve infertilite ile olan ilgisinin incelenmesine başlanmıştır. İnfertilite tedavisinde bilinen en etkin yöntem olan IVF/ICSI siklusları sırasında kullanılan ilaçların Kisspeptin düzeyi üzerine olan etkisinin incelenmesinin infertilite tedavilerinin geleceği açısından aydınlatıcı olacağı düşüncesindeyiz.

Merkezimize başvuran IVF/ICSI tedavisi planlanan hastaların tedavileri sırasında alınan venöz kan örneklerinde Kisspeptin düzeyi belirlenmesi şeklinde çalışma yaptık.

YÖNTEM: Bu prospektif çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu izni alındıktan sonra gerçekleştirildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde yapılan, çalışmaya dahil olma kriterlerine uygun olan 27 gönüllü dahil edildi. Olgulardan Kontrollü ovaryan stimülasyona başlanmadan önce, GnRH Antagonist uygulanmasından önce, uygulamadan 48 saat sonra ve final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmadan önce olmak üzere toplam 4 defa venöz kan örneği alınarak Kisspeptin

düzeyi belirlendi. İstatistiksel analiz için The Statistical Program for Social Sciences(SPSS, versiyon 22) programı kullandı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR: Çalışma sonucunda GnRH Antagonist uygulaması ile Kisspeptin düzeyindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi. ($p=0.001$) Siklus sonucunda elde edilen gebelik oranları ile bazal Kisspeptin düzeyi arasında anlamlı ilişki bulunamadı. ($p=0.91$) Kontrollü ovaryan stimülasyon siklusları sonucunda elde edilen toplam oosit sayısı ile final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmadan önce bakılan Kisspeptin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlendi. ($r=-0.46$, $p=0.01$)

SONUÇ: Kontrollü ovaryan stimülasyon sikluslarında GnRH Antagonist uygulanması ile Kisspeptin düzeyinde düşüş olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. ($p=0.001$) Bunu gösteren literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle yaptığımız çalışmanın değerli olduğu düşüncesindeyiz. Ancak daha fazla sayıda olgunun dahil edildiği prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELER: Kisspeptin, GnRH Antagonist, Kontrollü ovaryan stimülasyon

SUMMARY

EVALUATION OF KISSPEPTIN HORMONE LEVEL CHANGES DURING CONTROLLED OVARIAN STIMULATION CYCLES AND WITH THE USE OF GNRH ANTAGONIST

OBJECTIVE: The aim of our study is to determine the changes in Kisspeptin hormone levels during Controlled Ovarian Stimulation (KOS) cycles, which is used in IVF/ICSI treatment.

Infertility affects up to one in six couples. The currently available hormone-based treatments for infertility act through the manipulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis at the level of GnRH or below. The discovery of Kisspeptin in 1996 have added a new critical dimension of the physiology of the HPG axis, reproduction and fertility. The most effective known method in infertility treatment is IVF/ICSI. In IVF/ICSI cycles we use hormone inductions,, which are effective on the HPG axis. Therefore our study will be important for the IVF/ICSI cycles' methodology.

METHODS: The prospective study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Faculty of Medicine, Dokuz Eylul University. Twenty seven volunteers were included in the study. We used venous blood samples for detection of kisspeptin hormone levels, which were taken during IVF/ICSI cycles.

RESULTS: Changes in the Kisspeptin level with GnRH antagonist application results were considered to be statistically significant. (p=0.01)

CONCLUSION: GnRH antagonist application during KOS cycles made a decline in Kisspeptin levels. These change in the Kisspeptin levels found statistically significant. (p=0.01)

KEYWORDS: Kisspeptin, GnRH Antagonist, Controlled ovarian stimulation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite genel olarak bir yıl düzenli korunmasız ilişkiye rağmen gebeliğin elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır. İnfertilite çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen bir problemdir. İnfertilite nedenlerinin dağılımı %20-40 ovulasyon bozuklukları, %30-40 tubal-peritoneal patolojiler ve %30-40 erkek faktör şeklindedir. (1) İnfertil çiftlerin tedavisinde mevcut yaklaşımlar hipotalamo-pitüiter-gonadal aks üzerinde GnRH seviyesinde veya altındaki hormonal düzene müdahale şeklinde olmaktadır. (2) Bu sistem içerisinde önemli rolleri olduğu düşünülen Kisspeptinler dikkat çekmektedir.

Kisspeptinler, Kiss-1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türeyen, Kiss1R (GPR54) olarak bilinen reseptörler aracılığı ile hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller aldıkları bilinen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidler olarak bilinmektedirler. (3,4) Kisspeptinlerin varlığı ilk olarak 1996 yılında malign melanom hücreleri üzerine olan supresif etkisi ile ortaya çıkmış ve o nedenle de Metastin olarak adlandırılmıştır. Kisspeptin nöronları yoğun olarak plasenta, hipofiz, hipotalamusta bulunmaktadır.(4) Santral sinir sistemindeki önemli yerleşim yerleri rostral preoptik alan ve infundibular nükleustur.(5) Kisspeptin hipotalamustan GnRH salınımını arttırmakta ve GnRH salınımındaki artışa bağlı olarak da LH düzeylerinde artışa neden olmaktadır. (6) Novaira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Kisspeptin tedavisi ile GnRH sekrete eden nöronlarda GnRH mRNA düzeylerinde artış izlenmemektedir. (7) Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında ise kisspeptin enjeksiyonu sonrasında LH düzeylerinde artış izlenmekte olup FSH düzeylerinde de artış olmakta ancak FSH düzeylerinde izlenen artış LH'da olan kadar önemli seviyede olmamaktadır.(8) Kisspeptin-54'ün derialtı enjeksiyonu sonrasında LH seviyesinde 7 kat artış izlenmekte ve bu artışın preovulatuvar dönemde daha belirgin olduğu görülmektedir. (8) Ayrıca bahsedilen bu etki GPR54 reseptör geni homozigot defektif olan deneklerde izlenmemektedir. (9-11) Kisspeptinlere bağlı olarak gelişen LH ve FSH düzeylerinde artış GnRH antagonist uygulanması ile engellenmektedir. (12) Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında GPR54 reseptör fonksiyon kaybına yol

açan mutasyonların hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu ve bu reseptörün normal pubertal gelişim için gerekli olduğu gösterilmektedir. (13,14) Kisspeptinlerin önemli bir rolü de estrogen bağımlı GnRH ve LH salınımlarının düzenlenmesidir. Menstrüel siklus sırasında meydana gelen GnRH ve LH düzeylerindeki değişimden estradiolün negatif ve pozitif feed-back etkisinin sorumlu olduğu bilinmektedir.(5) Ancak GnRH nöronları üzerinde estrogen reseptörü bulunmayışı estrogenlerin bu etkiyi göstermesi için GnRH ile gonadotropinler arasında başka bir hormonal sistemin olduğunu göstermektedir.(5) Bu hormonal sistem Kisspeptin-Neurokinin B-Dynorphin (KNDy) yolağıdır.(5) Estrogen reseptörleri üzerine yapılan hayvan çalışmaları sonucunda arkuat çekirdekdeki kisspeptin nöron topluluklarının GnRH salınımlarında negatif feed-back görevini, anteroventral periventriküler çekirdekdeki kisspeptin nöronlarının ise pozitif feedback görevini üstlendikleri izlenmektedir. (15,16) İnsanlarda ise estrogenin negatif feed-back etkisini ortaya çıkardığı düşünülen Kisspeptin nöronlarının lokalizasyonu hayvan çalışmalarında elde edilen veriler ile benzerlik göstermekte olmasına karşın pozitif feed-back etkiden sorumlu kisspeptin nöronlarının lokalizasyonlarının türlere özel olarak değiştiği gösterilmiştir ve insanlarda yapılmış herhangi bir çalışma mevcut değildir.(5)

Kontrollü Ovaryan Stimülasyon(KOS) siklusları IVF/ICSI tedavisinde embriyo transferi ve seçimi için multipl embriyo elde etmek ve fertilizasyona uygun oosit sayısını olabildiğince arttırmak amacı ile kullanılmaktadır. Bu amaçla farklı indüksiyon protokolleri uygulanmaktadır.

GnRH antagonistleri GnRH agonistlerine alternatif olarak IVF/ICSI sikluslarında LH pikinin önlenmesi amacıyla ortaya çıkmıştır. GnRH antagonistlerinde GnRH agonistleri ile karşılaştırıldığında farmakolojik olarak gonadotropin salınımını engelleme mekanizması tamamen farklıdır. (17) Agonistin kronik kullanımında reseptörler downregüle olur ve gonadotropin hücreleri duyarsızlaşmaktadır. Antagonistler ise kompetitif olarak reseptöre bağlanmakta ve endojen GnRH'ın pituiter bez üzerinde uyarıcı etkisini engellemektedir. Bu kompetitif reseptör blokajından dolayı gonadotropin salınımlarında ani bir durmaya neden olmaktadır. (18) 2006 yılında yayımlanmış olan bir Cochrane derlemesinde

uzun GnRH protokolü ile GnRH antagonist kullanımı karşılaştırılmış ve gebelik oranı antagonist grubunda agonist grubuna göre azalmış olarak izlenmiş olmasına karşın buna ek olarak istatistiksel olarak ciddi ovaryan hiperstimülasyon sendromu(OHSS) insidansında antagonist grubunda belirgin azalma izlenmiştir. (19)

Yaptığımız çalışmada IVF/ICSI öncesinde yapılan KOS sikluslarında kisspeptin düzeyindeki değişimler ile erken LH pikinin önlenmesi amacıyla uygulanan GnRH Antagonistlerinin plazma kisspeptin düzeyi üzerine olan etkisi incelenmiştir.

Kisspeptinlerin üreme endokrinolojisindeki yeri artık bilinmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada kisspeptinlerin IVF/ICSI sikluslarındaki durumu ve GnRH antagonistlerinin plazma kisspeptin düzeyi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında Kisspeptinlere bağlı olarak gelişen LH ve FSH düzeylerindeki artışın GnRH antagonist uygulanması ile engellendiğinin (12) gösterilmiş olmasına karşın GnRH Antagonist Protokolü ile yapılan IVF/ICSI sikluslarında plazma kisspeptin düzeyinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız literatür taramasına göre çalışmamız IVF/ICSI sikluslarında kisspeptin düzeyindeki değişimin gösterildiği ve GnRH antagonistlerinin plazma kisspeptin düzeyi üzerine olan etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Çalışmamızın bu nedenle bilimsel açıdan yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İNFERTİLİTE TANIMI

İnfertilite, herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın ve haftada en az 2-3 kez düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınmaması olarak tanımlanmaktadır. (20) Daha önce hiç gebelik olmamışsa primer infertilite, canlı doğumla sonuçlansın ve ya sonuçlanmasın, en az bir gebelik olmuşsa sekonder infertilite olarak tanımlanır. Bir menstrual siklusta, gebe kalabilme olasılığı fekundabilite, bir siklusta canlı doğum olma olasılığına ise fekundite denir. Genç sağlıklı çiftlerde, her ovulatar siklus başına gebe kalabilme şansı, yani fekundabilite %20-25 iken, kadın yaşı arttıkça fekundabilite de düşer. (21) Birinci yılın sonunda sağlıklı çiftlerin %85-90'ında gebelik gerçekleşir.(20) Yani infertilite, reproduktif çağıdaki çiftlerin %10-15'inde görülür. (20) İnfertilite sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterir. Çiftlerin yaklaşık %30-40'ında erkek, %40-50'sinde ise kadın infertiliden sorumludur. İnfertil çiftlerden %10-15'inde mevcut tanısal testler ile herhangi bir neden bulunamaz ve bu olgular açıklanamayan infertilite olarak gruplandırılır.

2.2 YARDIMLA ÜREME TEKNİKLERİ

Yardımla üreme teknolojisi (YÜT), infertilite sorununu çözmeye yönelik olarak overden oositlerin elde edilmesini sağlayan tüm teknikleri içermektedir. İlk ve en yaygın yöntem in vitro fertilizasyondur, ancak gün geçtikçe teknolojik yöntemlerde sayıca artmaktadır.

Hastanın yaşı, infertilitenin etyolojisi, infertilitenin süresi gibi birçok faktör göz önüne alınarak infertiliteye çözüm olabilecek, ekonomik olarak da infertil çift ve uygulamayı yapacak olan ekip için en avantajlı tekniğin seçilerek uygulanmasında yarar vardır.

IVF-ET: Eksojen gonadotropin ile yapılan kontrollü overyan stimülasyonu,

transvajinal ultrasonografi eşliğinde yapılan oosit toplama işlemini, laboratuvarında fertilizasyonu ve embriyoların transservikal olarak transferini içeren tekniktir. IVF ile dünyaya gelen ilk gebelik 1978'de gerçekleşmiştir.

GIFT (Gamet Intrafallopian Transfer): 1984 yılında ilk olarak Asch tarafından tanımlanan bu yöntem, başlangıçta tubal patolojinin olmadığı, açıklanamayan ve erkek infertilitesi olanlarda tercih edilmiştir. Bu yöntemde toplanan oositler ve spermier bir araya getirilip laparoskopik olarak tuba uterinanın ampuller bölgesine transfer edilir. Uygulama esnasında genel anestezi verilmesi, fertilizasyon ve embriyo gelişiminin invitro izlenememesi ve ektopik gebelik riskinin fazla olması dolayısı ile bu yöntem fazla kullanılmamıştır. GIFT ile, dölleme in vitro yerine in vivo ortamda olmaktadır. Bu sebepten dolayı GIFT geleneksel nedenlerden dolayı bazı çiftlerde IVF'e alternatif olabilir. (20,22,23)

ZIFT (Zigot Intrafallopian Transfer): Chen tarafından 1986 yılında önerilmiş bir tekniktir. Bu teknikte zigot tuba uterinalara laparoskopi yardımıyla transfer edilir. ZIFT ve GIFT teknik olarak embriyo transferi yapılamadığı durumlarda uygulanmaktadır. ZIFT'de dölleme in vitro olurken GIFT'de dölleme in vivo olmaktadır. IVF'e göre ZIFT ve GIFT de ektopik gebelik riski daha fazla, çoğul gebelik oranları benzerdir.

- TET (Tubal Embriyo Transferi): Laparoskopi yardımıyla fallop tüpüne bölünmeye başlamış embriyoların bırakılmasıdır.

- POST (Peritoneal Oosit ve Sperm Transferi): Oosit ve spermierin pelvis boşluğuna bırakılmasıdır.

- PZD (Parsiyel Zona Disseksiyonu): Spermin oosite ulaşılabilmesi için zona pellicudada spermin geçebileceği bir açıklık oluşturduktan sonra oositin insemine edilmesidir. (24,25)

- SUZI (Subzonal Sperm Enjeksiyonu): Spermierin mikroenjeksiyon yöntemi ile subzonal bölgeye yerleştirilmesidir. (24,25)

- ICSI (Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu): Tek bir spermin çok ince pipet yardımıyla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir. İlk olarak 1992’de Palermo ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır.

2.2.1 İn Vitro Fertilizasyon

İn vitro fertilizasyon, ekzojen gonadotropinlerle sağlanan kontrollü ovaryan stimülasyon ile başlayıp, overlerden transvajinal ultrason yardımı ile oositlerin aspire edilmesi sonrasında laboratuvarında gerçekleştirilen fertilizasyon ile embriyoların uterus içine transservikal transferiyle devam eden ve birbiriyle koordinasyon içinde gerçekleşen basamaklar dizisidir. (26) İlk olarak IVF gebeliği 1976 yılında fizyolog Dr. Edwards ve jinekolog Dr. Steptoe tarafından gerçekleştirilmiştir, ancak ektopik gebelik elde edilmiştir.

Yaklaşık 33 yıl önce, Cambridge’de yine Dr. Edwards ve Dr. Steptoe in vitro fertilizasyon yöntemiyle uterin bir gebelik sağlanmış, 25 Temmuz 1978’de Louise Brown adında sağlıklı bir bebek olarak dünyaya gelmesi sağlanmıştır. IVF’den ilk olarak tedavi edilemeyen tubal patolojilerden kaynaklanan infertilite nedeni ile faydalanılmıştır, ancak IVF günümüzde daha geniş bir alanda uygulanmakta olup infertilitenin tüm nedenlerinde kullanılmaktadır. Bu gün için IVF uygulamaları ile % 30 oranında canlı doğum oranı elde edilebilmektedir. (27)

2.2.2 İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

Tek bir spermin çok ince bir pipet yardımıyla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesi olarak tanımlanan ICSI yönteminin yardımcı üreme tekniklerine katılması İVF sikluslarında başarı şansını arttırmıştır. Erkek faktörü infertilitesinde önemli bir dönem başlamış, embriyologların oosit ve sperm ile daha yakından çalışması sağlanmıştır. ICSI kullanılarak ilk insan gebeliği Palermo ve arkadaşlarıncı 1992’de bildirilmiş ve yardımcı üreme alanında yeni bir dönem başlamıştır. (28)

ICSI'de işleme öncelikle toplanmış olan kumulus-ootit komplekslerinin enzimatik ve mekanik prosedürlerle kumulus ve korona hücrelerinin ayrıştırılması ile başlanır. ICSI işleminde haploid kromozoma sahip, 1. polar cisimciği gözlenebilen metafaz II oositler kullanılır. Diğer taraftan semen örneklerine dansite gradian santrifugasyon uygulayarak motilite ve morfolojik olarak normal olan spermlerin zenginleştirilmesi işlemi yapılır. Spermatozoonun önce enjeksiyon pipeti yardımı ile kuyruk yapıları kesilir, ardından aynı pipet yardımı ile oolemma delinerek spermatozoon oosit sitoplazmasının içine verilir.

İşlemin ardından yıkanan oositler 37 derecede % 5 O₂, % 5 CO₂ ve % 90 N₂'lik atmosferde kültüre edilir. Oositler iki ayrı ya da fragmente polar cisimcik taşıyorsa ve nukleolus içeren iki pronukleus içeriyorsa fertilize kabul edilir. Normal gelişimli embriyolar 2. günde 4; 3. günün sabahında 8 hücre aşamasına gelir. TipA (iyi kaliteli) embriyolarda anükleer fragman oranı 0 iken; tipB'de % 20; tip C'de % 21-50 ve tipD'de (kötü kaliteli) % 50'den fazladır. TipA, B ve C transfer için uygundur. (29-31)

2.3 KONTROLLÜ OVARYAN STİMÜLASYON PROTOKOLLERİ

2.3.1 Gonadotropinler

Eksojen gonadotropinler, 1960'lı yıllarda, ilk kez insan hipofiz bezinden FSH ve LH ekstrakte edilerek hazırlandı. Daha sonra postmenapozal kadınların idrarından elde edilmeye başlandı (32-34).

Günümüzde 4 farklı gonadotropin preparatı üretilmektedir;

1- İnsan menapozal gonadotropini (Menotropinler, HMG)

2- Üriner saf FSH (Ürofollitropin, u-p-FSH)

3- Yüksek saflıkta üriner FSH (u-HP-FSH)

4- Rekombinant FSH (rFSH)

5- Rekombinant LH

Menotropinler: 30 yılı aşkın bir süredir infertilite tedavisinde kullanılan eksojen gonadotropindir. Postmenopozal kadın idrarının, sefaroza içeren ortamdan süzülmesiyle elde edilir. Menotropinler içerisinde çeşitli üriner proteinler (UP) vardır ve oransal olarak bir ampul hMG içerisinde > % 95 UP mevcuttur. Bir HMG ampülünde 75 Ü FSH, 75 Ü LH vardır ve intramusküler (İM) olarak uygulanır.

Ürofollitropinler: Postmenopozal kadın idrarı anti-hCG antikoru içeren ortamdan geçirilerek, LH oranının azaltılmasıyla elde edilir. UP' ler açısından, HMG'ye göre daha saf olup, % 90 oranında UP içerir. Bir ampul saf-FSH, 75IU FSH aktivitesi, < % 1 LH aktivitesi içerir. Saf FSH'da IM uygulanır.

Yüksek saflıkta üriner FSH: Postmenopozal kadın idrarının monoklonal antikolar kullanılarak LH ve hCG'den ayrıştırılmasıyla elde edilir. u-HP-FSH < 0.001 LH aktivitesi ve < % 1 UP içermektedir. Yüksek oranda saflaştırılmış ve protein içeriği çok azaltılmış olmasından dolayı cilt altına da uygulanabilir.

Rekombinant FSH: 1996 yılından itibaren klinik kullanıma giren rekombinant FSH, insan FSH alfa ve beta subünit geninin, çin hamster over hücrelerine transferi sayesinde ve rekombinant teknoloji ile üretilmektedir. Rekombinant FSH, HMG ve saf- FSH'ya göre çok yüksek spesifik aktiviteye sahip olup, LH aktivitesi ve UP içermez (35). WHO grup I (Hipogonadotropik

hipogonadizm), klomifen sitrat ve metformin ile ovulasyonun sağlanamadığı kronik anovulasyon olgularında, açıklanamayan infertilite olgularında bir sonraki tedavi basamağı gonadotropinler ile ovulasyon indüksiyonudur.

Rekombinant LH: LH glikoprotein yapısında α ve β olmak üzere 2 alt üniteden oluşan hormondur. Son 10 yıldır rLH çalışmalarda kullanılırken, son birkaç yıldır tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle hipogonadotropik hipogonadizm olgularında veya GnRH analogu kullanılan KOS sikluslarında önerilmekle beraber daha fazla çalışmaya gereksinim vardır (36).

Over cevabının ve gonadotropin başlangıç dozunun belirlenmesinde dikkate alınması gereken faktörler şunlardır:

Kadın yaşı: Tek başına spontan fertilitenin ve fertilitite tedavilerinin tüm çeşitlerinin sonuçlarının tahmin edilmesinde en önemli faktördür. Kullanılması gereken gonadotropin miktarı kadın yaşı arttıkça artar. (37,38)

Over rezervi: Over rezervi düşük olan hastalarda gonadotropinler yüksek dozlarda başlanır.

Beden kitle indeksi (BMI): Overin gonadotropinlere ovulasyon cevabı BMI ile ters orantılıdır. PCOS'luların obez olanlarında insulin rezistansından bağımsız olarak daha yüksek doz gonadotropin gerektiği, buna karşın daha az sayıda oosit toplanabildiği gözlenmiştir. (39) Buna karşın PCOS'lu olmayanlarda artmış BMI ile over cevabının etkilenmediğine dair yayınlar bulunmaktadır. (40,41)

Sigara içiciliği: İlk YÜT sikluslarında sigara içmeyenlerde gebe kalma oranı % 38 iken içenlerde bu oran % 28 olup doza bağlı olarak sigara içicilerinde konsepsiyon yaklaşık 2 ay gecikir. Fertilitedeki bu bozulma ve geç konsepsiyon, oosit sayısında azalma, implantasyon başarısızlığı ve erken düşükleme ile ilgilidir.

(31,42) YÜT sikluslarında sigara içicileri, içmeyenlere göre daha yüksek oranda gonadotropin dozu gerektirmektedir.

Önceki ovulasyon indüksiyonu ya da KOS cevabı: Klinik çalışmalarda GnRH agonist uzun protokolüne LH eklenmesi ile siklus sonucunun değişmediği bildirilmektedir. Öte yandan IVF siklusundaki hipogonadizmi hastalarda LH'tan yoksun ortamda gelişmiş oositlerde fertilizasyonun aynı hastaların FSH+LH kombine tedavisi ile elde edilen fertilizasyondan daha düşük olduğu görülmüştür. (43)

Bazı araştırmacılar geç folliküler fazda LH'in folliküler büyümeyi kontrol ettiğini ve LH konsantrasyonları $>0,5-1$ IU/l olması ile folliküler sıvı Estradiol seviyesi, oosit miktarı ve fertilizasyonun daha iyi olduğunu ileri sürmektedir. (43,44)

Rekombinant LH'in iyi tolere edilebildiği, doza bağlı olarak Estradiol üretimi ve endometriyal kalınlık sağladığı görülmüştür. Folliküler gelişim ve steroidogenez için gerekli LH miktarı minimaldir. Çünkü steroidogenezin devamı için LH reseptörlerinin % 1'inden azının tutulumu yeterlidir. (43)

Hipogonadotropik hipogonadizmi hastalarda minimal etkin doz olan 75 IU ile yeterli folliküler maturasyon ve endometriyal kalınlık sağlanabilmektedir. (39)

2.3.2 Geleneksel Protokol

Eksojen gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyonunda ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu nedenle bu ajanların kullanıma girdiği 1960'li yıllardan itibaren değişik tedavi rejimleri geliştirilmiştir. Ovulasyon indüksiyonu, kullanılan ilaç dozu, serum Estradiol düzeyi ve ultrasonografi ile kontrol edilmeye çalışılmıştır. Tedaviye spontan veya progesteron (oral medroksiprogesteron asetat-MPA, 10 mg/gün 10 gün) ile indüklenmiş menstruasyon kanamasının 3-5. günleri başlanır.

USG'de over kisti ekarte edildikten sonra, folikül uyarımına 150 IU/gün dozunda başlanır. Uygulama günün aynı saatlerinde yapılır. Hasta serum E2 ve ultrasonografi ile periyodik olarak takip edilerek, indüksiyonun 5-7. günü ilaç dozunun artırılmasına veya tedavinin aynı dozda devamına karar verilir. Kontroller 7. günden itibaren 1-3 günlük aralıklarla yapılır. 16-18 mm lik preovulatuvar folikül tespit edildiğinde 10.000 IU hCG ile ovulasyon tetiklenir. hCG uygulamasını takiben 1-3. günlerde koitus önerilir. Ovulasyonu değerlendirmek için hCG gününden 7-9 gün sonra kanda progesteron gebeliği değerlendirmek için ise hCG gününden 14-16 gün sonra, kanda β hCG düzeyi ölçülür.

Geleneksel protokolde, yüksek doz ekzojen gonadotropin kullanılması nedeniyle komplikasyonlar daha yüksek oranda görülür. Ovulasyon oranları % 50-80, kümülatif gebelik oranları % 20-30 arasında değişirken, çoğul gebelik % 23-28, OHSS % 10-20 oranlarına varabilmektedir (45,46)

2.3.3 Kronik Düşük Doz Basamakli Artım (Kronik Low Dose Step Up)

Pilson ve arkalarının yaptığı çalışmasında, ilk olarak FSH eşik doz-eşik düzey kavramını esas alarak, r-FSH'yı cilt altından, 75 IU/gün dozunda foliküler yanıt alınana kadar, maksimum 15 gün uyguladı. 12 mm ve üzerinde folikül sağlanamaması halinde dozu yarım ampul artırdı. Yine yanıt almamazsa, haftada bir yarım ampul (37.5 IU) artışlar yaptı. Foliküler gelişimin sağlandığı dozda, folikül 16 mm çapa ulaşınca kadar devam etti. Folikül 16 mm çapa ulaştığında ovulasyonu tetiklemek için hCG uyguladı. Kronik düşük doz step-up protokolünde, ovulasyon indüksiyonuna spontan menstruel siklus veya 10 mg /gün dozunda oral Medroksiprogesteron asetat'ın 10 günlük kullanımı sonrası gerçekleştirilen çekilme kanamasını takiben 3-5. günlerde 75 IU/gün dozunda uygulamaya başlanır. Tedavinin 7. gününde ultrasonografik inceleme yapılır. 10 mm veya daha üstünde folikül elde edilemezse aynı dozda 14. güne kadar devam edilir. 14. günde yeterli folikül gelişimi izlenemezse doz 37.5 IU/gün artırılır. Folikül gelişimi izleninceye

kadar bir hafta aralıklarla bu doz artımı tekrarlanır. (en fazla 35 güne kadar). Folikül gelişiminin (10 mm veya daha üstü) izlendiği dozda, dominant folikül 17 mm veya daha üstü boyuta ulaşmıncaya kadar devam edilir. Ovulasyonu tetiklemek için 10.000 IU hCG intramüsküler uygulanır. Siklusun daha sonraki takibi geleneksel protokolde olduğu gibi yapılır. Başlangıç dozuna aşırı cevap geliştiği durumlarda, başlangıç dozu 37.5 IU /gün azaltılır. Başlangıç dozuna 14 gün içinde cevap alınamayan siklusun sonrasındaki siklusda, başlangıç dozu 37.5 IU / gün artırılır (47-50). Polson'un ve ark. (50) çalışması ve daha sonraki çalışmalarda, özellikle PKOS olgularında, bu protokolle ovulasyon indüksiyonu yapıldığında, gonadotropin formu ve uygulama yolundan bağımsız olarak, monofoliküler gelişim oranında artış, çoğul gebelik ve OHSS oranında azalma saptanmıştır. hCG uygulama gününde bakılan serum LH, Progesteron ve Estradiol düzeylerinin daha düşük olduğu ve aylık gebelik oranlarının arttığı saptanmıştır (48,51,52).

2.3.4 Step-Down Protokolü

Gerek geleneksel gerekse kronik düşük doz step-up protokolde, ovaryen yanıtın ortaya çıkmasından itibaren, hCG'nin uygulanacağı güne kadar, uygulanan FSH dozunda değişiklik yapılmamaktadır. Geç foliküler dönemde dominant folikülün büyümesi FSH' ya daha az bağımlıdır. Basamaklı artım protokolleri, bu dönemde serum FSH konsantrasyonunu artırarak daha çok folikül gelişmesine neden olabilir (47,53,54). Normal menstrüel sikluslarda, perimenstrüel dönemde başlayıp erken foliküler dönemde devam eden, FSH artışı gözlenir. Geç foliküler dönemde ise FSH konsantrasyonu düşer. Step-down protokolün prensibi, bu FSH değişikliklerinin eksojen yoldan taklit edilmesidir. Stimülasyon başlangıcında, serum FSH konsantrasyonunun sınırlı bir süre eşik düzey üzerinde tutulmasıyla, gelişim sürecine giren folikül sayısında azalma sağlanmaktadır (54).

2.3.5 Klomifen Sitrat Ve Gonadotropin İle Ardışık Protokol

Klomifen sitrat kullanımına dirençli ve açıklanamayan infertilite tanısı olan hastalarda kullanılabilir. Menstruasyonun başlangıcından sonra 3-5. günde başlanarak 50-100 mg/gün dozlarında 5 gün kullanılan standart klomifen sitrat tedavisini takiben (50-100 mg/gün) en son gün düşük doz gonadotropin (75 IU FSH veya HMG) başlanır. Folikül gelişimi hCG uygulaması kriterlerine ulaşına dek takip edilir.

2.3.6 Uzun Etkili GnRH Agonistleri İle Yapılan Down Regülasyon Sonrasında Eksojen Gonadotropin Tedavisi (Long Protokoller)

DeneySEL ve klinik çalışmalarda tekrarlayan invivo kullanımının gonadotropinler üzerinde bifazik salınım yaptığı bulunmuştur. İlk olarak FSH ve LH da ani salınım (flare up etki) olur, daha sonra GnRH reseptörü down regülasyonu ile hipofizer desensitizasyon aşaması gelişir. Gonadotropin sentezindeki azalma GnRH-a kullanımı oldukça devam eder. Desensitizasyonun şiddet ve süresi en azından LH için doza bağımlıdır. Yine doz ve formülasyona bağılı olarak ilaç bırakıldıktan sonra da endojen GnRH-a refrakter bir period oluşur. GnRH-a nin bu özellikleri iki tedavi protokolünde kullanılmaktadır (55,56). Bir önceki siklusun mid-luteal döneminde başlanan GnRH analogu ile hipofizer down regülasyon oluşturulur. Overlerin baskılanmasını takiben gonadotropin uyarısı ile folikül gelişimi sağlanır. Böylece senkron folikül gelişimi uyarılırken, LH'nin erken ve kontrolsüz yükselişi engellenir (57). Genellikle adetın 21. günü başlanır, en az 14 gün süreyle GnRH analogu uygulanır. Takip eden menstruasyonun 1-3. günlerinde yapılan ultrasonografi kontrolünde 10 mm den büyük folikül yoksa, Estradiol düzeyi 50 pg/ml altında ise hipofizer desensitizasyonun tamamlandığı düşünülür, GnRH analoguna ara vermeden kanamanın 3. günü tedaviye gonadotropin eklenir. 14 gün analog kullanımına rağmen hormonal baskılanma sağlanamaz ise kullanım süresi Estradiol düzeyi 50 pg/ml altına düşünceye dek uzatılır. Tedavi sürecinde serum Estradiol düzeyi, gonadotropin eklendikten 3-5 gün sonra yükselmeye başlar ve gonadotropin

dozunun over cevabı için yeterli olup olmadığının göstergesidir. Tedavinin 5-6. gününde ölçülen 100 pg /ml seviyesi dozun yetersiz olduğunu düşündürür, doz artışı yapılmalıdır. 3 gün aralıklarla Estradiol düzeyi (her bir 14 mm boyutundaki folikül için 150-200 pg/ml) ve ultrasonografi ile folikül büyümesi takip edilir. Genelde hedef en az 2 tane 17-18 mm çapında ve 14-16 mm çapında birkaç tane folikül elde etmektir. Son foliküler maturasyon için 5000- 10.000 IU hCG İ.M uygulaması yapılır. Benzer etki için rekombinant hCG yaklaşık 250 µg dozunda geliştirilmiştir ve şu anda kullanımdadır (58). En iyi gebelik sonuçlarının endometrial kalınlık 8-9 mm ve trilaminar (üç katlı görünüm) oluştuğunda elde edildiği bilinmektedir. hCG günü transvajinal ultrasonografi ile ölçülen kalınlık 6-7 mm altında ise sonuçların olumsuz olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (59). Aşırı artmış endometrial kalınlık (14 mm üzeri) kötü prognozla ilişkilidir.

Kullanımdaki GnRH agonistleri;

a) Leuprolid Asetat: En sık kullanılan formdur. Ciltaltı enjeksiyon şeklinde 1.0 mg/gün dozunda, 10-14 gün süresince menstruasyon başlayana dek uygulanır, kullanıma ara verilmeden gonadotropin tedavisi başlangıcı ile dozu günlük 0.5 mg'a düşürülür.

b) Nafarelin Asetat: İntranasal uygulanır.

c) Buserelin Asetat: Ciltaltı veya intranasal kullanılır.

d) Triptorelin Asetat: Ciltaltı uygulanır.

** Uzun Dönem GnRH-a Protokolü

Önceki siklusun luteal fazında ve erken foliküler fazda GnRH-a verilmesi ile hem hipofizer hem de over desensitizasyonu elde edilir. GnRH-a enjeksiyonuna hCG verilene dek devam edilir. Randomize çalışmaların metaanalizinde GnRH-a kullanımının IVF iptal oranını düşürdüğü, oosit sayısını ve klinik gebelik oranlarını

arttırdığı bulunmuştur. Kısa ve uzun dönem protokolleri karşılaştırıldığında değişken sonuçlar elde edilmekle beraber, metaanaliz çalışmalarında anlamlı fark olmadığı bildirilmektedir (60). Hipofizer desensitizasyon parametreleri (hız, şiddet, devam süresi) kullanılan analoge, siklusa ilk kullanım gününe, kullanım süresi ve kullanılan formülasyona göre değişir (55).

** Kısa dönem GnRH-a protokolü

Bu protokolde GnRH-a erken foliküler fazda verilmeye başlanır. GnRH-a'nın flare up etkisinden foliküler gelişim için yararlanır, daha sonra da günlük kullanımla hipofizer desensitizasyon etkisinden yararlanır. Bu protokolde kısa dönem GnRH-a'nın endojen LH yükselmesini engellediği varsayılarak 3 günlük (ultra-kısa protokol) ve 7 günlük kullanımı ile oosit toplama zamanını belirlemek gibi ayarlamalar da yapılmıştır (61,62). Standart kısa protokol, over rezervinin kısıtlı olduğu (poor responder) olgularda yapılır. GnRH analogu (1.0 mg / gün) adet 2-4. günü verilir daha sonra dozu 0.5 mg /gün azaltılır. Gonadotropine adet 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır. Folikül gelişimi takip edilerek hCG uygulama kriterlerine ulaşıncaya kadar tedaviye devam edilir. Mikrodoz flare –up protokolünde ise oral kontraseptif kullanımını takiben kanamanın 3. gününde mikrodoz leuprolid (günde 2 kez 40 µg) tedavisine başlanır ve gonadotropine adet 3. günü 150-450 IU dozunda başlanır.

Folikül gelişimi takip edilerek hCG uygulama kriterlerine ulaşıncaya kadar tedaviye devam edilir. Serum FSH değeri artmış, zayıf over cevaplı hastalar için iyi bir protokoldür. Yapılan çalışmalarda kısa ve uzun GnRH agonist tedavilerinin benzer iptal ve gebelik oranları bildirilmiştir (63). uFSH ve HMG'yi karşılaştıran 2 metaanalizde, uFSH tek başına kullanıldığında over cevabı açısından daha iyi sonuç vermiş ancak GnRH agonisti kullanılan sikluslarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (64). rFSH ve HMG kullanımları için, GnRH agonisti ile down regulasyon yapılan siklusların karşılaştırmasında, gebelik oranları arasında fark bulunamamıştır (65).

GnRH agonistlerinin kronik uygulama gerekliliği olması, flare-up etkileri sonucu over kistleri gelişmesi veya uzun süreli kullanıma bağlı desensitizasyon sonucu over tükenmişlik sendromu oluşturmaları yan etkileridir. GnRH analogu kullanımıyla flare-up etkisine bağlı bazı hastalarda gelişen folikül kistlerinin varlığını bazı araştırmacılar kötü ovaryan cevap, azalmış oosit ve embriyo sayısı ile daha düşük IVF başarısı ilişkili olduğunu savunmakta olsada aksini düşünen çalışmacılarda vardır (66).

2.3.7 GnRH Antagonistleri

Önce uyaran sonra inhibe eden GnRH analoglarının aksine GnRH antagonistleri doz bağımlı şekilde GnRH reseptörlerini bloke eder, hızlıca gonadotropin salgısını inhibe eder. Agonistlere göre avantajları;

- Agonistlere göre tedavi süresi daha kısadır
- Kullanımdaki amaç LH pikini engellemek olduğundan foliküler gelişimin geç döneminde (gonadotropin tedavisinin 5-7 günlerinde) kullanılır. Böylece Estradiol seviyesi artışı engellenmez (67,68)
- Agonist tedavisindeki gibi over cevabı uzun süreli baskılanmadığından kullanılan gonadotropin dozu ve süresi azalır
- Folikül kisti flare etki olmadığı için gelişmez
- OHSS riski daha azdır (68)

GnRH'ın sentetik analogları olan bu ilaçlar pituiter GnRH reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanırlar ancak GnRH reseptör çapraz bağlanmasını ve dolayısı ile kalsiyum aracılı gonadotropin salınımını yapamazlar. Böylece LH salgılanması üzerinde ilk flare up etkisi olmadan güçlü, kısa sürede ve reversible supresyon yaparlar; desensitizasyon periodu gerektirmezler (69,70). Agonistlerle karşılaştırıldığında antogonistlerin etkisi oldukça doza bağlı olup etki mekanizması endojen GnRH ile antagonist arasındaki dengeye bağlıdır (71). Şimdiye dek 3 jenerasyon antagonist kullanılmıştır. İlk ikisi histamin salınımı yaptıklarından geçici

sistemik ödem ve enjeksiyon bölgesinde inflamasyon (1. jenerasyon) ya da sadece local reaksiyona (2.jenerasyon) neden olmaktadırlar. Üçüncü jenerasyonun histamin salınım etkisi az olup, antioovuluar etkisi 2. jenerasyona eşdeğerdir. Üçüncü jenerasyon antagonistlerden üzerinde en çok çalışılanları Cetrotorelix [Cetrotide (Serono)] ve Ganirelix [Antagon veya Orgalutron (Organon)] tir.

2.3.7.1 Multiple Doz GNRH Antagonist Kullanımı

Gonadotropin tedavisine başlandıktan yaklaşık 5-6 gün sonra en büyük folikül 13-14 mm çapa ulaşınca, Estradiol seviyesi 500 pg/ml üzerinde ise 0.25 mg/gün dozunda ciltaltı enjeksiyonu şeklinde yapılır. 96 saat LH pikini geciktirecek Cetrotorelixin 3.0 mg lık tek enjeksiyon formu, günlük kullanım kadar rahat doz ayarlamasına izin vermez. Foliküler maturasyon, hCG gününe kadar gonadotropin dozuna ek günlük antagonist dozu uygulanarak takip edilir. Antagonist dozu bazı hastalarda LH düzeyinde aşırı baskılanma yaratacağı için tedaviye HMG ile devam edilmesini öneren çalışmalar vardır (72). Orta foliküler fazdan (siklusun 5 ya da 6. günü) başlayarak hCG gününe kadar düşük dozda günlük GnRH antagonisti enjeksiyonları yapılır (73). Antagonist verilmesinden sonra Ganirelix için 4, Cetrotorelix için 6 saat içinde pituiter supresyon tamamen etkin olup, LH seviyesi %74 oranında düşerek <1-2 IU/l seviyesine iner (71). Ganirelix ve Cetrotorelixle yapılan çalışmalarda bu etki için 0,25 mg'ın yeterli olduğu bulunmuştur (74). GnRH antagonistini önde giden folikül boyutuna göre başlamanın, sabit günde başlamak kadar etkili olduğu ve bu yöntemle daha az antagonist kullanıldığını belirten çalışmalar mevcuttur (75).

2.3.2.2 Tek Doz GnRH Antagonist Kullanımı

Normoovuluar kadınlarda tek ve büyük doz antagonistin geç foliküler dönemde kullanımının spontan LH artışını ertelediği bulundu (73). Cetrotorelixle 3-5 mg sc doz ile LH artışı 6-17 gün, LH yükselmesinin başında uygulanırsa 3 gün LH

artışı engellenebilir (76). Buna göre antagonist 8. günde ya da over cevabı hızlı ise daha önce kullanılır. Baskılama etkisini üç günden daha fazla uzatmak gerektiğinde ikinci büyük doz ya da günlük 0,25 mg lık dozlar verilebilir (77). Geç foliküler fazda uygulanan GnRH antagonistinin ovülasyona kadar olan oosit gelişimini engellemediği görülmüştür (76). GnRH antagonistleri ile GnRH-a uzun protokolle karşılaştırmalı çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır. En azından çok merkezli çalışmalarda over folikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve gebelik oranları agonist protokolüne göre daha az bulunmuştur (78). Foliküler gelişim açısından bakıldığında agonist siklulara göre antagonist siklularda foliküllerin başlangıçta hızlı büyüdüğü ve östrodiol seviyesinin daha çabuk arttığı görülmüştür (72). Antagonist protokolünün kısa olması nedeni ile hasta uyumunun ve 3. jenerasyon antagonistlerin klinik toleransının yüksek olması antagonist protokolünün avantajlarıdır. Ayrıca kullanılan eksojen gonadotropin miktarının, OHSS sıklığının ve toplam maliyetin az olması da ek avantajlarıdır.

2.4 OVULASYONUN TETİKLENMESİ

2.4.1 hCG

GnRH-a kullanılan IVF protokollerinde LH artışı sağlamak amaçlı gebe kadınların idrarından üretilen uhCG veya rhCG kullanılmaktadır. Çalışmalarda toplanan oosit sayısı ve matür oosit sayısı konusunda çelişkili sonuçlar olmakla birlikte ortak nokta serum progesteron konsantrasyonunun rhCG kullanımı sonrasında daha yüksek olduğu yönündedir. (37,79,80)

2.4.2 Rekombinant LH

Rekombinant LH'in yarılanma ömrü 2 saat iken uhCG'nin 24 saat olup aralarında 10 kat fark ve yaklaşık 7 günlük aktivite farkı vardır. (81) Daha uzun ömrü ve yüksek afinitesi nedeni ile uhCG kullanımı ile, GnRH_a veya LH kullanımına oranla OHSS riski daha fazladır.

2.4.3 GnRH Agonistleri

GnRHa ile indüklenen endojen LH artışı indirekt mekanizmaya ve hastanın kendi pituiter cevabına bağlıdır. Böylece hCG'nin abartılı luteotrofik etkisinden farklı olarak daha fizyolojik seviyede Estradiol ve progesteron konsantrasyonu sağlandığı görülmüştür. Sonuç olarak pratikte ovulasyon induksiyonunda GnRHa kullanımı yüksek OHSS riski olan kadınlarda, multiple gebelik riskinde ve daha önce pituiter desensitizasyon uygulanmamış siklularda avantajlıdır. (82)

2.5 LUTEAL FAZ DESTEĞİ

GnRH analoglarının kullanıldığı siklularda serum LH ve diğer hipofizer gonadotropin konsantrasyonları en az 10 gün daha baskılanmış olarak kalır. (83)

GnRH analogların kullanıldığı stimüle edilmiş siklularda luteal faz desteğinin kullanılması önerilmektedir. Luteal destek amaçlı, hCG, progesteron (vajinal, oral ve intramusküler), luteal GnRH agonist ve Estradiol kullanılan ajanlardır.

2.5.1 Luteal Fazda Progesteron Desteği

Progesteron, hem uterusu embriyo implantasyonu için hazırlamak hem de gebelik esnasında endometriyumu stabilize etmek açısından gereklidir. Çalışmalar progesteronun ayrıca embriyo transferi sırasında ve daha sonrasında oldukça önemli olan uterusu gevşetici etkisinin olduğunu göstermiştir. Progesteronun oral, vajinal, intramusküler uygulamaları vardır. İntramusküler yolla uygulamada 12,5-25-50 veya 100 mg arasında günlük olarak uygulanmaktadır. Vajinal uygulamada progesteronun kapsül formları 50-100 mg günde 2-4 kez veya 200 mg 2-3 kez önerilmektedir. Yavaş salımlı jellerin ise 90 mg günde 1-2 kez kullanılması önerilmektedir.

Oral progesteron formları içerisinde dydrogesterone 10 mg günde 3 kez, medroksiprogesteron asetat günlük 10-40 mg, mikronize formları 300 mg günde 2 kez ya da 200 mg günde 3-4 kez uygulanır.

Oral yol en az tercih edilen yoldur. İlk geçiş etkisine bağlı düşük serum konsantrasyonu ve biyoyararlılık söz konusudur. Ayrıca metabolizması sonucu oluşan yıkım ürünleri bilinç bulanıklığı, uyku hali, sedasyon, hipnotik, baş ağrısı gibi yan etkilere sebep olabilir. Luteal faz desteği ile ilgili son metaanaliz Daya ve Gunby tarafından yapılmış ve 2004 yılında Cochrane kütüphanesinde yayınlanmıştır. (84)

2.5.2 Luteal Fazda hCG Kullanımı

hCG'nin luteal fazı desteklemesi LH'ı taklit ederek corpus luteumu stimüle etmesidir. hCG'nin overleri daha da stimüle etme dezavantajları vardır. Bu yüzden ovaryan hiperstimülasyon riski artmıştır. Daya S'nin metaanalizinde hCG ile progesteronu karşılaştıran 14 çalışma dahil edilmiştir. Klinik gebelik, devam eden gebelik, düşük ve çoğul gebelik açısından her iki ajan arasında herhangi bir fark bulunamamıştır. Canlı doğum oranları hCG grubunda biraz daha fazla olma eğilimi gösterse de istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulunmamıştır. İki ajan arasındaki en önemli fark ciddi OHSS oranlarının hCG grubunda önemli oranda artışıdır. Daya ve arkalarının yaptığı metaanalizde progesteron + hCG ile tek başına progesteron kullanımını karşılaştıran 8 çalışma bulunmuştur. Progesterona hCG ilave edilmesinin, tek başına progesterona bir üstünlüğü gösterilememiştir. Bu çalışmalarda elde edilen en önemli veri hCG ilave edilen grupta OHSS oranlarının bariz artışıdır.

2.5.3 Luteal Fazda Progesteron Estrogen Eklenmesi

Bu uygulamada östrojenlerin luteal faz desteğine katkısı progesteronların reseptör sayısını artırıcı etkisinden faydalanmaktır. Ayrıca yüksek östrojen seviyeleri implantasyon oranları arasında negatif korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. (85)

2.5.4 Luteal fazda GnRH Kullanımı

GnRH agonist uygulaması hangi mekanizma ile bunu sağladığı konusu açık olmasa da, hipofiz, over, endometrium ve embriyo üzerine farklı etkileri olduğu konusunda hipotezler ortaya atılmaktadır. (86)

2.6 TEDAVİ SIRASINDA MONİTÖRİZASYON

Monitorizasyondaki amaç folliküler maturasyonu kontrol etmek, hCG verilme zamanını tespit etmek ve siklusun geleceğini tahmin edebilmektir. Yüksek over cevaplılarda siklusu iptal ederek OHSS'yi engellemek, düşük cevaplıları tespit ederek tedavide ayarlamalar yapmak için monitorizasyon gereklidir. KOS takibinde serum östradiol, LH ölçümü, progesteron ve USG kullanılır.

Serum östradiol seviyesi her zaman follikül büyümesi ile korele değildir. (37) Ayrıca YÜT sikluslarındaki değişken protokollerden dolayı optimal östrojen paterni tanımlanmamıştır. Yine de hangi protokol kullanılırsa kullanılsın Estradiol seviyesinde üç günden fazla sürede devam eden plato siklustaki zayıf sonuçla ilintilidir. Tedavinin 4. günündeki Estradiol seviyesi overin eksojen gonadotropinlere sonraki cevabını tahmin ettirebilir. (87) Uzun dönem GnRH agonist protokolünde pituitar desensitizasyonun değerlendirilmesinde de Estradiol seviyesi kullanılmaktadır. (USG'de 10 mm'den büyük follikül olmaması ile birlikte E2'nin 50 pg/ml altında olması). GnRH antagonistlerinin kullanımı Estradiol cevap paternini değiştirebilir. Follikül boyutları 13-14 mm çapa ulaştığında veya Estradiol düzeyi 250 pg/ml seviyesine yükseldiğinde LH pikinin takip edilmesi gerekir. Bu ölçüm oosit toplanma saatinin ve prematür luteinizasyonun saptanması için bilgi sağlamaktadır. (88) Folliküler büyümeyi USG ölçümü ile değerlendirerek folliküler maturasyon ve hCG zamanlaması hakkında bilgi edinilebilir. USG'de en az 3 adet 16 mm follikül gözleendiğinde hCG enjeksiyonu önerilir. USG ile endometriyal kalınlık ölçümü Estradiol sekresyonu hakkında indirekt bilgi sağlayabilir. Bir çalışmada hCG günü endometriyal kalınlığın <6 mm olduğu olgularda gebelik oluşmadığı görülmüştür. (86)

2.7 KİSSPEPTİN

Kisspeptinler, Kiss-1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen bir öncü proteinden türeyen, hipotalamo-hipofizer-gonadal (HPG) aksı etkileyerek puberte ve fertilitede önemli roller aldıkları düşünülen, farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidler olarak bilinmektedirler. Kisspeptinler ve etkide buldukları GPR54 reseptörleri, insan ve diğer memeli türlerinde üreme fonksiyonlarının kazanılması ve bu fonksiyonları yöneten merkezlerde kisspeptin-GPR54 sisteminin rollerinin anlaşılması açılarından ilgi çekmektedir.

Kisspeptinler ilk olarak 1996 yılında Lee ve arkadaşları tarafından malign melanoma metastazlarını engellemesi ile tanıtıldılar. (89) İsmi Amerika Birleşik Devletleri'nde Hershe şehrinde bulunan meşhur çikolata markası 'Kisses' den almıştır. (89)

2.7.1 Kisspeptin Sentez ve Yapısı

Kisspeptinleri kodlayan KISS1 isimli gen 1q32 kromozumda bulunmaktadır. (5) KISS1 geni tarafından 145 aminoasit uzunluğunda öncül bir protein sentezlenir, ardından bu öncül C-terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH₂) dizileri taşıyan 54,14,13 ve 10 aminoasit uzunluğunda aktif metabolitlerine çevrilir. (90) Kisspeptinler, C terminallerinde 10 aminoasitlik aktif ve kisspeptin-10 olarak adlandırılan bir aminoasit dizisini ortak olarak taşırlar. Bunlardan 54 aminoasite sahip olan yapı ilk bulunan ve tümör metastazına engel olduğu bilinen ve ilk olarak metastin olarak adlandırılan yapıdır. Tüm bu aktif aminoasitler RF amid peptid grubuna aittirler ve kisspeptinler olarak adlandırılırlar. (91) Kisspeptinler arasında fizyolojik etkileri açısından en güçlü reseptör etkisi olan ve doğal olarak oluşan kisspeptin parçasının Kisspeptin-10 olduğu konusunda görüş birliği olmasına karşın, farklı kisspeptinlerin değişik türlerde birbirinden farklı etki gösterdikleri yapılan klinik çalışmalarla ve deneysel hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir.(92,93)

Günümüzde KISS1R olarak adlandırılan kisspeptin reseptörü ilk olarak orphan G-protein coupled receptor⁵⁴ (GPR54) olarak fare beyinde ve hemen ardından insan beyinde tanımlanmıştır. Ardından ismi AXOR12 ve hOT7T175 olarak değiştirildi ve en son olarak KISS1R olarak adlandırılmıştır. (94-97) KISS1R 19p13.3 kromozomu üzerinde kodlanmaktadır. KISS1R reseptörlere kisspeptinlerin bağlanması ile fosfolipaz C aktive olmakta ve bu intraselüler sekonder haberciler inozitol trifosfat ve diaçilgliserol'i harekete geçirmektedir. Bunların sonucunda kalsiyum salınımı olmakta, protein kinaz C aktive olmakta ve sonuç olarak kisspeptinin etkileri ortaya çıkmaktadır. (95, 98, 99)

2.7.2 Kisspeptin Dağılımı ve Etkileri

İnsanda Kisspeptin nöronları hipotalamusta Rostral preoptik alan ve infundibular nükleusta yer almaktadır. (100,101) İfundibular/arkuat nükleus yerleşimi farklı türlerde aynı olarak gözüksede, rostral yerleşim türlere özel olarak değişiklik göstermektedir. (101-105) İnsanlarda GnRH salınımının olduğu hipotalamusun infundibular bölgesinde kisspeptin nöronal aksonlarının yoğun perikapiller pleksuslar oluşturduğu izlenmiştir. (101) Kisspeptin ve GnRH nöronları arasında aynı şekilde bağlantılar hayvan çalışmalarında da gösterilmiştir. (101,102,104,106) Bu bağlantılar kisspeptinin GnRH salgılanmasında yeri olduğunu göstermektedir. Ancak insanlarda ve diğer farklı türlerde tüm GnRH nöronlarının kisspeptin nöronları ile bağlantılı olmadığı, hatta bağlantılı olan nöron oranının çok az olduğu bulunmuştur. (104,106) Bu durum bize GnRH salınımının düzenlenmesinde kisspeptinlerle veya diğer nöropeptidlerle arasında bir bağlantı sistemi olduğunu düşündürmektedir. Hipotalamusta (infundibular-arkuat nükleus) kisspeptin, neurokinin B ve Dinorfin dağılımının benzer olduğu, hatta aynı bölgelerde bulunduğu izlenmesinin ardından bu üç nöropeptidin birlikte çalıştığı fikri ortaya atılmıştır. (100,101) Kisspeptin-Neurokinin B-Dinorfin sistemi infundibular/arkuat nükleusda GnRH aktivitesini etkilemektedir. (104,107,108)

Kisspeptin hipotalamo-pituiter-gonadal aksın bir stimülatörü olduğu yapılan deneysel hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. (89) Kisspeptinler GnRH nöronlarına etki ederek anterior hipofizden gonadotropinlerin salgılanmasını sağlar. (89) Periferik dolaşımda GnRH düzeyinin ölçülememesi nedeniyle Kisspeptin GnRH pulsatilesi arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda gonadotropin düzeyleri değerlendirilmektedir. (89) İlk olarak 2005 yılında Dhillon ve ark. larının yaptıkları klinik çalışmada sağlıklı erkek olgulara intravenöz infüzyon ile Kisspeptin 54 verilmiş. İnfüzyonu takiben çalışmaya dahil olan olgularda periferik kanda yapılan ölçümlerde LH değerinde hızlı ve doz bağımlı bir yükseliş izlenmiş. Aynı çalışmada FSH ve testosteron düzeylerinde de yükselme izlenmiş ancak bu değişim LH düzeyindeki kadar belirgin olmamış. (109) Bu şekilde kisspeptinin GnRH üzerine etkisini periferik kanda LH ve FSH düzeyleri ile değerlendiren bir çok çalışma yapılmış. Bu çalışmalar kisspeptin ile LH arasındaki etkiyi kisspeptinin farklı uygulanma şekilleri, farklı formları (kisspeptin 54 veya 10) ile hem kadınlarda hemde erkekler üzerinde değerlendirmişlerdir. (89) Bu çalışmalarda da ortak bulgu kisspeptin sonrasında periferik kanda LH düzeyinin 2-3 kat artmasına karşın FSH'da olan değişiminin çok daha az olduğudur. (109-114) Kisspeptin'in gonadotropinler üzerine olan etkisinin GnRH'ı direkt etkileyerek olduğunu gösteren deneysel hayvan çalışmaları ve in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Han ve ark'nın 2005 yılında ve Zhang ve ark'larının 2008 yıllarında yapmış oldukları in vitro çalışmalarda kisspeptin'in GnRH nöronlarında depolarizasyona neden olduğu ve pulsatilerinin arttığını göstermişlerdir. (115,116) Aynı şekilde GnRH aktivitesinin değerlendirmek amacıyla c-fos immunreaktiviteden ve GnRH mRNA'dan yararlanılan in vitro çalışmalardada kisspeptin'in GnRH üzerine olan stimüle edici etkisi gösterilmiştir. (7,117,118) İntraserebroventriküler kisspeptin infüzyonu yapılan bir deneysel hayvan çalışmasında serebrospinal sıvıda GnRH içeriğinin arttığı, periferik kanda LH ve FSH düzeylerinin arttığı izlenmiş. (119) Kisspeptinlerin gonadotropin sekresyonunu GnRH üzerinden etkilediği ile ilgili bu çalışmaların dışında bu etkinin direkt gonadotropinler üzerine etki ile olduğunu gösteren deneysel hayvan çalışmaları da mevcuttur. Bu çalışmalarda hipofizyal portal sistemde Kiss1 ve Kiss1R genlerinin izlenmiş olması kisspeptinin direkt FSH ve LH düzeylerine etki ettiğini düşündürmektedir. (120-124) Kisspeptinlerin

gonadotropinler üzerine olan etkisinin direkt mi yoksa GnRH üzerinden mi olduğunun anlaşılması amacıyla yapılan deneysel hayvan çalışmalarında GnRH Antagonist uygulaması sonrasında kisspeptin infüzyonu yapılmış ve LH artışının olmadığı izlenmiştir. (9,12) Literatürde GnRH antagonist uygulaması sonrasında kisspeptinlerin etkisi üzerine yapılan herhangi bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Kisspeptin reseptörlerinin inaktive olduğu genetik mutasyonlar sonucunda hipogonadotropik hipogonadizm geliştiğinin izlenmesi ve bunun aksine kisspeptin reseptörlerinde hiperaktivasyona neden olan mutasyonlar sonrasında puberte prekoks geliştiğinin izlenmesi insanlarda kisspeptinlerin GnRH pulsatilitesi üzerine etkili olduğunu göstermektedir. (11,13,125,126) Aynı şekilde GnRH pulsatilitesinin LH düzeyleri üzerinden değerlendirildiği iki klinik çalışmada kisspeptin 10'un sağlıklı erkeklerde, Kisspeptin 54'ün ise sağlıklı kadınlarda LH pulsatilitesinde frekansı ve amplitüdü arttırdığı izlenmiştir. (111,127)

Sağlıklı erkeklerde kisspeptin infüzyonu ile her zaman periferik kanda LH seviyelerinde ciddi yükselmeler izlenmesine karşın bu durum kadınlar için menstrüel siklusun dönemine göre değişkenlik göstermektedir. (89) Postmenapozal kadınlarla reproduktif dönemde olan kadınların karşılaştırıldığı klinik bir çalışmada postmenapozal dönemde kisspeptin-10 infüzyonuna yanıtın erken foliküler fazdakinden çok daha fazla olduğu izlenmiştir. (112) Aynı şekilde kombine oral kontraseptif kullanan kadınların kisspeptin 10 infüzyonuna verdiği yanıt, menstrual siklusun luteal fazında yapılan kisspeptin 10 infüzyonuna verilen yanıtın çok daha düşük olduğu bildirilmiştir. (110,112) Menstrüel siklus sırasındaki kisspeptine verilen yanıtın değişimleri ile ilgili yapılmış olan bir klinik çalışmada 2011 yılında Jayasena ve ark ları tarafından yapılmış. Bu çalışmada menstrual siklusun erken foliküler dönemindeki sağlıklı kadınlara intravenöz bolus, subkutan bolus ve intravenöz infüzyon şeklinde Kisspeptin-10 verilmiş, bunun sonucunda ciddi bir LH yükselmesinin olmadığı izlenmiştir. (113) Jayasena ve ark larının yaptıkları çalışmalarının aksine ise bir başka klinik çalışmada benzer şekilde menstrual siklusun erken foliküler döneminde intravenöz bolus kisspeptin 10 infüzyonu ardından belirgin LH piki olduğu bildirilmiştir. (112)

Menstrüel siklus sırasında GnRH ve LH sekresyonunun gonadal steroid hormonların feed back etkisi altında olduğu ve siklusun foliküler fazında estrogenin negatif feed back etkisi ile GnRH ve LH salgılanmasının baskılandığı bilinmektedir. (89) Ancak siklusun ilerleyen dönemlerinde midluteal fazda LH pikini sağlayanında estrogenin bu sefer pozitif feed back etkisinin olması durumu ile ilgili mekanizma hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. (89) GnRH nöronları üzerinde estrogen reseptörlerin bulunmaması bu gonadal feed back mekanizmasında aracı başka nöronal yapıların olduğunu bizlere düşündürmektedir. (89) Bu noktada son yıllarda yapılan çalışmalarda bu bağlantının Kisspeptin- Neurokinin B- Dinorfin yoluyla olduğu üzerinde durulmaktadır. (89) Rometo ve arklarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, postmenapozal kadınlarda infundibular nukleusta kisspeptin nöronlarının hipertrofiye uğradığını Kiss1 mRNA üzerinden göstermiştir. (128) Yapılmış olan bazı çalışmalarda da postmenapozal kadınlarda hipertrofiye uğrayan nöronlarda estrogen reseptör ve nörokinin B mRNA yoğunluğunda artış izlenmiş ve bu dağılımın kisspeptin nöronları ile benzerlik göstermesi feed back mekanizmasında kisspeptin-nörokinin B-dinorfin sisteminin etkisi olduğu ihtimalini güçlendirmektedir. (89) Oakley ve arklarının 2009 yılında ve Lehman ve arklarının 2010 yılında overektomize hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda infundibular nukleusta kisspeptin ve nörokinin B'nin estrogen negative feed back etkisi için birlikte çalıştığını destekleyecek veriler elde etmişlerdir. (129,130) Aynı şekilde overektomize hayvanlarda intraserebroventriküler kisspeptin antagonist uygulanmasının ardından LH seviyelerinde gerileme olduğu izlenmiştir. (131) Bunlara benzer olarak 2004 yılında yapılmış olan bir hayvan çalışmasında overektomize hayvanlarda estrogen replasmanının nörokinin B gen ekspresyonunu azalttığı izlenmiştir. (132) Tüm bu verilerden yola çıkarak estrogenin negatif feed back etkisini kisspeptini baskılayarak ve nörokinin B salınımına neden olarak Kisspeptin-Nörokinin B-Dinorfin yoluyla üzerinden gösterdiği ortaya çıkmaktadır.

Menstrüel siklusun geç foliküler fazında estrogen negatif feed back etkisi artık pozitif feed back etkisine dönmektedir, ancak bunun nasıl olduğu hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (89) Son verilere göre estrogenin negatif feed back etkisinde olduğu gibi pozitif feed back etkisinde de Kisspeptin-Nörokinin B-

Dinorfin sisteminin etkili olduğu gösterilmiştir.(89) Estrogene bağlı negatif feed back etkinin ortaya çıkmasında etkili Kisspeptin-Nörokinin B- Dinorfin sisteminin infundibular/arkuat nukleusda bulunmasına karşın, estrogenin pozitif feed back etkisine yol açan Kisspeptin- Nörokinin B- Dinorfin sisteminin daha farklı bölgelerde yer aldığı ve türler arasında farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. (89) Son çalışmalar menstrual siklus sırasında LH pikinin oluşmasında Kisspeptinlerin rolünün olduğunu ortaya koymuşlardır. (89) Abbare ve arkalarının 2013 yılında yaptıkları bir klinik çalışmada kontrollü ovaryan stimülasyon sırasında final oosit maturasyonu ve LH pikini sağlamak amacı ile kullanılan hCG yerine Kisspeptin-54 kullanmışlar ve başarılı olmuşlardır. (133) Jayasena ve arkalarında 2013 yılında günde iki defa Kisspeptin 54 infüzyonu sonrasında menstrual siklus süresinin kısaldığını ve LH pikinin elde edildiğini bildirmişlerdir. (134) Yapılan birçok hayvan çalışmasında da kisspeptin infüzyonu sonrasında erken LH pikinin elde edildiği ve Kisspeptin antagonist uygulanması ile LH pikinin engellendiği bildirilmiştir. (135-138) Santral sinir sisteminde Kisspeptinlerin Estrogen pozitif feed back etkisine neden olan bölgeleri tür bağımlı olarak değişmektedir. Bunun belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel hayvan çalışmalarında estrogen replasmanı sonrasında AVPV nükleusunda Kiss1 mRNA ekspresyonunda anlamlı artış olduğu izlenmiştir. (15,16) Ancak literatürde estrogen pozitif feed back mekanizması ile ilgili olan Kisspeptin- Neurokinin B- Dinorfin sisteminin insanlarda lokalizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. (89)

2.7.3 Kisspeptin Ve Klinik

Kisspeptin ve Puberte: İlk olarak 2003 yılında Seminara ve arkalarının yaptığı deneysel hayvan çalışmasında kisspeptin reseptör disfonksiyonu olan farelerde hipogonadotropik hipogonadizm geliştiği izlenmiş ve bu hayvanlarda düşük seviyelerde olan gonadotropin sebebi ile erkeklerde küçük testisler, dişi olanlarda ise vaginal açılmada gecikme ve foliküler gelişme noksanlığı olduğu tespit edilmiş. (139) Aynı çalışmada ekzojen GnRH verilmesi ile fenotipik olarak düzelme izlenmiş. (139) Benzer çalışmalarda literatürde bulunmaktadır. (140-142) Navarro

ve arklarının yaptıkları bir deneysel hayvan çalışmasında ise santral sinir sistemine kisspeptin enjeksiyonu yapılmış ve erken dönemde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında olgu grubunda vaginal açılma, artmış uterin ağırlık, plazma LH ve estrogen seviyesinde artış izlenmiş. 2008 yılında Teles ve arkları tarafından puberte prekoks ile başvuran bir kızda otozomal dominant kisspeptin gen mutasyonu bildirilmiştir. (125) Kore’de yapılan, puberte prekokslu kız çocuklarının ve aynı yaştaki prepubertal kız çocuklarının dahil edildiği bir çalışmada puberte prekokslu kız çocuklarının bulunduğu olgu grubunda plazma kisspeptin seviyelerinin anlamlı olarak fazla olduğu izlenmiş. (143) Puberte prekokslu kız çocuklarında ilk başvuruda ve 6 aylık tedavi sonrasında plazma kisspeptin düzeylerinin karşılaştırıldığı bir klinik çalışmada 6 aylık tedavi sonrasında plazma kisspeptin düzeylerinde anlamlı olarak düşüş izlendiği bildirilmiştir. (144)

Kisspeptin ve Gebelik: En yüksek düzeyde periferik kisspeptin ekspresyonun trofoblastik hücrelerde bulunmaktadır. (145-147) Yapılan klinik çalışmalarda gebelik sürecinde periferik dolaşımdaki kisspeptin düzeyi artmaktadır, hatta son trimesterde gebe olmayan kadınlara göre kisspeptin düzeyi 7000 kat daha fazla bulunmaktadır. (147,148) Normal gebelikler ile gestasyonel trofoblastik hastalıkların karşılaştırıldığı bir çalışmada plasental kisspeptin düzeyinin gestasyonel trofoblastik hastalıklarda normal gebeliklere göre daha fazla olduğu izlenmiştir. (148) Buna benzer olarak gestasyonel trofoblastin neoplazilerde plazma kisspeptin seviyesi normal gebeliklerle karşılaştırıldığında daha fazla olduğu bulunmuş. (148) Aynı çalışmada gestasyonel trofoblastik neoplazi grubunda plazma kisspeptin düzeyinin kemoterapi ile birlikte düştüğü izlenmiş. (148) Gebelik sürecinde kisspeptinlerin fonksiyonu net olarak bilinmemekle birlikte trofoblastik invazyonda görev aldıkları düşünülmektedir. (148) Kisspeptinlerin trofoblastik invazyon ile ilişkili olduğunun düşünülmesi nedeniyle plasental disfonksiyon nedeniyle oluşan preeklampsi ve intrauterin gelişme gerilikleri ile kisspeptin arasında bağlantıyı inceleyen klinik çalışmalar yapılmıştır. Cetkovic ve arkların 2012 yılında sağlıklı gebelerden oluşan kontrol grubu ile tip 2 diabetes mellitus, gestasyonel diabetes mellitus, hipertansiyon ve plasental disfonksiyon tanısı olan olgu grubunu karşılaştırdıkları bir klinik çalışmada olgu

grubunda plazma kisspeptin düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu sonucu bulunmuştur. (148)

Park ve arkları 2012 yılında abortus sonrası alınan plasental örneklerle isteğe bağlı gebelik sonlandırılması sonrasında alınan plasental örnekleri karşılaştırmıştır. Bu çalışmada abortus sonrası alınan örneklerdeki kisspeptin ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu izlenmiştir. (Ancak çalışmada gebelik haftaları dikkate alınmamıştır.) (148) Erken gebelik kayıplarının kisspeptin ile ilişkisinin incelendiği diğer bir çalışmada erken gebelik haftalarında vaginal kanaması olan hasta grubunda plazma kisspeptin-10 düzeyinin normal seyreden gebeliklere göre anlamlı olarak düşük olduğu izlenmiştir. (148)

Kisspeptin-Beslenme-İnfertilite: Vücut kitle indeksinin fertilité üzerine olan etkisi uzun süredir bilinmektedir. Leptin yağ dokusundan sekrete edilen peptid yapıda bir hormondur. Deneysel hayvan çalışmalarında ve klinik çalışmalarda leptin yoksunluğunun gecikmiş puberte, hipogonadotropik hipogonadizm ile sonuçlandığı gösterilmiştir. (149,150) Leptin eksikliği nedeniyle oluşan infertilite problem leptin infüzyonu sonrasında düzelmektedir. (149-151) Burdan yola çıkarak beslenme ve fertilité arasında leptin yoluyla bir bağlantı olabileceği ortaya konmuştur. (148) GnRH nöronları üzerinde insulin yada leptin reseptörü bulunmuyor olması bahsedilen bağlantının kurulmasında başka bir aracının olduğunu düşündürmektedir. (148) Leptin ve GnRH arasındaki bağlantının Kisspeptinler tarafından olabileceğini gösteren bir çalışmada leptin reseptör gen defekti olan farelerde ve sağlıklı farelerde santral sinir sistemindeki kisspeptin düzeyleri incelenmiştir. Sonuç olarak leptin reseptör gen defekti olan grupta kisspeptin düzeyi sağlıklı olanlardan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. (148) Aynı çalışmada leptin gen defekti olan gruba leptin infüzyonu sonrasında kisspeptin düzeylerinde artış izlenmiştir. (148) Başka bir hayvan çalışmasında aç bırakılan deneklerde hipotalamik kisspeptin mRNA düzeyinin azaldığı ve pubertede gecikme olduğu izlenmiştir olup uzun süre normalden az beslenmiş prepubertal deneklere santral sinir sistemi kisspeptin uygulanmasının ardından pubertal gelişimin olduğu izlenmiştir. (152) Bu çalışmaların aksine

Donato ve arkadaşlarının yapmış oldukları deneysel hayvan çalışmasında kisspeptin nöronları üzerindeki leptin reseptörlerinde defisit olan deneklerde reproduktif fonksiyonlarda herhangi bir bozukluk olmadığı gözlenmiştir ve kisspeptinin leptin ile reproduktif sistem arasındaki ilişkide önemli olmadığı sonucuna varılmıştır.(153) Bunun ardından leptinin kisspeptin üzerine olan etkisinde aracılık eden başka moleküllerin varlığı araştırılmıştır. (148)

Nöropeptid Y gıda alınmasını arttıran peptid yapıda bir hormondur. (148) Pro-opiomelanocortikotropin(POMC), anorektik etkisi ile bilinen alfa-melanosit stimulating hormon için öncül bir hormondur. Nöropeptid Y ve POMC ekspresyonuna neden olan nöronlar ile kisspeptin nöronları santral sinir sisteminde yakın komşuluk göstermektedirler. (154) Alfa- melanosit stimulating hormon agonistinin santral infüzyonu sonrasında preoptik alanda kisspeptin düzeyinde artış olduğunu ve infüzyon sonrası plazma LH artışı olduğunu gösteren deneysel hayvan çalışmaları bulunmaktadır. (155)

Kisspeptin ve Stress: Stresin GnRH salınımını baskılayarak reproduktif sistem üzerine etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etkinin oluşmasında kortikotropin releasing hormon sorumlu tutulsada tam olarak açıklanamamıştır. (148) Kinsey-Jones ve arklarının yapmış oldukları deneysel hayvan çalışmasında santral sinir sistemine yapılan kortikotropin releasing hormon infüzyonu sonrasında kisspeptin düzeylerinde ve aynı zamanda kisspeptin reseptör sayısında düşüş olduğu izlenmiştir. (156) Sonuç olarakda stresin reproduktif sistem üzerindeki baskılayıcı etkisinde kisspeptin rolü ortaya konmuştur. Çalışmalarda strese bağlı reproduktif sistem baskılanmasını incelemek amacıyla sıklıkla kullanılan lipopolisakkaritlerin birçok memeli türünde GnRH sekresyonunu baskıladığı bilinmektedir. (148) Knox ve arkları tarafından yapılan deneysel hayvan çalışmasında neonatal dönemdeki deneklere lipopolisakkarit enjeksiyonu yapılmış ve bu işlem sonucunda deneklere medial preoptik alanda kisspeptin mRNA' da azalma ve gecikmiş puberte izlenmiş. (157) Buna bir hayvan çalışmasında ise overektomize ve sağlıklı iki grup deneye intraperitoneal lipopolisakkarit verilmiş, iki grupta plazma LH düzeylerinde,

hipotalamik kisspeptin ve GnRH mRNA düzeylerinde düşüş izlenmiş. Bu iki grup arasında anlamlı fark olmadığı ve kisspeptinlerin stress sonrasında reproduktif sistem üzerine olan etkisinde gonadal steroidlerden bağımsız olarak etki gösterdiği sonucuna varılmış. (158)

Kisspeptin'in Terapotik Amaçlı Kullanımı: Kisspeptlerin reproduktif sistem üzerinde olan etkilerinin gün geçtikçe ortaya çıkması, bu hormonların tedavi amacıyla kullanılmasını gündeme getirmiştir. Kisspeptin infüzyonu ile yapılmış olan hem deneysel hayvan çalışmalarında hem de klinik çalışmalarda ciddi bir yan etki gözlenmemiştir. (148) Burdan yola çıkarak kisspeptinlerin manupilasyonu ile hipogonadotropik hipogonadizm gibi GnRH defisitlerinde veya da GnRH'ın suprese edilmesinin gerekebileceği hormon sensitif kanserlerde olduğu gibi hastalıkların tedavisinde denenebileceği düşünülmektedir. (148)

Deneysel hayvan çalışmalarında ve in vitro çalışmalarda kisspeptinlerin growth hormon ve prolaktin salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir. (159) Ancak bundan farklı olarak insanlarda kisspeptinler ile tiroid stimüle edici hormon (TSH), growth hormon ve prolaktin arasındaki ilişkinin incelendiği klinik bir çalışmada akut ve kronik Kisspeptin 54 infüzyonu sonrasında bu hormonların düzeyinde bir değişim izlenmemiştir. (Çalışmaya 5 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir)(160) Bu çalışmada kisspeptin infüzyonu sonrasında GnRH pulsasyonunda bir değişim olmayışı kisspeptinin hipofiyal hormonlar üzerine etkili olabileceği ihtimali dışlamaz. (148) Prolaktinin gonadotropin salgılanmasını baskıladığı bilinmektedir. Hiperprolaktinemiye bağlı olarak gelişen gerek fizyolojik (laktasyon sırasında) gerekse patolojik durum infertilite nedenleri arasında yer almaktadır. (148) Arajo-Lopes ve arklarının yapmış oldukları deneysel hayvan çalışmasında overektomize deneklerde yüksek prolaktin seviyelerinin santral sinir sisteminde kisspeptini suprese ettiği ve bu yolla prolaktinin LH'ı baskıladığı sonucuna varılmıştır. (161) Bu verilerden yola çıkarak infertiliteye neden olan ve başka şekilde tedaviye edilemeyen hiperprolaktinemi olgularında farklı tedavilerin olabileceği düşünülmektedir. (148)

Son dönem çalışmalar uzun süreli kullanılan kisspeptin agonistlerinin plazma testosteron düzeyi üzerinde supresif etkilerinin olduğu ve bunun faz 1 çalışmalarında prostat kanser tedavisi üzerinde çalışıldığı bilinmektedir. (148)

Kisspeptin ve IVF: Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında kisspeptinin preovulatar LH pikinin sağlanmasında tetikleyici rolünün izlenmesinden dolayı kisspeptinlerin IVF tedavisi sırasında kullanılması söz konusu olmuştur. (148) Rekombinant FSH ve GnRH antagonist protokolünün kullanıldığı IVF sikluslarında final oosit maturasyonu amacıyla Kisspeptin 54 infüzyonun etkisinin incelendiği klinik çalışmada Kisspeptin uygulanmasından 36 saat sonra oosit maturasyonu izlenmiş. (162) Final oosit maturasyonun tetiklenmesi amacıyla hala sıklıkla hCG kullanılmaktadır. (148) hCG direkt olarak overler üzerinden etki ederek LH piki oluşmasını sağlamaktadır ve bu nedenle hCG uygulaması sonrasında oluşan etkinin kontrol edilmesinde bilinen bir negatif feed back mekanizması bulunmamaktadır. (148) Tüm bu nedenlerden dolayı hCG ile yapılan işlemlerde ovaryan hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gelişme riski bulunmaktadır. (148) Henüz literatürde yeterli çalışma olmamasına karşın, yapılmış olan deneysel hayvan çalışmaları ve klinik çalışmaların sonuçlarına bakılarak final oosit matürasyon amacıyla kisspeptinlerin kullanılmasının IVF siklusları sırasında OHSS gelişme riskini ciddi şekilde azalttığını söylemek mümkündür. (148)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 HASTA SEÇİMİ

Çalışma; Ağustos 2015-Nisan 2016 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil olma kriterlerine uyan kontrollü ovaryan stimülasyon yapılacak ve siklus sırasında erken LH pikinin önlenmesi amacıyla GnRH Antagonist uygulanması planlanan hastalar dahil edilmiştir. Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'undan onay alındıktan sonra başlandı.

Çalışmaya Dahil olma kriterleri ;

- 18-40 yaş aralığında olan olgular
- Menstrüel siklusun 2. veya 3. gününde yapılacak olan hormon analizinde FSH değerinin 12, Estradiol değerinin 40 ng/ml'den az olması
- Beden kitle indeksinin (BMI) 18-30 aralığında olması
- Menstrüel siklusun 3. Gününde yapılacak olan androjen profilinin normal sınırlarda olması.
(Serbest testosteron düzeyi 0,29-3,18 pg/mL
Total testosteron düzeyi 0,1-0,75 ng/ mL
DHEA-SO4 düzeyi 29-781 µg/ dL
17- Progesteron düzeyi 0,32-1,47 ng/mL)
- Yapılacak TVUSG değerlendirmesinde pelvik patolojik oluşum izlenmemiş olması

Çalışmadan Dışlama kriterleri ;

- Medikal hastalık öyküsü (Diabetes mellitus, tiroid ile ilgili rahatsızlıklar, Hiperprolaktinemi)
- Endokrin sistem üzerine etki edebilecek ilaç kullanımı (son 3 ay içerisinde)
- Menstrüel siklusun 2. veya 3. gününde yapılan TVUSG değerlendirmesinde 10 mm' den büyük ovaryan folikül izlenmesi
- Menstrüel siklusun 3. gününde yapılacak bazal TVUSG değerlendirmesinde 2 overde toplam antral folikül sayısının 6'dan az olması

3.2 ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Menstrüel siklusun 3. gününde tüm gönüllülerden folikül stimüle edici hormone (FSH), Luteinize edici hormone (LH), Estradiol, Tiroid Stimüle edici hormone (TSH), Prolaktin plazma düzeyleri bakıldı ve kaydedildi. Aynı zamanda olgulardan bazal Kisspeptin düzeyinin belirlenmesi amacıyla venöz kan örnekleri alınarak usulüne uygun olarak saklandı.

Çalışmaya katılma kriterlerine uyan ve KOS başlanması için herhangi bir medikal engeli olmayan hastalara menstrual siklusun 3. gününde recombinant FSH veya HMG başlandı. Menstrüel siklusun belirlenen günlerinde gönüllüler kontrole çağrılarak doz ayarlaması yapıldı. Stimülasyon protokolüne yanıt alınmaz veya ovaryan hiperstimülasyon sendromu(OHSS) riskinden dolayı tedavinin durdurulması gereken durumlarda ise, bu olgular çalışmadan çıkartıldı. Yapılan transvaginal ultrason (TVUSG) takiplerinde 12.5 mm boyutlarında ovaryan folikül izlenmesi durumunda erken dönemde oluşacak LH pikinin önlenmesi amacıyla ovulasyon tetikleme yapılana kadar GnRH Antagonisti (Orgalutran, MSD ilaç; Cetrotide, Serono ilaç) verildi. gönüllülerden GnRH Antagonist uygulaması yapılan gün

uygulamadan hemen önce ve uygulamadan 48 saat sonra venöz kan örnekleri alındı ve bu örnekler Kisspeptin düzeyinin belirlenmesi amacıyla usulüne uygun olarak saklandı. En az 3 folikülün 17 mm çapa ulaşması durumunda stimülasyon sonlandırılarak mevcut folikül sayısı ve çapları kaydedildi. Bu sırada plazma Kisspeptin düzeyinin belirlenmesi amacıyla olgulardan venöz kan örnekleri alınarak usulüne uygun olarak saklandı. Aynı gün ovulasyonun tetiklenmesi amacıyla GnRH agonisti veya rec hCG (Ovitrelle 250 mcg/0.5 mL kullanıma hazır enjektör, Merck ilaç) uygulandı. Ovulasyon tetiklemesinden 34-36 saat sonra TVUSG eşliğinde oosit toplama işlemi yapıldı. ICSI/IVF uygulandı. ICSI/IVF sonrasında elde edilen embriyolar kültür ortamında klivaj (2,3 gün) veya blastokist (5 gün) evresine kadar takip edildi. Gelişen embriyoların kalite açısından morfolojik değerlendirilmesinin yapılmasının ardından 1 veya 2 adet iyi kalitede embriyo transabdominal (TAUSG) eşliğinde bir katater yardımı ile transfer edildi.

Hastalardan KOS'a başlamadan önce (menstrüal siklusun 2-3-4. günlerinden birisinde), GnRH uygulamasına başlamadan önce, başladıktan 48 saat sonra ve ovulasyon tetiklemesi yapılmadan önce günü olmak üzere 4 defa brakial venler aracılığı ile 10 cc venöz kan kırmızı kapaklı biokimya tüplerine alındı. Alınan kanın soğuk bir ortamda saklanması ardından 3000 devirde 15 dk santrifügasyon sonrası üstte kalan plazma kısmı biyokimyasal ölçümler için eppendorf tüplerine konularak analiz yapılana kadar -80 C'de saklandı. Saklanan örneklerde metastaz-supresor KISS-1 (katalog no: CSB-EL012373HU, CUSABİO Biotech Co, ABD) seviyeleri, 'enzyme linked immunosorbent assay (ELİSA)' yönteme dayanan ticari kitlerle üretici önerilerine göre ölçüldü. Bu prosedürde önceden antikorlarla kaplanmış ELİSA plak çukurlarına, standart ve örnekler eklenerek inkübe edildi. Bağlanmayanlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, biyotinle konjuge edilmiş analite spesifik antikor eklenerek ikinci kez inkübe edildi. Sandviç oluşturamayan fazlalıklar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, avidinle konjuge edilmiş peroksidaz eklenerek üçüncü kez inkübe edildi. Bağlanmayanlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, eklenen kromojenik substratın katalizlenmesiyle oluşan renk değişimi plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Oluşan rengin optik dansitesi örneklerdeki analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneklerdeki analit

konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı. Metastin-supresor KISS-1 ELİSA kitinin sensitivitesi 0.078 ng/mL, ölçüm aralığı 3.9-250 pg/mL, çalışma içi CV'si <%15, çalışmalararası CV'si <%15 idi.

3.3 İSTATİSTİK

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS 22 programı ile analiz edildi.

Verilerin değerlendirilmesinde Pearson Korelasyon Testi, Wilcoxon Singup Ranked Test ve Kruskal Wallis Test kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık açısından $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen toplam 27 olgu 18-40 yaş aralığında olup ortalama yaş 31.8 ± 4.6 olarak hesaplanmıştır. (Tablo1) Olguların beden kitle indeksi (BMI) ortalaması 24.6 ± 2.5 olarak saptanmıştır. Tüm olguların bazal Folikül stimüle edici hormone (FSH) ortalaması 6.3 ± 1.7 , bazal Luteinize edici hormon (LH) ortalaması 5.6 ± 1.9 , bazal Estradiol ortalaması 57.3 ± 23.0 ve bazal Kisspeptin düzeyi ortalaması 1.1 ± 0.3 olarak hesaplanmıştır. (Tablo 1)

Tablo 1. Hastaların Klinik Özellikler ve Bazal Hormon Değerlerinin İncelenmesi

Klinik Özellikler	(n:27) (ort \pmSS)
Yaş	31.8 ± 4.6
BMI*	24.6 ± 2.5
FSH**(mlU/mL)	6.3 ± 1.7
LH***(mlU/mL)	5.6 ± 1.9
Estradiol(mlU/mL)	57.3 ± 23.0
Kisspeptin (ng/mL)	1.1 ± 0.3

Veriler: ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir.

*BMI: Beden kitle indeksi, **FSH=Folikül Stimüle Edici Hormon,

***LH=Lutenizan Hormon

Tablo 2. Bazal Kisspeptin Düzeyi ile Yaş, BMI, bazal FSH, bazal LH ve bazal Estradiol arasındaki ilişki

Değişkenler	Bazal Kisspeptin Düzeyi	
	r *	p
Yaş	0.211	0.290
BMI**	0.362	0.064
FSH***(mIU/mL)	0.280	0.157
LH****(mIU/mL)	-0.285	0.149
Estradiol(mIU/mL)	-0.074	0.713

*r: Pearson Korelasyon testi, **BMI: Beden Kitle İndeksi, *** FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon, ****LH: Luteinizan Hormon

Bazal Kisspeptin düzeyi ile yaş, BMI, bazal FSH, LH ve Estradiol düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla Pearson Korelasyon Testi uygulandı. (Tablo 2) Yapılan değerlendirmede değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Tablo 3. KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

	Olgu	Gruplar	Ort + SD	Median (min-max)	Karşılaştırmalar	
Serum KP seviyesi (ng/mL)	n=27	KP 1**	1.05 0.30	0.98 (0.81-2.13)	KP1 vs KP2	0.290
		KP 2***	1.04 0.25	0.99 (0.82-2.13)	KP1 vs KP3	0.058
		KP 3****	0.95 0.19	0.91 (0.73-1.81)	KP1 vs KP4	0.857
		KP 4*****	0.99 0.14	0.97 (0.77-1.52)	KP2 vs KP3	0.001
					KP2 vs KP4	0.368
				KP3 vs KP4	0.001	

*Wilcoxon singup ranked test, ** KP1: Kisspeptin 1: Bazal Kisspeptin düzeyi, ***KP2: Kisspeptin 2: GnRH Antagonist uygulanmasından önce ölçülen Kisspeptin düzeyi, ****KP3: Kisspeptin 3: GnRH Antagonist uygulanmasından 48 saat sonra ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi, *****KP4: Kisspeptin 4: Final oosit matürasyonu amacıyla yapılan Trigger öncesinde ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi

KOS siklusu sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişim Tablo 3’de değerlendirilmiştir. Buna göre Kisspeptin 2 değeri ile Kisspeptin 3 değeri arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (1.04 0.25 ve 0.95 0.19; p <0.05) Aynı şekilde Kisspeptin 3 ve Kisspeptin 4 değeri arasındaki değişimde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (0.95 0.19 ve 0.99 0.14; p<0.05)

Çalışmamızdaki primer amaç olarak belirlenen KOS siklusu sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin belirlenmesi ve GnRH antagonist uygulaması ile plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin belirlenmesi amacıyla oluşturulan grafik Şekil 1’de sunulmuştur.

Tablo 4. PKOS’lu olgularda KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

	Olgu	Gruplar	Ort + SD	Median (min-max)	Karşılaştırmalar
Serum KP seviyesi (ng/mL)	n=7	KP 1**	0.92 0.89	0.89 (0.81-1.10)	KP1 vs KP2 0.128
		KP 2***	0.99 0.13	0.98 (0.85-1.23)	KP1 vs KP3 0.128
		KP 3****	0.88 0.14	0.82 (0.73-1.18)	KP1 vs KP4 0.499
		KP 4*****	0.95 0.14	0.89 (0.77-1.19)	KP2 vs KP3 0.018
					KP2 vs KP4 0.499
				KP3 vs KP4 0.018	

*Wilcoxon singup ranked test, ** KP1: Kisspeptin 1: Bazal Kisspeptin düzeyi, ***KP2: Kisspeptin 2: GnRH Antagonist uygulanmasından önce ölçülen Kisspeptin düzeyi, ****KP3: Kisspeptin 3: GnRH Antagonist uygulanmasından 48 saat sonra ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi, *****KP4: Kisspeptin 4: Final oosit matürasyonu amacıyla yapılan Trigger öncesinde ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi

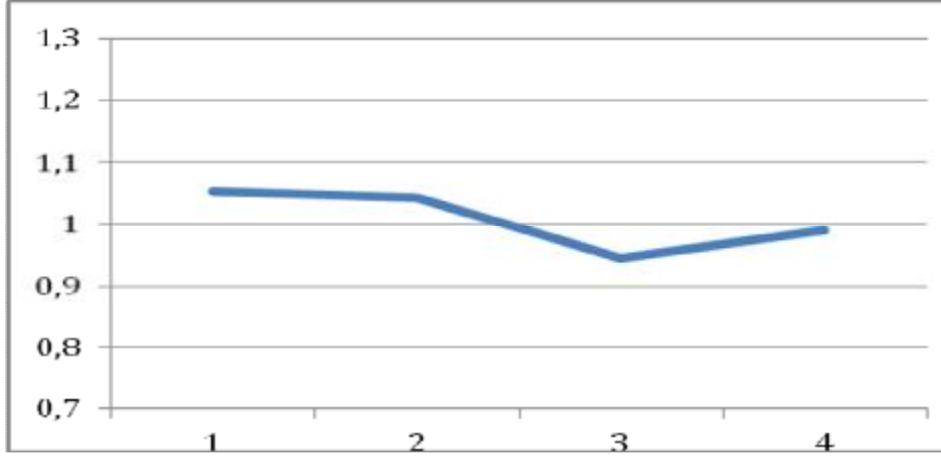
Çalışmaya dahil olan PKOS’lu 7 olgunun plazma Kisspeptin düzeyindeki değişim Tablo 4’de ve Şekil 2’de değerlendirilmiştir. Buna göre Kisspeptin 2 ve 3 arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. (0.99 0.13 ve 0.88 0.14; p<0.05) Aynı şekilde Kisspeptin 3 ve 4 arasındaki değişimde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (0.88 0.14 ve 0.95 0.14; p<0.05)

Tablo 5. PKOS’lu olmayan olgularda KOS sırasında plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin incelenmesi

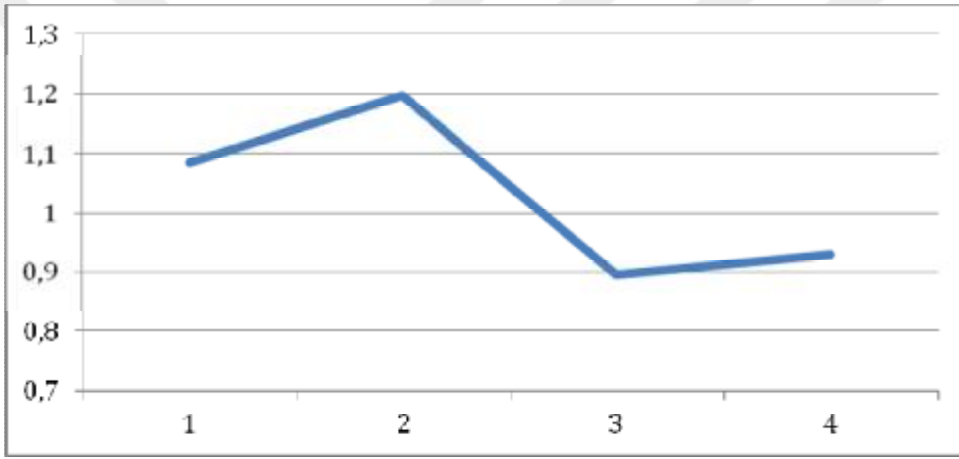
	Olgu	Gruplar	Ort + SD	Median (min-max)	Karşılaştırmalar
Serum KP seviyesi (ng/mL)	n=20	KP 1**	1.09 0.34	0.99 (0.81-2.13)	KP1 vs KP2 0.627
		KP 2***	1.06 0.28	1.01 (0.82-2.13)	KP1 vs KP3 0.156
		KP 3****	0.97 0.21	0.91 (0.81-1.18)	KP1 vs KP4 0.823
		KP 4*****	1.00 0.14	0.97 (0.87-1.52)	KP2 vs KP3 0.014
					KP2 vs KP4 0.601
				KP3 vs KP4 0.007	

*Wilcoxon singup ranked test, ** KP1: Kisspeptin 1: Bazal Kisspeptin düzeyi, ***KP2: Kisspeptin 2: GnRH Antagonist uygulanmasından önce ölçülen Kisspeptin düzeyi, ****KP3: Kisspeptin 3: GnRH Antagonist uygulanmasından 48 saat sonra ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi, *****KP4: Kisspeptin 4: Final oosit matürasyonu amacıyla yapılan Trigger öncesinde ölçülen plazma Kisspeptin düzeyi

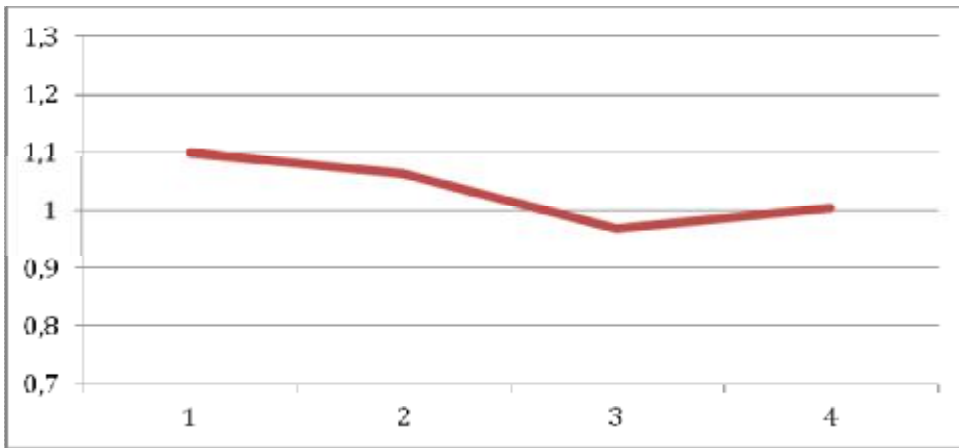
Çalışmaya dahil olan PKOS’lu olmayan 20 olgunun plazma Kisspeptin düzeyindeki değişim Tablo 5’de ve Şekil 3’de değerlendirilmiştir. Buna göre Kisspeptin 2 ve 3 arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. (1.06 0.28 ve 0.97 0.21; $p<0.05$) Aynı şekilde Kisspeptin 3 ve 4 arasındaki değişimde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (0.97 0.21 ve 1.00 0.14; $p<0.05$)



Şekil 1. KOS siklusu sırasında Kisspeptin düzeyindeki değişimin izlenmesi



Şekil 2. PKOS'lu olgularda KOS sırasında Kisspeptin düzeyindeki değişim



Şekil 3. PKOS'lu olmayan olgularda KOS sırasında kisspeptin düzeyindeki değişim

Tablo 6. Hastaların Plazma Hormon Değerleri ile Toplam Elde Edilen Oosit Sayısının İlişkisinin İncelenmesi

Değişkenler	Oosit Sayısı	
	r *	p**
FSH(mlU/mL)***	-0.55	0.03
LH(mlU/mL)****	0.26	0.18
Kisspeptin 1(ng/mL)*****	-0.24	0.21
Kisspeptin 4(ng/mL)*****	-0.46	0.01

*r: Pearson Korelasyon testi, **p:<0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi, ***FSH: Bazal Folikül Stimüle Edici Hormon, ****LH:Bazal Luteinizan Hormon, *****Kisspeptin 1: Bazal plazma Kisspeptin düzeyi,*****Kisspeptin 4: Final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme öncesinde bakılan plazma Kisspeptin düzeyi

KOS sonucunda elde edilen toplam oosit sayısı ile bazal plazma FSH düzeyi ve final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmadan önce bakılan plazma Kisspeptin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlendi, p değeri sırası ile 0.03 ve 0.01 olarak hesaplandı. (Tablo 6)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, KOS siklusları sırasında erken LH pikinin önlenmesi amacıyla yapılan GnRH Antagonistlerinin uygulamadan 48 saat sonra plazma Kisspeptin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olduğunu izledik. (P=0.001) (Tablo 1) Yaptığımız literatür incelemesinde GnRH Antagonist uygulanmasının plazma Kisspeptin düzeyi üzerine olan etkisinin incelendiği tek çalışma, GnRH Antagonistleri ile Kisspeptin arasında ki ilişkinin gösterildiği ilk klinik çalışmadır. Yapılmış olan çalışmalarda Kisspeptin'in hipotalamo-pituiter-gonadal (HPG) aks üzerinde stimulator etkilerinin olduğu gösterilmiştir. (5) Kisspeptin'in direkt olarak GnRH nöronları üzerinde bulunan Kisspeptin reseptörleri ile etkileşime girerek portal dolaşıma GnRH salınımının yapılmasına neden olduğu ve bu yolla ön hipofizden LH ve FSH salınımına yol açtıkları bilinmektedir. (112) Kisspeptin ile gonadotropinler arasındaki bu ilişki ilk olarak 2005 yılında sağlıklı erkeklere yapılan Kisspeptin-54 infüzyonu sonrasında LH ve FSH'da izlenen anlamlı artış ile gösterilmiştir. (109) Kisspeptin'in GnRH üzerindeki rolü Kisspeptin antagonistleri ile yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. Roseweir ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel hayvan çalışmasında median eminence enjekte edilen Kisspeptin antagonisti sonrasında GnRH pulsatilitesinin kaybolduğu izlenmiştir. (131) Yapılmış olan deneysel hayvan çalışmalarda GnRH antagonist uygulanması sonrasında yapılan Kisspeptin infüzyonu ile LH düzeyinde değişim olmadığı gözlenmiştir. (4)

2012 yılında Polat ve arkadaşlarının GnRH Antagonist uygulaması sırasında Estradiol seviyelerini inceledikleri çalışmalarında, uygulama sonrasında elde edilen matür oosit sayısının arttığını ve bununla birlikte Estradiol düzeyinde artış izlendiğini göstermişlerdir. (171) Menstrüel siklus sırasında meydana gelen GnRH ve LH düzeylerindeki değişimden Estradiolün negatif ve pozitif feed-back etkisinin sorumlu olduğu bilinmektedir. (5) Ancak GnRH nöronları üzerinde estrogen reseptörü bulunmayışı estrogenlerin bu etkiyi göstermesi için GnRH ile gonadotropinler arasında başka bir hormonal sistemin olduğunu düşündürmektedir. (5) Bu hormonal sistem Kisspeptin-Neurokinin B- Dynorphin (KNDy) yolağıdır.(5) GnRH Antagonist

uygulanmaya başlanmasından 48 saat sonra bakılan plazma Kisspeptin düzeyinde anlamlı bir düşüş izlenmiş olmasına karşın, uygulamaya devam edildiğinde final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmadan önce bakılan plazma Kisspeptin düzeyinin ise önceki değere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği izlenmiştir. (P=0.001)(Tablo 1) Buradan yola çıkarak GnRH Antagonist uygulamasından 48 saat sonra düşen LH düzeyinin, artan oosit boyutlarına bağlı olarak LH düzeyinin Estrogenin pozitif feed back etki mekanizmasının hakim olması ile tekrar yükselmesi sonucunda geliştiği düşüncesindeyiz. Bu durum Estrogenin LH üzerindeki pozitif feed back etkisinin ortaya çıkmasında önemli olan aracı Kisspeptin düzeyinin yükselişini açıklamaktadır.

Kisspeptinin, hipotalamo-hipofizer gonadal aks'da düzenleyici olarak rol aldığı bilinmektedir. (168-170) Özellikle GnRH indüksiyonuna bağlı LH salınımının Kisspeptin ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. PKOS'lu hastalarda artmış LH salınımı olduğundan, bu hastalarda Kisspeptin düzeylerinin normoovulatar kadınlara göre daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür. (170) Çalışmamızda PKOS'lu olan olgularda bazal plazma Kisspeptin düzeyi ortalaması 0.92 ± 0.89 , PKOS'lu olmayan grupta 1.09 ± 0.34 olarak hesaplandı. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız olarak değerlendirildi. Çalışma sırasında KOS'a başlandıktan sonra plazma Kisspeptin düzeyinde düşüş izlenmekte, GnRH Antagonist uygulanmasından sonra bu düşüş daha ciddi bir hal almakta ve GnRH Antagonist uygulanmasından 48 saat sonra ovulasyon tetiklemesi yapılan döneme kadar plazma Kisspeptin düzeyinde yükselme olmaktadır. (Şekil 1) Olguları PKOS'lu ve PKOS'lu olmayanlar olarak gruplandırdığımızda PKOS'lu olmayan grupta plazma Kisspeptin düzeyindeki değişimin aynı şekilde olduğu izlenmekte olup (Şekil 3), PKOS'lu olan grupta farklı olarak KOS'a başlanmasını takiben plazma Kisspeptin düzeyinde artış izlenmektedir.(Şekil 2) Ancak her iki grupta da GnRH Antagonist uygulaması ile birlikte plazma Kisspeptin düzeyinde düşüş izlenmekte ve bu iki grup içinde istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmektedir. (Tablo 4 ve 5) KOS siklusuna başlandıktan sonra Kisspeptin düzeyindeki değişimin iki grup arasında farklı olması dikkat çekici bir bulgu olmasına karşın, bunun nedenlerinin ortaya

konulması amacıyla Estrogen ve LH düzeylerindeki değişiminde dahil edildiği prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kontrollü ovaryan stimülasyon siklusları sonucunda elde edilen toplam oosit sayısı ile plazma Kisspeptin düzeyi arasında ilişkinin değerlendirilmesinde toplam oosit sayısı ile bazal Kisspeptin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamazken ($p=0.21$), ovulasyon tetiklemesinden hemen önce bakılan Kisspeptin düzeyi ile toplam oosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki izlendi. ($r=-0.46$, $p<0.01$) (Tablo 6) Bu ilişki dikkat çekici olmakla birlikte, bunun nedenlerinin araştırılması amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ

Kontrollü ovaryan stimülasyon sikluslarında GnRH Antagonist uygulanması ile Kisspeptin düzeyinde düşüş olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. (p=0.001)

GnRH Antagonist uygulanmasından 48 saat sonra bakılan Kisspeptin düzeyi ile final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmasından önce bakılan Kisspeptin düzeyi arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. (p=0.001)

KOS siklusu sonucunda elde edilen oosit sayısı ile final oosit matürasyonu amacıyla tetikleme yapılmasından önce bakılan Kisspeptin düzeyi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. (r=-0.46, p=0.01)

7.KAYNAKLAR

- 1.Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 2006;90(5):60-66.
- 2.Hameed S, Jayasena C. N, Dhillon W. Kisspeptin and fertility. *Journal of Endocrinology*. 2011;208(3):97-105
3. Kafa İM, Eyigör Ö. Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011;37(1):53-60.
4. Jayasena C. N, Cominos A. N, Nijher G, Abbara A, De Silva A, Veldhuis J, Ratnasabapathy R ve ark. Twice-Daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(11):4464-4474
5. Skorupskaitė K, George J, Anderson R. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update*. 2014; 20(4): 485-500
6. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML ve ark. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(3): 3920-3929.

7. Novaira HJ, Ng Y, Wolfe A, Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 311(22):126-134.

8. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, ve ark. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J. Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(4):3958-3966

9. Gottsch ML, Cunningham Mj, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK ve ark. A role for kisspeptin in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004;145: 4073-4077

10. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Neuroendocrinology*. 2004; 16(2): 850-858

11. Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey: A finding with therapeutic implications. *Endocrinology*. 2006; 147: 2122-2126

12. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:2129-2134
13. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(6):10972-10976.
14. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'rahilly S, Aparicio SA. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 1849-1855
15. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KISS-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 2006; 18(3): 298-303
16. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signalling. *Reproduction*. 2006; 131(11); 623-630
17. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Human Reproduction*. 1998;13(9):2411-2414

18. Felberbaum RE, Reissmann T, Kuper W, Bauer O, al Hasani S, Diedrich C. Preserved pituitary response under ovarian stimulation with hMG and GnRH-antagonists(Cetrorelix) in women with tubal infertility. Euro J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1995;61(2):151-155
19. Al- Inany H, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted conception. Cochrane Database Syst Rev. 2006;3: CD001750
20. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and Trends. Fertil Steril 1991; 56:192-7.
21. The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine.Diagnostic evaluation of the infertile woman: a committee opinion. Fertility and Sterility. 2012;98(5):1103-1111
22. Letoon J, Parazzini F. A controlled study between the use of gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization and embriyo transfer in the management of idiopathic and male infertility. Fertil Steril 1987; 48:3,605-9.
23. Testart J, Plachot M. World Colloborative report on IVF-ET and GİFT:1989 results. Hum Reprod 19 1992; 72:2, 362-7.
24. Gürbüz R. İnfertilite ile ilgili kavramlar ve infertilite sebepleri. Bölüm 2. Erkek İnfertilitesi (Yaklaşım ve tedavi) Nobel Kitabevi, İstanbul. 1994; 23-5.
25. Sigman M. Assisted Reproductive tecnics and Male İnfertility. The Urologic Clinics of North America 1994; 21:3,505-15.
26. Leon S, Marc AF, Lipincott W. Clinical Gynecologic Endocrinology and

Infertility, Seventh Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, 2005;1215-74.

27. Tıraş MB, Aybar F. *İn vitro* Fertilizasyon (ivf)-intrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (icsi) Endikasyonları. *Turkiye Klinikleri, J Surg Med Sci* 2006; 2(5):37-41.

28. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.

29. Schlegel PN, Girardi SK. *In vitro* fertilization for male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82(3): 709-716.

30. Malter HE, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO, 2002; 126-33.

31. De Vos A, Van Steirteghem A. Gamete and embryo manipulation. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania:Elsevier Inc., 5th ed, 2004; 875-98.

32. Ben-Rafael Z, Levy T, Schoemaker J. Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance. *Fertil Steril* 1998; 69: 40-49.

33. Boime I, Ben-Menahem D, and Olijve W. Studies of recombinant gonadotropins: Intersection of basic science and therapeutics. in: Fauser P.CJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van Steirteghem A. *Molecular Biology in Reproductive Medicine*. Parthenon Publishing, London 1999, pp 147-164.

34. Van Santbrink EJP, Fauser BCJM. Urinary Follicle Stimulating Hormone for Normogonadotropic Clomiphene-Resistant Anovulatory Infertility: Prospective, Randomized Comparison between Low Dose Step-Up and Step-Down Dose Regimens. *Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3597-3601.

35. Loumaye E, Campbell R, Salat-Boroux J. Human follicle-stimulating hormone produced by recombinant DNA technology: a review for clinicians. *Hum reprod.* 1995; 1: 188-199.
36. Özgüven T. Üreme Fizyolojisi. Çiçek M. N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 2. Baskı.* Ankara: Güneş Kitabevi; 2006. s.101-10
37. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting.* Geneva: WHO, 2002;102-25.
38. Fedorcsak P, Dale PO, Storeng R. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 2001; 16(6): 1086- 91.
39. Burgues S. Spanish Collaborative Group on Female Hypogonadotropic Hypogonadism. The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I unovulation: evidence from a multicentre study in Spain. *Human Reproduction* 2001; 16(12):2525-32.
40. Loh S, Wang JX, Mathews CD. The influence of body mass index, basal FSH and age on the response to gonadotrophin stimulation in non-polycystic ovarian syndrome patients. *Human Reproduction* 2002; 17(5): 1207-11.
41. Lashen H, Ledger W, Bernal AL. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1999; 14:712-5.
42. Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Human Reproduction Update* 2000; 6(2): 122-31.
43. Teresa Wiesak Shore Institute for Reproductive Medicine, Brick, NS, USA. Role of LH in controlled ovarian stimulation. *Reproductive Biology* 2002; 2(3).215-27

44. Hillier SG. The Parkes's Lecture Controlled Ovarian Stimulation in Women. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 120: 201-210.
45. Sengoku K, Tamate K, Takaoka Y, et al. The clinical efficacy of low-dose step up follicle stimulating hormone administration for treatment of unexplained infertility. *Hum Reprod* 1999; 14:349-353.
46. Whelan III JG, Vlahos NK: The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 883-896
47. Andoh K, Mizunuma H, Liu X, et al. A comparative study of fixed-dose, stepdown, and low dose step-up regimens of human menopausal gonadotropin for patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998; 70: 840-846.
48. Sagle MA, Hamilton-Fairley D, Kiddy DS, Franks S. A Comparative, randomized study of low-dose human menopausal gonadotropin and follicle stimulating hormone in woman with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1991; 55: 56-60.
49. Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Watson H, Saale M, and Franks S. Low-dose gonadotrophin therapy for induction of ovulation in 100 women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1991; 6:1095-1099.
50. Polson DW, Mason HD, Saldanha MBY, and Franks S. Ovulation of a single dominant follicle during treatment with low-dose pulsatile follicle stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1987; 26: 205-212.
51. Polson DW, Mason HD, Kiddy DS. Low-dose follicle-stimulating hormone in the treatment of polycystic ovary syndrome: a comparison of pulsatile subcutaneous with daily intramuscular therapy. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 746-748.
52. Buvat J, Buvat-Herbaut M, Marcolin G. et al. Purified follicle-stimulating hormone in polycystic ovary syndrome: slow administration is safer and

more effective. *Fertil Steril* 1989;52:553-559.

53. Mizunuma H, Takagi T, Yamada K, et al. Ovulation induction by step-down administration of purified urinary follicle-stimulating hormone in patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 1991; 55: 1195-1196.

54. Schipper I, Hop WCJ, Fauser BCJM. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold-window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle duration rather than magnitude of FSH increase affects follicle development. *Clin Endocrinol Meta* 13. 1997; 83:1292- 1298.

55. Hugues JN, Durnerin IC. Revisiting gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotrophins. *Human Reproduction Update* 1998; 4(1): 83-101.

56. Fitzgerald PA. Hypothalamic and pituitary hormones. In Katzung BG (ed), *Basic and clinical pharmacology*. California: McGraw-Hill, 8th ed, 2001, pp 625-643

57. Daya S, Follicle –stimulating hormone and human menouposal gonadotropin for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst rev* .CD000061,2000.

58. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Ferlini F, Perri T, Parmegianin L, Comparison of controlled ovarian stimulation with human menouposal gonadotropin or recombinant follicle-stimulating hormone *Fertil Steril* 2003;80:390.

59. Fanchin R, Righini C, Ayoubi JM, Olivennes F, de Ziegler D, Frydman R, New look at endometrial echogenicity: objective computer assisted measurements predict endometrial reseptivity in in vitro fertilization –embryo transfer, *Fertil Steri* 2000;74,274

60. Barbieri RL, Hornstein MD. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), Reproductive endocrinology. Pennsylvania: Elsevier Inc., 5th ed, 2004, pp 839-873
61. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. Geneva: WHO, 2002, pp 102-125.
62. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Human Reproduction* 2002; 17(9): 2287-2299.
63. Karacan M, Erkan H, Karabulut O, Sarikamis B, Camlibel T, Benhabib M. Clinical pregnancy rates in an IVF program. Use of the flare up protocol after failure with long regimens of GnRH-a. *J Reprod Med* 2001;46:485.
64. Land JA, Yarmolinskaya MI, Dumoulin JC, Evers JL. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 65;961:1996.
65. Homburg R, Levy T, Ben-Rafael ZA. Comparative prospective study of conventional regimen with chronic low-dose administration of follicle-stimulating hormone for anovulation associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*;1991; 63: 729- 732.
66. Thatcher SS, Jones E, DeCherney AH. Ovarian cysts decrease the success of controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989;52:812.
67. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation, *Hum Reprod Update* 2002;8:279.
68. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproduction technologies compared to the long protocol, Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:175.
69. Fitzgerald PA. Hypothalamic and pituitary hormones. In Katzung BG (ed), *Basic*

and clinical pharmacology. California: McGraw-Hill, 8th ed, 2001, pp 625-643.

70. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. *Human Reproduction Update* 2000; 6(4):322-331.

71. Teresa Wiesak Shore Institute for Reproductive Medicine, Brick, NS, USA. Role of LH in controlled ovarian stimulation. *Reproductive Biology* 2002; 2(3):215-227.

72. Al-Inany H, Aboulgar M, GnRH antagonists in assisted reproduction: a Cochrane review *Hum Reprod* 2002;17:874.

73. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. *Human Reproduction Update* 2000; 6(4):322-331.

74. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, et al. The use of GnRH antagonists in ovarian hyperstimulation. *Human reproduction Update* 2002; 8(3):279-290.

75. Griesinger G, Felferbaum R, Diedrich K. GnRH antagonists in ovarian hyperstimulation: a treatment regimen of clinician's second choice? Data from the German national IVF registry. *Human Reproduction* 2005; 20(9):2373-2375.

76. Ron-El R, Lazrel A, Schachter M, et al. Induction of ovulation after GnRH antagonists. *Human Reproduction Update* 2000; 6(4):318-321.

77. Olivennes F, Alvarez J, Bouchard P, et al. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Human Reproduction* 1998; 13(9): 2411-2414.

78. Olivennes F, Belcisch-Allart J, Empeire JC, et al. Prospective, randomised, controlled study of in-vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) antagonist (Cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (Triptorelin). *Fertility and Sterility* 2000; 73(2):314-320.

79. The European Recombinant Human Chorionic Gonadotrophin Study Group. Induction of final follicular maturation and early luteinization in women undergoing

ovulation induction for assisted reproduction treatment-recombinant HCG versus urinary HCG. *Human Reproduction* 2000;15(7): 1446-51.

80. Driscoll GL, Tyler JPP, Hangan JT. A prospective, randomised, controlled, doubleblind, double- dummig comparison of recombinant and urinary HCG for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Human Reproduction* 2000; 15(6): 1305-1310.

81. Ron-El R, Lazrel A, Schachter M. Induction of ovulation after GnRH antagonists. *Human Reproduction Update* 2000; 6(4):318-21.

82. Hskowitz-Eldor J, Kol S, Mannaerts B. Use of a single bolus of GNRH agonist triptorelin to trigger ovulation after GNRH antagonist ganirelix treatment in women undergoing ovarian stimulation for assisted reproduction, with special reference to the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: preliminary report. *Human Reproduction* 2000; 15(9): 1965-8.

83. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a metaanalysis of the randomized trials. *Human Reproduction*. 2002; 17:2287.

84. Daya S, Gunby J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrone Database of Systematic Reviews* 2004;3-25.

85. Forman R, Fries N, Testart J, Belaisch-Allart J, Hazout A, Frydman R. Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentration on embryo implantation. *Fertil Steril* 1988; 49:118- 22.

86. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation. *Hum Reprod* 2004; 19:1176-80.

87. Phelps JY, Levine AS, Hickmany TN. Day 4 estradiol levels predict pregnancy success in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Fertility and Sterility* 1998; 69(6): 1015-9.

88. Kahraman S, Yakın K. Ovülasyon indüksiyonu. *İstanbul Memorial Hastanesi*

Yardımcı Üreme Teknikleri ve Reprodüktif Endokrinoloji Merkezi, 2000.

89. Dickey RP, Holtkamp DE. Development, pharmacology and clinical experience with clomiphene citrate. *Human Reproduction Update* 1996; 2(6):483-506.

90. West A, Vojta Pj, Welch DR, Weisman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998;1: 145-148.

91. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden KM, Le Poul E, Brezillon S. The metastasis suppressor gene KISS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 37: 34631-34636.

92. Kafa M, Eyigör Ö. Kisspeptinler ve Kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; 37: 53-60.

93. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;6837:613–617.

94. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999;1:103–107

95. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 31:28969–28975.

96. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;6837:613–617.

97. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: an historical

perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 2009;1:4 – 9.

98. Liu X, Lee K, Herbison AE. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 2008;9:4605–4614

99. Constantin S, Caligioni CS, Stojilkovic S, Wray S. Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology* 2009;3:1400–1412.

100. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;7:2744 – 2750.

101. . Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 2010;11:1984–1998.

102. . Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006;12:5817–5825.

103. Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 2006;2:804 – 810. Quigley ME, Yen SS. The role of endogenous opiates in LH secretion during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;1:179–181.

104. Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 2008;9:4387 – 4395.

105. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J*

Neuroendocrinol 2009;8:673 – 682.

106. . Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 2008;11:5770 – 5782

107. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 2005;3:372 – 386.

108. . Ciofi P, Leroy D, Tramu G. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 2006;4:1731 – 1745.

109. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 12:6609 – 6615.

110. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;10:3958–3966.

111. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, Newton CL, Faccenda E, Millar RP, Anderson RA. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;8:E1228–E1236.

112. George JT, Anderson RA, Millar RP. Kisspeptin-10 stimulation of gonadotrophin secretion in women is modulated by sex steroid feedback. *Hum Reprod* 2012; 12:3552 – 3559.

113. Jayasena CN, Nijher GM, Cominos AN, Abbara A, Januszewski A, Vaal ML,

Sriskandarajah L, Murphy KG, Farzad Z, Ghatei MA et al. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;12:E1963–E1972.

114. Chan YM, Butler JP, Pinnell NE, Pralong FP, Crowley WF Jr, Ren C, Chan KK, Seminara SB. Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;6:E908–E915.

115. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005; 49:11349–11356.

116. Zhang C, Roepke TA, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *J Neurosci* 2008;17:4423 – 4434.

117. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320(2): 383-8.

118. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 6:713 – 743.

119. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;5:1761–1766.

120. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;37:34631–34636.

121. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P et al. Characterization of the

potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005;1:156–163.

122. Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM, Castano JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 2007;7:521–530.

123. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 3:381 – 393.

124. Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 2008;4:1951–1959.

125. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008;7:709 – 715.

126. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;5:2276–2280.

127. Jayasena CN, Cominos A, Nijher G, Abbara A, De Silva A, Veldhuis J, Ratnasabapathy R, Izzi-Engbeaya C, Lim A, Patel D et al. Twice-daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2013b;11:4464–4474.

128. Rometo AM, Rance NE. Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J Neuroendocrinol* 2008;12:1376 – 1381.

129. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr*

Rev 2009; 6:713 – 743.

130. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010;8:3479–3489.

131. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 2009;12:3920–3929.

132. Sandoval-Guzman T, Stalcup ST, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Effects of ovariectomy on the neuroendocrine axes regulating reproduction and energy balance in young cynomolgus macaques. *J Neuroendocrinol* 2004;2:146–153.

133. Abbara A, Jayasena CN, Nijher GK, Comninou AN, Christopoulos G, Ashby D, Ghatei MA, Bloom SR, Carby A, Trew G et al. Kisspeptin—a novel physiological trigger for oocyte maturation in IVF treatment. *Hum Reprod* 2013; Supplement 1; European Society of Human Reproduction and Embryology 29th Annual Meeting, London, Abstract O-107.

134. Jayasena CN, Comninou A, Nijher G, Abbara A, De Silva A, Veldhuis J, Ratnasabapathy R, Izzi-Engbeaya C, Lim A, Patel D et al. Twice-daily subcutaneous injection of kisspeptin-54 does not abolish menstrual cyclicity in healthy female volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2013b;11:4464–4474.

135. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 2005;10:4431–4436.

136. Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007;11:5258 – 5267.

137. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008; 35:8691 – 8697.
138. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010;2:722 – 730.
139. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349:1614-27.
140. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10714-9.
141. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. Kiss1 $-/-$ mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54 $-/-$ mice. *Endocrinology* 2007; 148: 1927-36.
142. Chan YM, Broder-Fingert S, Wong KM, Seminara SB. Kisspeptin/Gpr54-independent gonadotrophin-releasing hormone activity in Kiss1 and Gpr54 mutant mice. *J Neuroendocrinol* 2009;21:1015-23.
143. Rhie YJ, Lee KH, Eun SH, Choi BM, Chae HW, Kwon AR, Lee WJ, Kim JH, Kim HS. Serum kisspeptin levels in Korean girls with central precocious puberty. *J Korean Med Sci* 2011;26:927-31.
144. Demirbilek H, Gonc EN, Ozon A, Alikasifoglu A, Kandemir N. Evaluation of serum kisspeptin levels in girls in the diagnosis of central precocious puberty and in

the as- sessment of pubertal suppression. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:313-6.

145. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knofler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 8):1319-28.

146. Roseweir AK, Katz AA, Millar RP. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feed- back loop in HTR8SVneo cells. *Placenta* 2012;33:408-15.

147. Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, Fujino M. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:914-9.

148. Clarke H, Dhillon W, Jayasena C. Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders. *Endocrinology and metabolism* 2015; 30: 124-141.

149. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility de- fect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-20.

150. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cas- suto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obe- sity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.

151. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004;351:987-97.

152. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casan- ueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena- Sempere M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restora- tion of pubertal

activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005;146:3917-25.

153. Donato J Jr, Cravo RM, Frazao R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S Jr, Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest* 2011;121:355-68.

154. Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 2010;151:2233-43.

155. Backholer K, Smith J, Clarke IJ. Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the pre-optic area of the ewe. *Endocrinology* 2009;150:5488-97.

156. Kinsey-Jones JS, Li XF, Knox AM, Wilkinson ES, Zhu XL, Chaudhary AA, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2009;21:20-9.

157. Knox AM, Li XF, Kinsey-Jones JS, Wilkinson ES, Wu XQ, Cheng YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2009;21:683-9.

158. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Niki H, Kato T, Kuwahara A, Uemura H, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats. *Horm Behav* 2014;66:309-16.

159. Ramaswamy S, Gibbs RB, Plant TM. Studies of the localization of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of

kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. *J Neuroendocrinol* 2009;21:795-804.

160. Jayasena CN, Comninou AN, Narayanaswamy S, Bhalla S, Abbara A, Ganiyu-Dada Z, Busbridge M, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS. Acute and chronic effects of kisspeptin-54 administration on GH, prolactin and TSH secretion in healthy women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014;81:891-8.

161. Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, Franci CR, Grattan DR, Szawka RE. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology* 2014;155:1010-20.

162. Jayasena CN, Abbara A, Comninou AN, Nijher GM, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, Sridharan M, Mason AJ, Warwick J, Ashby D, Ghatei MA, Bloom SR, Carby A, Trew GH, Dhillon WS. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *J Clin Invest* 2014;124:3667-77.

163. Abbara A, Jayasena CN, Nijher GK, Comninou AN, Christopoulos G, Ashby D, Ghatei MA, Bloom SR, Carby A, Trew G et al. Kisspeptin—a novel physiological trigger for oocyte maturation in IVF treatment. *Hum Reprod* 2013; Supplement 1; European Society of Human Reproduction and Embryology 29th Annual Meeting, London, Abstract O-107.

164. Young J, George JT, Tello JA, Francou B, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Brailly-Tabard S, Anderson RA, Millar RP. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology* 2013;2:193–202.

165. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005;4:1689–1697.

166. Tovar S, Vazquez MJ, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Vigo E, Roa J, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L et al. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 2006;6:2696 – 2704.
167. Latif R, Rafique N. Serum kisspeptin levels across different phases of the menstrual cycle and their correlation with serum oestradiol. *The Netherlands Journal of Medicine* 2015; 73(4): 175-8.
168. Panidis D, Rousso D, Koliakos G. Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85(6):1-5.
169. Brown RE, Wilkinson DA, Imran SA, Caraty A, Wilkinson M. Hypothalamic Kiss 1 RNA and Kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary. *Brain Res.* 2012; 1467: 1-9.
170. Witchel SF, Tena-Sempere M. The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: Lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril* 2013;100(1): 12-22.
171. Polat İ, Hasbajrami A, Yıldırım G, Ülker V, Bakır V, Alıkş İ, Tekirdağ A. İnfertil hastalarda Gonadotropin ile ovulasyon indüksiyon protokolüne, Gonadotropin releasing hormone antagonist, ilavesinin etkileri. *JOPP Derg* 2012;4(1): 1-9.