

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**FARKLI KONTROLLÜ OVERYAN HİPERSTİMULASYON
PROTOKOLLERİNİN FOLLİKÜLOGENEZDE ROL OYNAYAN
FOLLİKÜLER SIVI MARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Ayşenur KAYA KAHVECİ

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Cem S. ATABEKOĞLU**

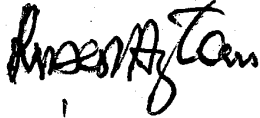
**ANKARA
2010**

KABUL VE ONAY

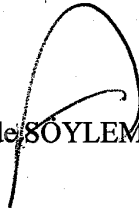
TEZ DEĞERLENDİRME JÜRİSİ RAPORU

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Ayşenur KAYA'nın tezi ile ilgili " Tez Değerlendirme Jürisi " raporu:

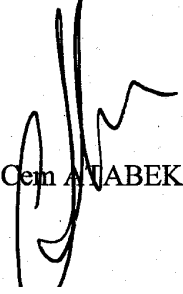
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının 08.11.2010 tarih ve B.30.2.ANK.0.20.71.01.900 / 25857 sayılı yazısı üzerine, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Dr.Ayşenur KAYA'nın "*Farklı kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokollerinin folikülogenezde rol oynayan foliküler sıvı markırlarına etkisi.*" konulu tezin sözlü savunması 11/11/2010 tarihinde öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine açık bir toplantıda gerçekleştirilmiştir. Prof.Dr.Ruşen AYTAÇ, Prof.Dr.Feride SÖYLLEMEZ ve Doç.Dr.Cem ATABEKOĞLU'ndan oluşan Tez Değerlendirme Jürisi anılan toplantıyı takiben bir araya gelmiş ve adayın tezini incelemiştir. Tezin kabul edilmesine oybirliği ile karar verilmiştir.



Prof.Dr.Ruşen AYTAÇ



Prof.Dr.Feride SÖYLLEMEZ



Doç.Dr.Cem ATABEKOĞLU

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince bana emek veren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer tüm öğretim üyelerine sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarımdaki destek ve ilgilerinden dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Sağlığı Araştırma ve Uygulama Merkezinin tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamın şekillenmesinde ve her aşamasında desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Cem S. Atabekoğlu'na saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ayşenur KAYA KAHVECİ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Follikülogenez	3
2.2. Follikülogenezde Rol Oynayan Folliküler Sıvı Markırları.....	8
2.2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF'ler).....	9
2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	12
2.2.3. Antimülleryan Hormon (AMH).....	14
2.2.4. İnhibin-B.....	17
2.3. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon (KOH).....	18
2.3.1. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonistleri (GnRHa) ile Yapılan KOH Protokolleri	19
2.3.2. GnRH Antagonist (GnRHant) Eklenerek Yapılan Ekzojen Gonadotropin Protokolleri.....	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Hasta Seçimi, Bilgilendirilmiş Onam, Etik Kurul Onayı	25
3.2. KOH Protokolü, Oosit Toplanması ve Kültürü	26
3.3. Follikül Sıvısı Toplanması ve Saklanması.....	27
3.4. İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI), Embriyo Transferi ve Luteal Destek	27
3.5. Folliküler Sıvı Markırlarının Analizi	29
3.6. İstatistik Değerlendirme.....	29
4. BULGULAR.....	31

4.1. Uzun GnRH Agonist Protokol ile Esnek Multiple Doz GnRH Antagonist Protokol Uygulanan Grupların İstatiksel Karşılaştırmaları.....	31
4.2. Subgrupların İstatiksel Karşılaştırmaları	36
4.2.1. Uzun GnRH Agonist Protokolü Uygulanan Subgrupların İstatiksel Karşılaştırmaları	36
4.2.2. Esnek Multiple Doz GnRH Antagonist Protokolü Uygulanan Subgrupların İstatiksel Karşılaştırmaları.....	42
4.3. Folliküler Sıvı Markırları ile Siklus Sonuçları Arasındaki İlişkilerin İstatiksel Analizleri	47
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR.....	69
ÖZET.....	72
<i>SUMMARY</i>	74
KAYNAKLAR	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMH:	Antimülleryan hormon
βhCG :	Beta-insan koryonik gonodotropini
ET:	Embriyo transferi
ELISA:	Enzim bağılı immün yöntem (Enzim Linked Immuno Sorbent Assay)
E2:	Östradiol
FSH:	Folikül stimule edici hormon
GnRH:	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GnRH _a :	Gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti
GnRH _{ant} :	Gonadotropin salgılatıcı hormon antagonisti
hMG:	İnsan menopozal gonadotropini
hpFSH:	Yüksek saflıkta follikül stimule edici hormon
ICSI:	İntrastoplazmik sperm injeksiyonu
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP:	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini
IRMA:	İmmunoradyometrik yöntem (Immunoradiometric Assay)
IVF:	İnvitro fertilizasyon
KOH:	Kontrollü overyan hiperstimulasyon
LH:	Luteinize edici hormon
mRNA:	Mesajcı ribonükleik asit
MII:	Metafaz II
ng:	Nanogram
OPU:	Oosit toplama işlemi (oosit pick up)
OHSS:	Overyan hiperstimulasyon sendromu
pg:	Pikogram
PCOS:	Polikistik over sendromu
PN:	Pronukleus
rFSH:	Rekombinant follikül stimule edici hormon
Rmp:	Dakikadaki dönüş sayısı
r:	Korelasyon katsayısı
SSPS:	Sosyal bilimler için istatistik paketi
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ :	Vücut kitle indeksi
YÜT:	Yardımcı Üreme Teknikleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Folikülogenez sürecinin kronolojisi.....	4
Şekil 2.2.	Foliküler yaşam siklusunda başlangıç ve siklik recruitment.....	6
Şekil 2.3.	AMH'nin overdeki olası etkileri	16
Şekil 2.4.	GnRH agonisti ile uzun protokol	21
Şekil 2.5.	GnRH agonisti ve ekzojen gonadotropinlerle ardışık olarak yapılan kısa (stop) veya flare protokoller.....	21
Şekil 2.6.	Oral kontraseptif mikrodоз flare up protokolü	22
Şekil 3.1.	Embriyo Sınıflandırması	28

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların demografik özellikleri	32
Tablo 4.2.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların infertilite nedenlerinin dağılımı	32
Tablo 4.3.	Agonist ve antagonist grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler	33
Tablo 4.4.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların hCG günü siklus parametreleri	33
Tablo 4.5.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların embriyolojik siklus sonuçları	34
Tablo 4.6.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları	35
Tablo 4.7.	Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları	36
Tablo 4.8.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki hastaların demografik özellikleri	37
Tablo 4.9.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki infertilite nedenlerinin dağılımı	37
Tablo 4.10.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler	38
Tablo 4.11.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların hCG günü siklus parametreleri	39
Tablo 4.12.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların embriyolojik siklus sonuçları	39
Tablo 4.13.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları	40
Tablo 4.14.	Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları	41

Tablo 4.15.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki hastaların demografik özellikleri.....	42
Tablo 4.16.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki infertilite nedenlerinin dağılımı.....	43
Tablo 4.17.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler.....	43
Tablo 4.18.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların hCG günü siklus parametreleri.....	44
Tablo 4.19.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların embriyolojik siklus sonuçları	45
Tablo 4.20.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları	46
Tablo 4.21.	Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.....	47
Tablo 4.22.	Folliküler sıvı markırları ile siklus sonuçları arasındaki korelasyonlar.....	48
Tablo 4.23.	Klinik gebelik pozitif ve negatif olanlarda foliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.....	49
Tablo 4.24.	Canlı doğum pozitif ve negatif olanlarda foliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.....	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Özellikle geçtiğimiz son 4 dekad boyunca üreme tıbbı alanında önemli gelişmeler meydana gelmiş ve Yardımcı Üreme Teknikleri sayesinde birçok infertil çift çocuk sahibi olabilme şansını yakalayabilmiştir.

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT), overden oositlerin elde edilmesini sağlayan tüm teknikleri içermektedir.¹ İlk kullanılan yöntem olan İn vitro fertilizasyon (IVF) ve 1992'den itibaren uygulanmaya başlanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) günümüzde en sık kullanılan yöntemlerdir.

YÜT uygulanacak hastalarda kontrollü overyan hiperstimulasyon (KOH) ile multiple folliküllerin, bunun sonucunda da çok sayıda oosit ve embriyonun elde edilebilmesi ile YÜT başarısını arttırmak amaçlanmıştır.

Kontrollü overyan hiperstimulasyon (KOH) uygulanan sikluslarda meydana gelebilecek prematür LH salınımını engellemek için GnRH agonist (GnRHa) ve GnRH antagonistleri (GnRHant) yaygın şekilde kullanılmaktadır.^{2, 3} Başlangıçta gonadotropin sekresyonunu uyaran (alevlenme etkisi) GnRH agonistlerinin uzun süreli kullanımı hipofizer gonadotropin reseptörlerinin down regülasyonuna ve desensitizasyonuna neden olur. Dolayısıyla kontrollü overyan hiperstimülasyon sırasındaki artmış östradiol seviyelerinden dolayı meydana gelebilecek prematür LH salınımı engellenmiş olur. GnRH antagonistlerinin de kontrollü overyan hiperstimülasyon sırasındaki prematür LH salınımını engellemede etkili olduğu gösterilmiştir. İlk önce uyaran ama daha sonra inhibe eden uzun etkili agonistlerin tersine, GnRH antagonistleri doz bağımlı olarak GnRH reseptörlerini kompetitif şekilde bloke ederler ve hızlı şekilde hipofizer inhibisyona neden olurlar.

Yapılan çalışmalarda GnRH'nın over, uterus ve plasenta gibi hipofiz bezi dışındaki bazı dokularda da spesifik reseptörlere bağlandığı gösterilmiştir.⁴⁻⁶ GnRH mRNA'sının insan granüloza hücrelerinde ekspresyonunun olması over dokusunda GnRH reseptörlerinin ekspresyonunun olabileceğini göstermektedir.^{5, 7, 8} Ayrıca farklı çalışmalarda GnRH'nın insan granüloza hücrelerinde mitojen aktiflenmiş protein kinazı uyarak otokrin bir faktör gibi davranabildiği gösterilmiştir.^{9, 10}

Dolayısıyla dışardan verdiğimiz GnRH agonist ve antagonistleri hipofiz bezindeki reseptörlerine ek olarak over dokusundaki reseptörleri de etkileyerek overyan parakrin ve otokrin sinyallerde değişikliklere yol açarak folliküler mikroçevreyi ve follikülogenezi etkileyebilirler. Yapılan birçok çalışmada folliküler sıvıya sekrete edilen bazı otokrin ve parakrin faktörlerin (hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler) folliküler mikroçevreyi değiştirerek follikül gelişimini, oosit kalitesini ve ovulasyonu etkilediği bildirilmiştir.¹¹⁻¹⁴

Ayrıca farklı etki mekanizmaları olması nedeniyle GnRH antagonist protokol ile GnRH agonist protokol uygulanan KOH sikluslarında meydana gelen folliküler mikroçevrenin birbirinden farklı olabileceği dolayısıyla agonist ve antagonist sikluslar arasında folliküler büyüme paterninde ve oosit maturasyonunda farklılıklar olabileceği ileri sürülmüştür.¹⁵⁻¹⁷

Bu çalışmada, agonist (Uzun GnRH agonist) veya antagonist (Esnek multiple doz GnRH antagonist) protokol ile kontrollü overyan hiperstimulasyon uygulanan iki farklı hasta grubunda follikülogenezde rol oynayan folliküler sıvı markırlarının (IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF, AMH) follikül sıvısındaki konsantrasyonları saptanıp, farklı stimulasyon protokollerinden nasıl etkilendikleri araştırılacaktır. Ayrıca siklus sonuçları ile aralarında ilişki olup olmadığı da değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Follikülogenez

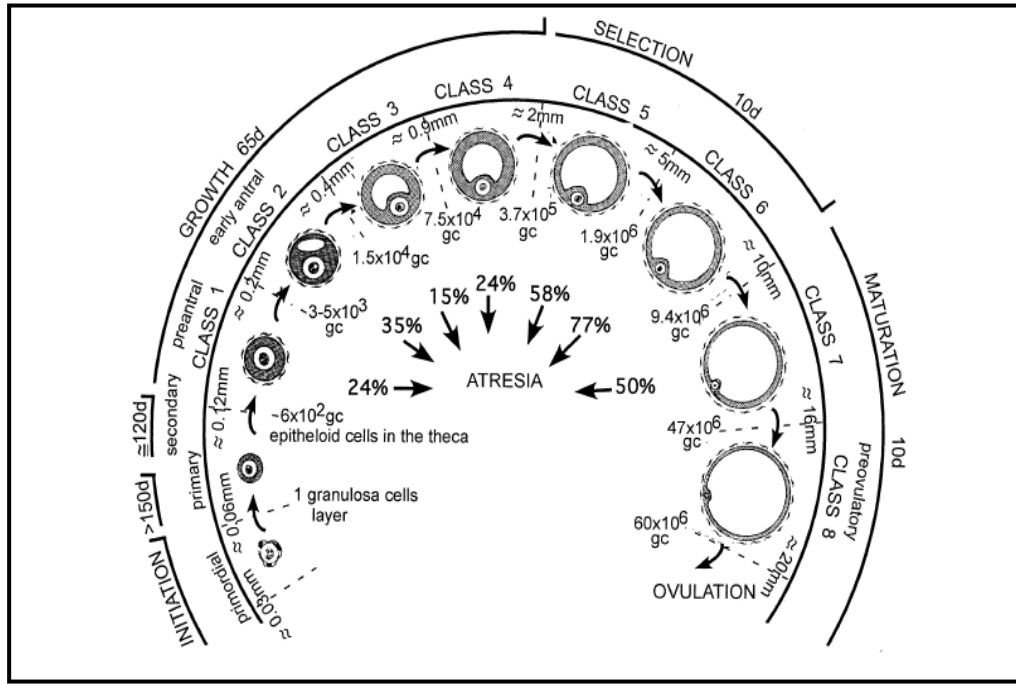
Kadın üreme sisteminin ana organı olan overin başlıca iki fizyolojik görevi vardır. Bunlardan birincisi overyan follikülogenez yani düzenli bir biçimde oosit olgunlaştırma ve olgunlaşan oositin overden salınma işlemi ikincisi ise oositlerin gelişim basamakları sırasında östradiol ve progesteron gibi steroid hormonların sentezlenmesi yani steroidogenezdır.¹⁸

Matür bir follikülün oluşumu için primordial follikül evresinden preovulatar follikül evresine kadar olan birçok basamağın yer aldığı süreç follikülogenez olarak adlandırılır. Amaç matür, fertilize olabilir özelliklerdeki bir oositin gelişmesidir.

Over kendi dinamiği içerisindeki otokrin ve parakrin etkileşimlerin ve hipotalamo-hipofizer sistemin kontrolü ile overyan follikül havuzundan seçilerek dominans kazanacak bir primordial follikülü preantral, antral ve preovulatar yapılaşmalarından geçirerek ovulasyona götürür. Ovule olan her bir follikül için yaklaşık 1000 primordial follikül değişik gelişim basamaklarında atreziye uğrar.¹⁹

Primordial follikül, mayotik profazın diploten aşamasında durdurulmuş oosit ve bunun çevresindeki iç biçimli tek sıralı granüloza hücrelerinden oluşmaktadır²⁰. Herhangi bir siklusta ne kadar ve hangi primordial folliküllerin büyümeye başlayacağını belirleyen mekanizma halen bilinmemektedir ancak lokal otokrin ve parakrin faktörlerin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.²⁰ Follikülün büyüyen follikül havuzuna primordial follikül olarak girişinden folliküler olgunlaşma basamaklarını tamamlayarak ovulasyonun gerçekleşmesine kadar geçen süre yaklaşık 150 gün civarındadır.²¹

Genel kabul gelişimin başlangıç safhasında yani primordial follikülden preantral follikül gelişimine kadar gelişimin gonadotropin stimülasyonundan bağımsız, lokal intraoveryan otokrin ve parakrin faktörler ile gerçekleştiği şeklindedir. Sayıları 300'ü bulan, 0.12 – 0.2 mm çaplı preantral folliküler (sınıf 1-2) büyüyerek önce 0.4 – 0.9 mm (sınıf 3-4) çaplı erken antral, nihayet 2-5 mm çaplı (sınıf 5) antral folliküllere ulaşırlar, (Şekil 2.1).²¹



Şekil 2.1. Follikülogenez sürecinin kronolojisi- Gougeon ve ark.²¹'dan alınmıştır.

Küboidal granüloza hücrelerinin çoğalması (ortalama 15 hücre) ile primordial follikül primer folliküle dönüşmektedir. Granüloza tabakası bazal lamina adını taşıyan membran aracılığı ile stromal hücrelerden ayrılmıştır. Çevredeki stromal hücreler teka interna ve teka eksterna olarak tanımlanan konsantrik tabakalara farklılaşmaktadır. Primer follikülün ovulasyona ilerlemesinin yaklaşık 85 gün aldığına inanılmaktadır.²⁰

Büyüme bir kez başladıktan sonra follikül preantral aşamaya kadar gelişmektedir. Over follikülünün büyümesi sırasında primer folliküldeki granüloza hücreleri de tabakalar halinde çoğalır. Primer oosit genişler ve çevresi oositi granüloza hücrelerinden ayıran zona pellucida membranı ile çevrelenir. 110 – 120 mikrometre çaplı ve çevresinde 600 civarında granüloza hücresi bulunan ve daha ileri gelişme safhasına ulaşan bu folliküle preantral follikül denilmektedir. Folliküller bu safhaları yaklaşık 60 günlük sürede (2 menstrüel siklus) tamamlarlar.

Preantral evreye kadar granüloza hücrelerinde spesifik FSH reseptörleri bulunmamaktadır. Preantral evreye gelen follikül FSH reseptörüne sahip olur ve FSH'nın etkisi ile aromatisasyonu sağlar. FSH östrojen ile birlikte follikülün FSH reseptör içeriğini artırır ve granüloza hücrelerinin proliferasyonunu uyarır.²⁰

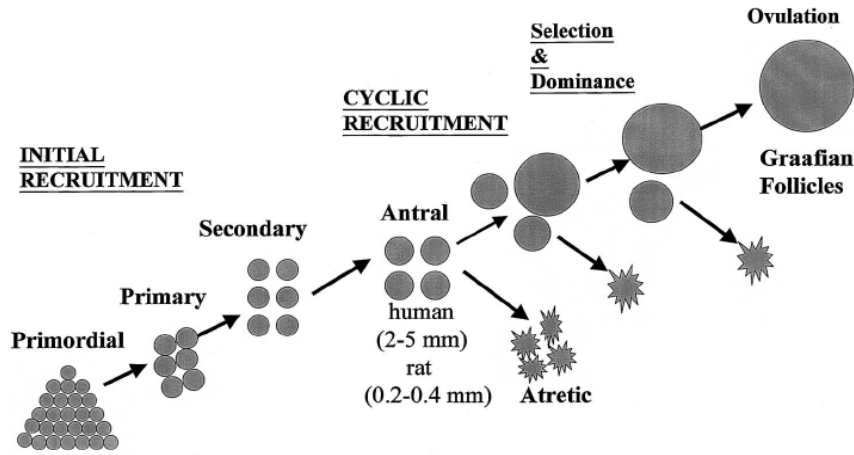
Erken antral döneme ulaşan folliküller gonadotropin uyarısına cevap olarak kolesterolden androjen, östrojen ve progesteron sentezi için gereken tüm enzimleri bünyelerinde bulundurmaktadırlar. Follikülde FSH etkisi ile granüloza hücrelerinden başlıca östrojen ve az miktarda progesteron ve androjen sentezi ve oosit-granüloza bağlantı sahalarının (*gap junction*) oluşumu sağlanır. Bu bağlantı sahaları granüloza hücreleri ile oosit arasındaki beslenmenin ve metabolik değişimlerin olduğu yerlerdir. FSH'nın kendi reseptörüne bağlanması ile adenilat siklaz iletimli uyarının ortaya çıkmasını multiple mRNA'ların sentezi takip eder. Bu da hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu sağlayan enzimleri kodlamaktadır. Böylece FSH hem granüloza hücrelerindeki steroidogenezi hem de hücre proliferasyonunu başlatmış olmaktadır.²² FSH ve östrojen hormonlarının sinerjik etkileriyle granüloza hücre grupları arasında sıvı dolu santral bir kavite oluşur. Antrum olarak da adlandırılan bu kavite granüloza hücrelerini iki ayrı populasyona ayırır. Bunlar folikül çevresi bazal membran civarında bulunan granüloza hücreleri ve oositi çevreleyen kümülüs ooforus granüloza hücreleridir. Granüloza hücrelerindeki çok tabakalı büyüme gelişirken, çevre stroma hücrelerinde de teka tabakalarına gelişim olur. Teka interna tabakası granüloza hücrelerinden bazal lamina ile ayrılan iç tabaka, teka eksterna ise bu tabakanın dışında yerleşen hücreler tabakasıdır. İkinci menstrüel siklusun sonunda (siklusun geç luteal fazında), 3. menstrüel siklusun başında (siklusun erken folliküler fazında) 2-5mm çapa ulaşmış antral folliküllerde büyüme artık gonadotropinlerin etkisi altına girmektedir.²¹

Preantral ve antral foliküllerde, LH reseptörleri sadece teka hücrelerinde, FSH reseptörleri de sadece granüloza hücrelerinde bulunmaktadır. Granüloza hücrelerinde FSH etkisi ile sentezlenecek östrojene zemin hazırlayan maddeler, teka internada LH etkisi ile kolesterolden elde edilen androjenlerdir.

Folliküller östrojen yapımının iki hücre (teka-granüloza) ve iki gonadotropin (LH-FSH) hipotezine göre yürütüldüğü kabul edilmektedir. Bu hipoteze göre LH uyarısı ile teka interna hücrelerinde kolesterolden androstenedion sentezlenir, ancak teka interna aromataz aktivitesinden yoksun olduğundan östrojen sentezi yapamaz. Üretilen androjen bazal membranını geçerek, FSH uyarısı sayesinde komşu granüloza hücrelerinde östrojene çevrilir. Üretilen östrojen (östradiol) önce folliküler sıvıya, takiben de sistemik dolaşıma verilir. FSH ve LH'nın bu etkilerine lokal parakrin ve otokrin maddeler de katkıda bulunur.²⁰

Overde ovulasyona gidecek folliküllerin seçiminin bir önceki menstrüel siklusun geç luteal fazında yapıldığı gösterilmiştir.²¹ Menstrüel siklusun sonuna

doğru korpus luteumun regresyonu sonucu gonadotropin salınımı, progesteronun geribildirim (*feedback*) inhibisyonundan kurtulur ve FSH konsantrasyonları yükselmeye başlar. FSH'ın bu artımı ile preovulatuvar follikül büyümesi de uyarılır. Yeni siklusun folliküler fazının başlangıcından itibaren FSH etkisi ile preovulatuvar follikül büyümesini başlatan ve aynı zamanda antral follikül kohortunun atreziden kurtarılmasını sağlamış olan olaylar zinciri '*recruitment*' olarak adlandırılır (siklik *recruitment*). Gerçekte *recruitment* dinlenme havuzundaki primordial folliküllerin gelişen preantral follikül havuzuna girişi ile başlar (başlangıç *recruitment*), (Şekil 2.2).¹⁸



Şekil 2.2. Folliküler yaşam siklusunda başlangıç ve siklik *recruitment*- McGee ve ark.¹⁸’dan alınmıştır.

Preovulatuvar follikülün büyüme ve maturasyonu ile dominant follikülün seçiminde serum FSH değerleri için bir eşik değer '*FSH threshold*' söz konusudur. Belirli düzeyde serum FSH konsantrasyonlarının varlığında follikül havuzunun penceresi açılır ve erken antral dönemdeki folliküller ileri basamaklara doğru gelişim gösterirler. FSH eşik değerinin altına düşen konsantrasyonlarda ise follikül havuzunun penceresi kapanır ve matür follikül gelişimi durur dolayısıyla folliküllerin bir kısmı atreziye uğrar. FSH'nın eşik değerine ulaşmış serum konsantrasyonlarında bulunma süresi (FSH penceresi) ne kadar uzatılır ise over follikül havuzundan matür olmak için seçilecek follikül sayısı da o oranda artar.²³

Foliküler büyüme süreci içerisindeki bu folliküllerden bir tanesi seçilerek (seleksiyon) diğerlerine üstünlük (dominans) kazanır ve folliküler fazın ortalarında başlayan bu erken dominans yeterli olgunluğa ulaştığında ovulasyon ile sonuçlanır.

Dominant follikülün seçiminde, FSH uyarısı ve granüloza hücrelerinden salgılanan östrojen ile intraoveryan parakrin ve otokrin faktörler arasında çok hassas dengeler söz konusudur.

Erken folliküler fazda FSH granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini stimule ederek androjenlerden östrojene dönüşümü artırır. Folliküler östrojen konsantrasyonu artar ve artan östrojen follikülü FSH'ya daha da duyarlı hale getirir. Bu aşamada granüloza hücrelerinden giderek artan oranlarda salgılanan östrojen ve inhibinin hipotalamo-hipofizer sisteme negatif geribildirim (*feedback*) etkisiyle FSH yapımı inhibe edilir. Azalan FSH seviyeleri nedeniyle diğer gelişmekte olan folliküllerin bir kısmında androjenden östrojene dönüşüm engellenir, böylece olgunlaşma süreci kesintiye uğrar. Androjen içeriği artan folliküller atreziye uğrarken, diğerlerine göre daha çok östrojen yapan ve FSH'ya daha çok duyarlı olan folliküllerden biri diğerine üstünlük kazanarak dominant follikül haline gelir. Daha çok sayıda FSH reseptörüne sahip olan ve FSH'ya hassas hale gelmiş olan dominant follikülün gelişmesi için FSH konsantrasyonunun az miktarı bile yeterlidir. Dominant follikülde artmış östrojen ve artmış FSH duyarlılığı dışında LH reseptör sayısında da artış görülmektedir.²⁴ Başarılı olan follikül FSH'ya yanıt olarak en yüksek aromataz aktivitesi ve en fazla LH reseptör sayısına ulaşan folliküldür.

Preovulatuvar olgun bir follikül (Graaf follikülü) 18-20 mm çapında, geniş antrumlu bir yapıdadır. Etrafını iyi vaskülarize teka hücreleri çevreler. Overyan stroma içindeki bağ dokusunun arasında yer alan dominant follikül giderek overin korteksine yaklaşarak, over korteksi yüzeyinde çıkıntı yapar ve follikülün tepe noktası açılarak sekonder oosit çevre kümülüs kompleksi ile birlikte dışarı atılır (ovulasyon). Spontan menstrüel sikluslarda normal şartlarda, siklus ortasında, genellikle tek nadiren de birden fazla follikülden ovulasyon gerçekleşir.²⁰ Ovulasyon sonrası geride kalan granüloza ve teka lutein hücreleri korpus luteumu oluştururlar.

Folikülün son maturasyon sürecinde LH kritik rol oynar. Ovulasyonun gerçekleşebilmesi ve etkili bir korpus luteuma dönüşebilmek için granüloza hücrelerinin LH reseptörlerine sahip olması gerekmektedir. FSH geç folliküler fazda

granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin gelişimini arttırmaktadır. Burada östrojen ve lokal otokrin ve parakrin faktörler başlıca koordinatör rolünü üstlenirler.²⁰

Ovulasyon sırasında follikül rüptürünün gerçekleşmesi follikülü çevreleyen kollajen elastin, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşan tabakaların dekompozisyonuna bağlıdır. Over follikülündeki kollajen yıkımını aktive edecek mekanizmalar ise ovulasyon olayındaki fizyolojinin esasını oluştururlar. Ovulasyonu tetikleyen ana olay over ile hipotalamo-hipofizer sistem arasında oluşan hormonal etkileşimdir. Preovulatuvar olgun follikül östrojen yapımını hızla arttırır. Serumda yeterli süre ve miktarda (50 saat süreyle, 200 pg/ml'nin üzerinde) östrojen eşik değerine ulaşıncı, östrojen tepe (pik) noktasından yaklaşık 12 – 24 saat sonra pozitif geribildirim (*feedback*) ile LH sekresyonu stimule olur. Oositin olgunlaşmasının ve ovulasyonun sağlanabilmesi için belli bir eşik LH konsantrasyonunun 14–27 saat süre ile sağlanması gerekmektedir²⁰. LH yüksekliği dominant follikülde granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri üzerinden progesteron yapımını arttırır. Progesterondaki az fakat önemli olan kısa süreli yükseliş pozitif geribildirim ile LH pik'inin ortaya çıkışını ve midsiklus FSH pik'i oluşumunu hızlandırır. LH artımı ile dominant follikül sıvısında bulunan ve primer oositin mayoz bölünmenin 1. fazında duraksamasını sağlayan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) devre dışı bırakılarak, mayoz bölünme tekrar başlatılır. Ovulasyon sırasında overden salınan oosit, 1. mayoz bölünmesi tamamlanmış, kromozom sayısı yarıya düşmüş olan 23 kromozomlu sekonder oositir. Ovulasyon anı LH artım başlangıcından 34 – 36 saat, LH pik'inden 10 – 12 saat sonraya denk düşer. LH artışı, oositte durmuş olan mayozu yeniden başlatması dışında granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu, oosit ile çevresindeki kümülüs tabakasının serbestleşmesini ve follikül rüptürü için gerekli olan prostaglandinlerin ve diğer eikozanoidlerin sentezini de sağlamaktadır.²⁰

2.2. Follikülogenezde Rol Oynayan Folliküler Sıvı Markırları

Oosit maturasyonu ve embriyo kalitesi YÜT sonuçlarını önemli derecede etkiler. Bunu etkileyebilecek bir çok faktörün yanı sıra, follikül sıvısındaki çeşitli otokrin ve parakrin faktörler de son zamanlarda araştırma konusu olmuştur.

Gonadotropik hormonların intraoveryan etkilerinin spesifik reseptörler tarafından kontrol edildiğinin ve follikül geliştikçe folliküler hücrelerdeki reseptörlerin tiplerinin ve sayılarının değiştiğinin anlaşılması, folliküllerin farklı evrelerde aynı gonadotropik uyarıya farklı yanıt verebilmesini aydınlatmıştır. Son yıllarda folliküllerin mikroçevresinin follikül gelişiminin düzenlenmesinde kritik ince ayarı sağladığı düşünülmektedir.²⁵

Follikül sıvısı, follikülogenez süresince oositin olgunlaştığı mikroçevredir. Folliküler sıvıdaki değişiklikler oosit olgunlaşmasını ve kalitesini, fertilizasyonu, erken embriyolojik gelişimi ve gebelik sonuçlarını etkileyebilir. Sonuç olarak insan follikül sıvısında sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi follikül gelişimini ve maturasyonunu, ovulasyonu ve folliküler atreziyi etkileyen çeşitli otokrin ve parakrin etki gösteren maddeler bulunmaktadır.

2.2.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF'ler)

IGF otokrin ve parakrin sistemi; IGF-I ve IGF-II peptitlerinden, onların 6 adet bağlayıcı proteininden (IGFBP-1'den IGFBP-6'ya kadar) ve hedef hücrelerdeki tip I ve tip II IGF reseptörlerinden oluşur.²⁶ IGF'ler yapı olarak insüline benzeyen birçok dokunun ve hücrenin büyüme ve farklılaşmasını sağlayan tek zincirli polipeptitlerdir. Yakın zamandaki çalışmalar, IGF sistemine ait elemanların insan follikül sıvısında önemli miktarda bulunduğunu ve follikül gelişimi, dominant follikül büyümesi, steroidogenez ve folliküler atrezide önemli rolleri olduğunu göstermiştir. IGF'lerin follikülogenez üzerindeki bu etkileri IGFBP'ler aracılığı ile düzenlenmektedir.

IGF'ler, insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri (IGFBP) ve IGF reseptörleri overyan folliküler gelişim, oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi patofizyolojisinde önemli role sahiptir.¹¹

IGF-I, hücre farklılaşmasını etkileyebilecek mitojenik etkilere sahiptir. IGF-I'in serum seviyeleri folliküler sıvıdaki seviyeleri ile tutarlılık gösterir ve intraoveryan IGF-I'in büyük kısmının lokal üretimden ziyade dolaşımdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Granüloza hücrelerinde gerçekleşen IGF-I sentezi FSH bağımlıdır ancak östradiol tarafından da sentezi arttırılmaktadır. Büyüme

hormonu da gonadotropinler ve östradiol ile sinerjik etki göstererek teka hücrelerinde IGF-I sentezini artırır.

IGF-I'in gonadotropinlerin etkilerini düzenleyici görevi vardır. Granüloza hücrelerinin FSH'ya duyarlılığını belirleyen anahtar sitokindir.²⁷ Çeşitli çalışmalar IGF-I'in granüloza hücrelerinde follikülün farklı gelişim evrelerinde farklı işlevleri uyardığını göstermektedir.²⁷ Granüloza hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasını uyardığı ayrıca teka hücrelerinde de steroidogenezi uyardığı gösterilmiştir.²⁶ FSH ile sinerjik etki göstermekte ve antral folliküllerde aromataz aktivitesini uyararak östradiol üretimini artırmaktadır.²⁵ LH reseptörleri ortaya çıktıktan sonra, LH uyarımlı progesteron sentezini artırır ve luteinize granüloza hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. Follikül atrezisini ve apoptozu engelleyici etkisi de vardır.²⁷

Yapılan bir çalışmada preovulatar folliküler sıvı IGF-I konsantrasyonunun optimal follikül gelişiminin ve oosit matürasyonunun bir göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür.²⁸ Farklı bir çalışmada ise IGF-I'nin granüloza hücrelerinin proliferasyonuna ve oositlerin maturasyonuna etki ettiği ve IGF-I varlığında matür hale getirilen oositlerin bölünme oranlarında ve blastosiste gelişimlerinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır.²⁹ Bütün bunlarla birlikte, insanlarda serumdaki IGF-I'in overyan folliküllerin gelişim ve olgunlaşması için şart olmadığı da belirtilmiştir.²⁷

IGF-II'nin teka ve granüloza hücrelerinde büyük oranda eksprese olduğu hatta en yüksek değerinin granüloza hücrelerinde olduğu ve follikülün büyümesi ile arttığı gösterilmiştir.²⁰ Dolayısıyla IGF-II özellikle preovulatar follikül granüloza hücrelerinde üretilir. IGF-II ayrıca luteinize granüloza hücrelerince de sentez edilmekte ve otokrin tarzda lokal etki göstermektedir.²⁰ Serum ve folliküler sıvı konsantrasyonları arasında korelasyon bulunamamıştır ve temel intraoveryan büyüme faktörü olduğu öne sürülmüştür.³⁰ Ayrıca IGF-II yoğunluğunun overyan venöz akımlarda periferik dolaşıma göre önemli derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

IGF-II temelde gonadotropinlerin etkilerini kuvvetlendirir; granüloza hücre proliferasyonunu, aromataz aktivitesini ve progesteron sentezini uyarır. Follikül sıvısındaki IGF-II seviyesinin follikül gelişimi ile ilişkili olduğu ve follikül seçimi sırasında dominant follikülde IGF-II miktarının dramatik olarak arttığı gösterilmiştir.

IGF'lerin aktivitesi, katalitik proteinler ve lokal etki gösteren IGFBP'ler ile kontrol edilir. Serumda IGFBP'ler, IGF-I ve II'nin taşıyıcısıdır. IGF'leri parçalanmaktan koruyup, taşıyıcı ortam ve depo gibi görev yaparak IGF düzeylerinin belli bir değerde kalmasını sağlarlar. Esas olarak IGF konsantrasyonundan çok IGF biyoaktivitesi overyan folliküllerin büyüme ve atrezisinde rol oynamaktadır. IGFBP'lerin granüloza hücreleri tarafından sentezi, IGF biyoaktivitesi ve FSH fonksiyonunda artma ile sonuçlanacak şekilde FSH ve IGF'ler tarafından inhibe edilmektedir.²⁰ İnsan overinde beş tanesinin sentezlendiği gösterilmiştir. IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 folliküler sıvıdan ve granüloza hücrelerinden analiz edilmiştir.

Özellikle düşük molekül ağırlıklı (< 40 kDa) IGFBP'ler (IGFBP-2,-4,-5) IGF'lere bağlanarak ve onların reseptörlerine bağlanmalarını engelleyerek IGF'lerin etkilerini olumsuz etkileyebilmektedir.²⁵ Folliküler sıvıdaki düşük molekül ağırlıklı IGFBP'lerin follikül içi konsantrasyonlarının gelişimsel ve hormonal olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu proteinler dominant ve preovulatuvar folliküllerde az miktarda gösterilebilmektedir.²⁵ İntrafolliküler seviyeleri 1-2 mm çaplı folliküllerden preovulatuvar folliküllere gidildikçe önemli derecede azalmakta, atretik folliküllerde ise artmaktadır.²⁷

IGFBP-3 (150 kDa) serum ve folliküler sıvıdaki esas IGFBP'dir.¹⁴ Serum konsantrasyonları büyüme hormonu ve IGF-I ile düzenlenmektedir.²⁷ IGFBP-3'ün mRNA'sı östrojen dominant folliküllerin granüloza hücrelerinde gösterilmiştir ancak esas kaynağı follikül dışından yani dolaşımdandır. Bu nedenle intrafolliküler IGFBP-3 seviyelerinin, follikül sıvısına IGFBP-3 girişini etkileyen vasküler geçirgenlikteki değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir.³¹

IGFBP-1 (28kDa) IGF-I'in büyüme hormonundan bağımsız taşıyıcısıdır ve serumda küçük bir rol oynar, fakat luteinize edici hormon (LH) pikini takiben dominant follikülün granüloza hücrelerinden sentezlenir.

IGFBP-1, IGF-I'i inhibe eder, IGFBP-3 de IGF-I ve II'yi inhibe eder ve düzenleyici rol oynar.^{30, 32, 33}

IGF-I, LH ile birlikte teka hücrelerinde LH reseptörlerini uyararak androjen sentezini artırır. IGFBP-1 ise granüloza hücrelerinde östradiol sentezini artırarak teka hücrelerinden IGF-I'in uyardığı androjen üretimini ve sonuçta bunun yol açtığı folliküler atrezi ve anovulasyonu engellemektedir. Granüloza hücrelerinden üretilen

IGFBP-1'in IGF-I aktivitesini yeterli derecede antagonize edememesi durumunda androjenlerin fazla üretimi folliküler maturasyonu olumsuz etkilemektedir. IGF-I'in bu şekilde geç embriyo gelişimini de olumsuz etkileyeceği vurgulanmıştır.¹¹

IGF-I ve IGFBP-3'ün insanlarda follikül gelişiminde önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.³⁴ IGFBP-3 seviyelerinin IGF-I ve IGF-II seviyeleri ile korelasyon gösterdiği ve IGF'lerin esas taşıyıcı proteini olarak önemi çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır.³³ IGFBP-3, östrojen dominant folliküllerde IGF-II'nin artışı yansıtır ve IGF-II'nin düzenleyicisi olarak görev yapar.¹¹

IGF-II biyoaktivitesinin IGFBP-4 ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Seçilmiş insan folliküllerinde IGFBP-4, IGF-II'nin özellikle androjen dominant folliküllerde bol miktarda bulunan inhibitörüdür. IGFBP-3, IGFBP-4'ün IGF-II üzerindeki etkisini tersine çevirir. Follikül sıvısında artan IGFBP-3 seviyeleri IGFBP-4 ile yarışır ve IGF-II'nin luteal oluşumu, geç oosit maturasyonunu ve embriyo gelişimini uyarıcı etkilerini korur.¹¹

Wang ve arkadaşları; oosit toplanması sırasında elde edilen follikül sıvısında yüksek IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-4 ve düşük PAPP-A seviyelerinin, daha iyi oosit maturasyonu ve oosit toplanmasından sonraki ilk 48 saat içindeki erken embriyo gelişimi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu parametrelerin, hangi oositin başarılı bir şekilde fertilize olabileceğini ve 2. gün embriyosuna gelişebileceğini tahmin etmede kullanılabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca yüksek IGFBP-1, IGFBP-4 ve düşük IGF-I seviyelerinin, oosit toplanmasından sonra 48-72 saatteki geç embriyo gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.¹¹

GnRH antagonist protokolü ile overyan stimulasyon uygulanan hastalarda folliküler sıvıda IGF-I düzeyine bakılmış ve kötü over yanıtı hastalarda normal yanıt veren hastalara göre IGF-I düzeylerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Spesifik IGFBP proteazları ise IGFBP'leri parçalar ve IGF'lerin reseptörlerine bağlanmasına izin verir.

2.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, heparin bağlı dimerik glikoprotein yapısındaki bir sitokindir.³⁵ Bu faktör, vasküler endotel hücrelerine spesifik bir mitojen olup angiogeneze rol oynar.³⁶

Overde VEGF hem granüloza hemde teka hücreleri tarafından üretilir.³⁷ VEGF'nin overyan folliküllerdeki ekspresyonu follikülün büyüklüğüne bağlıdır.³⁸ İmmunhistokimyasal yöntemle bakıldığında VEGF ekspresyonunun gelişmekte olan folliküllerdeki granüloza hücrelerinde ve en çok da teka hücrelerinde olduğu, atretik folliküllerde ise ekspresyonunun hiç olmadığı gösterilmiştir.³⁹

Ciddi anjiogenez gelişim programı içeren overde çok sayıda anjiogenik faktör ve reseptörleri vardır. Anjiopoietinler vasküler endotel hücreleri için anjiogenezisin geç evresinde etkili iken, VEGF yeni damar oluşumunun başlangıcında rol almaktadır.⁴⁰ Follikül gelişiminin farklı evrelerinde, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasında overden salınan bu faktörlerin kompleks ilişkileri rol oynamaktadır.⁴¹

Follikülogenezde mikrosirkülasyon temel gerekliliktir. Follikül büyümesi ve gelişimi esnasında VEGF mRNA'sı temel görev yapmaktadır. Primordial, primer ve erken antral folliküllerde bulunmaz. VEGF ilk kez kendi vasküler ağlarını oluşturan antral follikülün teka ve granüloza hücrelerinde üretilir. Antrum formasyonunun oluşmasında rol oynar.³⁸ VEGF'nin temel rol oynadığı bu yeni overyan vasküler ağ gelişmekte olan folliküllere gonadotropin, oksijen, büyüme faktörleri ve steroid prekürsörlerin ulaşmasını sağlar. Bu evre follikül gelişiminin gonadotropinlere bağımlı olduğu evredir ve VEGF mRNA miktarı gonadotropinlerin etkisi ile artmaktadır.⁴¹

Overde FSH, LH, hCG ve hipoksiye yanıt olarak yüksek miktarda VEGF üretilir.³⁷ Ayrıca primat overinde IGF-I'in VEGF sekresyonunu hipoksiye göre daha fazla uyardığı gösterilmiştir.⁴²

İnfertilitenin bazı tiplerinde anjiogenez gelişiminin yetersizliği ve sonuçta folliküler gelişimin bozulması yer almaktadır.⁴¹

Hayvan çalışmalarında, folliküler sıvıdaki VEGF'nin oosit maturasyonunu pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir.³⁸

Doğrudan bir vasküler yapıya sahip olamayan oosit ve granüloza hücreleri ile folliküler sıvı arasındaki oksijen transportu difüzyon yolu ile gerçekleşir. Oksijen difüzyonunun azaldığı VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin eksikliğinden de kaynaklanabilen yetersiz mikrosirkülasyon durumunda, pH azalmakta ve anaerobik ürünlerin oluşumu izlenmektedir. Oluşan hipoksiye bağlı olarak oosit-kümüls

kompleksinde VEGF konsantrasyonunun yükseldiği ve buna bağlı olarak fertilizasyonun olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. ⁴³

Endometriyozisli hastaların follikül sıvısında VEGF konsantrasyonları düşük bulunmuş, zayıf oosit ve embriyo kalitesi ile seyreden bu tip follikül içi değişimlerin infertiliteye neden olabileceği öne sürülmüş ayrıca bu embriyoların implante olma özelliğinin de azaldığı saptanmıştır. ⁴⁴ Farklı bir çalışmada, follikül sıvısındaki artmış VEGF seviyelerinin folliküler hipoksi ve suboptimal embriyo gelişiminin markırı olabileceği ileri sürülmüştür. ⁴⁵ Literatürde yine benzer şekilde IVF sikluslarında düşük folliküler sıvı VEGF seviyelerinin daha iyi overyan yanıt ve yüksek gebelik oranları ile ilişkili olduğunu saptayan çalışmalar da mevcuttur. ^{46, 47}

Tüm bu çalışmaların aksine daha fazla oosit elde edilen, fertilizasyon ve gebelik oranları daha yüksek olan hastalardan elde edilen granüloza hücrelerinde VEGF mRNA ekspresyonunun daha yüksek olduğu da bildirilmiştir. ⁴⁸

Literatürde halen VEGF ile ilişkili yukarda belirtilen çelişkili sonuçlar mevcuttur.

2.2.3. Antimülleryan Hormon (AMH)

AMH, aynı zamanda mülleryan inhibiting substance (MIS) olarak da bilinir ve Transform edici Büyüme Faktörü beta (TGF β) ailesinden olup, dimerik glikoprotein yapıda bir hormondur. Bu gruba dahil olan hormonlar doku büyümesi ve farklılaşmasında etkilidirler. ⁴⁹ Overde AMH ve Antimülleryan Hormon reseptör II (AMHRII) ekspresyonunun tespit edilmiş olması follikül gelişimi ve fonksiyonunda rolü olabileceğini göstermiştir.

Cerrahi menopoz geçiren kadınlarda dolaşımda AMH seviyelerinin saptanamaması sadece overden salgılandığının bir kanıtıdır. Puberte sonrası menstrüel siklus başladıktan itibaren yıllar içerisinde dolaşımdaki AMH düzeyi giderek azalır ve menopozda tesbit edilemez. ⁵⁰

Artan yaşla birlikte azalan antral follikül havuzunu yansıtmaması nedeniyle AMH ovaryen folliküler rezervi gösteren iyi bir biyomarkırdır ve over rezerv testleri içinde de önemli bir yere sahiptir. ⁵¹

Henüz overyan follikülleri dolaşımdaki gonadotropinlere maruz kalmamış 10 yaşından küçük prepubertal kız çocukları ile erişkin kadınların follikül sıvısındaki AMH konsantrasyonlarının benzer olduğunun tespit edilmesi AMH sentezinin gonadotropinlerden bağımsız olduğu görüşünün ortaya çıkmasına neden olmuştur.⁵² Benzer mantıkla yapılan diğer bir çalışmada da yüksek gonadotropin düzeylerine sahip gebe kadınlar ile gebe olmayanların foliküler AMH düzeyleri benzer bulunmuş ve AMH üretiminin gonadotropinlerden bağımsız olduğu ileri sürülmüştür.⁵³

AMH mRNA'sı ve proteini, büyümeye başlamış folliküllerinin granüloza hücrelerinin sitoplazmasında saptanmıştır. Primer follikülden erken antral folliküle doğru olan folliküler gelişim sürecinde AMH üretimi başlar ve giderek artar.^{54, 55} Erken antral follikül evresinden sonra folliküller AMH üretim kapasitelerini progresif olarak kaybederler. Dolayısıyla preantral folliküllerde ekspresyonu çok kuvvetli iken antral ve preovulatuvar folliküllerde azalmıştır. Başlıca preantral ve erken antral folliküllerden salgılanmaktadır.^{55, 56} AMH'nin follikül gelişimde folliküler seleksiyon evresine kadar önemli bir intrafolliküler medyatör olduğu ileri sürülmüştür. Primordial ve atretik folliküllerde AMH ekspresyonu gözlenmemiştir.⁵⁵

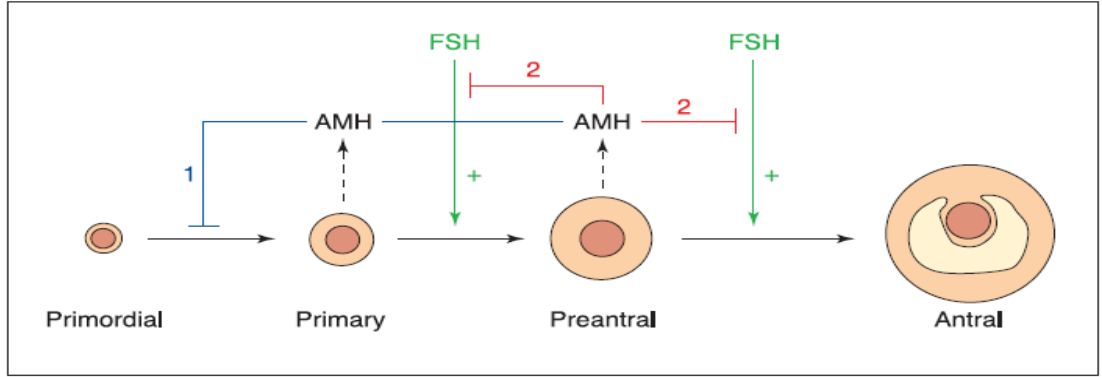
Oosit maturasyonunda (oositin mayozunu baskılamaktadır) rol oynadığı düşünülmektedir.²⁰

Overyan aktivite üzerine düzenleyici etkisi vardır.⁵⁷ Temel çalışmalar AMH'nin folliküler steroidogeneze etkili olduğunu göstermiştir. Hayvan çalışmalarında; AMH'nin erken follikülogenezde FSH bağımlı aromataz aktivitesini ve granüloza hücrelerinde FSH'ın stimule ettiği LH reseptör sayısını azalttığı görülmüştür.⁵⁸ Farklı bir çalışmada ise follikül matür hale geldikçe ve lüteinize oldukça AMH üretiminin bu süreçten negatif etkilendiği ileri sürülmüştür.⁵⁹

Biyolojik rolü tam olarak anlaşılamasa da overyan steroidogenez ve follikül recruitmentında düzenleyici rolü olduğu bildirilmiştir.⁶⁰ Erken antral folliküllerdeki AMH konsantrasyonları ile aromataz aktivitesi arasında ters korelasyon olduğu saptanmıştır⁶¹. Daha önceki çalışmalarda da AMH ve östradiolün intrafolliküler konsantrasyonları arasında güçlü negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir.⁶²

AMH primordial folliküllerdeki pregranüloza hücrelerine etki ederek dinlenme havuzundan gelişim havuzuna geçen (başlangıç *recruitmentı*) follikül sayısını sınırlı tutar. Dolayısıyla primordial follikül havuzunun tükenmesini engeller.

Siklik *recruitment*da da folliküllerin FSH'ya duyarlılığını azaltarak seleksiyonda ve takiben dominant follikül seçiminde rol oynar, (Şekil 2.3).^{18, 58, 63}



Şekil 2.3. AMH'nin overdeki olası etkileri. 1; Başlangıç *recruitment*ını inhibe eder, 2; FSH'nın preantral ve küçük antral folliküller üzerindeki büyümeyi stimule edici etkisini inhibe eder- Durlinger ve ark⁵⁸,dan alınmıştır.

Farelerde AMH geni üzerinde yapılan çalışmalarda; AMH geni olmayan farelerin bir siklusunda kontrol grubuna göre üç kat daha fazla antral follikül oluştuğu ve aynı zamanda folliküler rezervin daha erken tükendiği gösterilmiştir. Yine fareler üzerinde yapılan farklı bir çalışmada ise düşük AMH reseptörü olan follikülün dominant follikül olarak seçildiği bildirilmiştir.⁶⁴

Anovulatuvar PCOS'lu hastalarla normal overyan fonksiyonları olan hastaların kıyaslandığı çalışmada; PCOS'lu hastalardan elde edilen granüloza hücre kültürlerinde AMH üretiminin 75 kat fazla olduğu tespit edilmiş. AMH'deki bu yüksekliğin polikistik over sendromunda görülen folliküler gelişim yetersizliğinde, dominat follikül seçimindeki defekte ve anovulasyonda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada her iki grubun granüloza hücre kültürlerine ayrı ayrı FSH veya LH eklenmiş, normal overyan fonksiyonu olan grupta FSH veya LH eklenmesi ile AMH üretiminde belirgin farklılık olmazken PCOS'lu hastalarda FSH eklenmesi ile AMH üretiminde düşüş ve LH eklenmesi ile AMH üretiminde belirgin artış meydana gelmiştir.⁶⁵

Yine PCOS'lu hastalarla yapılmış farklı bir çalışmada; FSH'ın folliküllere erişiminin bozulması ve artmış androjen seviyelerinin PCOS'lu hastalarda AMH düzeylerinin artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür.⁶⁶ Benzer sonuçları olan bir çalışmada; farmakolojik olarak (letrozol ve hCG verilerek) polikistik over benzeri

durum yaratılmış ve artmış androjen düzeyleri ile AMH arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür.⁶⁷ Bu çalışmaların aksini gösteren çalışmada; erken antral folliküllerde artmış olan androjenlerin AMH üretimini etkilemediği ancak artmış AMH ile östradiol arasında ters korelasyon olduğu bildirilmiştir.⁶² Mevcut ters korelasyonun AMH'nin granüloza hücrelerini FSH'ya duyarsızlaştırmasından çok östradiol yapımını etkilemesinden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Folikül sıvısındaki AMH düzeylerinin oosit maturasyonu, kalitesi ve gebelik oranları ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.^{66, 68}

Bu çalışmaların tam zıttı olan, follikül sıvısındaki AMH düzeylerinin toplanan oosit sayısı, implantasyon, fertilizasyon ve gebelik oranları gibi KOH sonuçları ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur.⁶⁹⁻⁷²

2.2.4. İnhibin-B

İnhibin-B Transforme edici Büyüme Faktörü beta (TGF β) ailesinden olup, birbirinden farklı ve disülfid bağları ile ilişkili iki peptitten (alfa ve beta alt üniteleri) oluşmuştur. Granüloza hücrelerinden salgılanır. FSH'ı seçici olarak inhibe etmesinin yanında overdeki hücre büyümesi, hücre maturasyonu ve steroidogeneizde lokal regülatör gibi davranır.⁷³

FSH preantral ve erken antral folliküllerdeki granüloza hücrelerinden inhibin-B salgısını artırır ve daha sonra inhibin-B tarafından seçici şekilde FSH'ın sentezi ve salgılanması baskılanır (resiprokal ilişki).^{74, 75} Aslında inhibinin gonadotropin sekresyonu üzerine multiple ve farklı inhibitör etkileri bulunmaktadır. FSH sentezini ve salgılanmasını baskılaması dışında, GnRH'nın kendi reseptörlerini arttırımını önleyebilir, mevcut olan GnRH reseptör sayısını azaltabilir ve yüksek konsantrasyonlarda gonadotropinlerin intraselüler yıkımını arttırabilir.²⁰

İnhibin-B, erken folliküler fazda yavaş ancak sabit olarak salgılanarak midfolliküler fazda kanda tepe(pik) noktasına ulaşır takiben ovulasyon öncesi geç folliküler fazda giderek dolaşımdaki miktarı azalır. LH pikinden kısa bir süre sonra dolaşımda tekrar kısa süreli bir İnhibin-B piki olur ancak uzun sürmez luteal fazda seviyesi iyice düşer.⁷⁶ Follikülogenez sürecinde inhibinin dolaşıma verilmesi ile

FSH'nin diğerk folliküllerden çekilmesi arttırılmış olur ve böylece inhibin gelişen öncü follikülün dominans kazanmasını destekler.²⁰

İntrafolliküler inhibin-B konsantrasyonu 9-10 mm'lik follikül çapına ulaşıldığında pik değerine ulaştığı ve daha sonra intrafolliküler konsantrasyonunun yavaşça azaldığı, bu 9-10 mm'lik follikül çapına ulaşana kadar da inhibin-B konsantrasyonu ile follikül çapı arasında oldukça anlamlı pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir.⁵² İntrafolliküler seviyesi ile ilgili olan bu sonuç daha önce bahsedilen kanda midfolliküler fazdaki yükselişi ile uyum göstermektedir. Follikül sıvısında pik yaptığı bu dönem aynı zamanda folliküler seleksiyonun olduğu dönemdir.

İnhibin-B, parakrin etki ile teka hücrelerinde LH stimülasyonunu artırarak androjen sentezini ve dolaylı yoldan artmış aromatzasyon ile östradiol üretimini arttırmaktadır.^{77, 78} Farklı bir çalışmada da erken antral folliküllerde İnhibin-B ile östradiol konsantrasyonları arasında pozitif korelasyonun varlığı gösterilmiştir.⁷⁹

İnhibinin salgılanması ayrıca intraoveryan lokal otokrin ve parakrin kontrol ile de düzenlenmektedir. GnRH ve epidermal büyüme faktörü FSH'nın inhibinin salgılanmasını arttırıcı etkisini azaltır, oysa IGF-I inhibinin yapımını arttırır.²⁰ Artmış intrafolliküler androjen konsantrasyonlarının İnhibin-B yapımını azalttığı da ileri sürülmüştür.⁶⁷

Yapılan çalışmalarda follikül sıvısındaki inhibin seviyelerinin oosit sayısı ve kalitesine göre over fonksiyonunu yansıttığı tespit edilmiştir.^{47, 80} Embriyo kalitesini predikte etmek için folliküler sıvıdaki İnhibin-B'nin iyi bir markır olduğu ileri sürülmüştür.⁷⁶ Benzer şekilde follikül sıvısındaki inhibin seviyelerinin başarılı IVF sonuçları ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.⁴⁷

2.3. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon (KOH)

Doğal siklusda YÜT uygulaması dışındaki YÜT sikluslarında, follikül ve oosit gelişimi kadına uygulanan bir dizi ilacın yardımı ile düzenlenmektedir. Yardımla üreme siklusları için tasarlanmış olan bu ilaç uygulamalarının hepsi Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon protokolleri olarak adlandırılmaktadır. Burada amaçlanan, spontan oosit gelişimi ile spontan ovulasyonun baskılanması ve dışarıdan verilen ilaçlar ile mümkün olduğunca çok sayıda ve iyi kalitede oositin elde

edilmesidir. YÜT siklusunun başarısı, elde edilen oosit sayısı ve kalitesi ile direkt ilişkilidir.

Günümüzde IVF-ICSI sikluslarında birçok KOH protokolü kullanılmaktadır. Overyan baskılama için kullanılan GnRH agonisti ve GnRH antagonistlerinin uygulanma şemalarına göre farklı KOH protokolleri geliştirilmiştir. Bu protokoller aşağıdaki gibi özetlenebilir.

2.3.1. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonistleri (GnRHa) ile Yapılan KOH Protokolleri

GnRH agonistleri, başlangıçta hipofizdeki reseptörlere bağlanarak, yüksek miktarlarda FSH ve LH salınımına (alevlenme etkisi; *flare effect*) ve GnRH reseptörlerinin sayılarının artmasına (up regülasyon) neden olurlar. Ancak uzun süreli kullanımdan sonra, GnRH reseptörlerinin sayılarının azalmasına (down regülasyon) ve hipofizer duyarsızlaşmaya (desensitizasyon) dolayısıyla FSH ve LH'nin sentezinin progresif olarak azalmasına yol açarlar.

GnRH agonistlerinin kullanılması sayesinde endojen olarak hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin sekresyonu baskılanarak ekzojen gonadotropin stimülasyonu sırasında %20 oranında meydana gelen ve siklus iptaline neden olan erken LH yükselmesi (*prematür LH surge*) %2'lere kadar düşürülmüştür.

2.3.1.1. Uzun Etkili GnRH Agonistleri ile Yapılan Down Regülasyon Sonrasında Ekzojen Gonadotropin Uyarımı - Uzun (Long) Protokoller

Uzun GnRHa protokolünde, GnRH agonist tedavisi midluteal aşamada, ovulasyondan yaklaşık bir hafta sonra veya adet 21. gününde başlanır. Bu dönemde endojen gonadotropin seviyeleri düşüktür ve agonistlerin neden olduğu alevlenme etkileri yeni bir folliküler gelişimi uyarmak anlamında en düşük seviyededir. En çok kullanılan GnRH agonistleri; löprolid asetat (ciltaltı uygulama), nafarelin asetat (intranazal uygulama), Buserelin (ciltaltı veya intranazal uygulama) ve triptorelin (ciltaltı uygulama)'dir. ¹

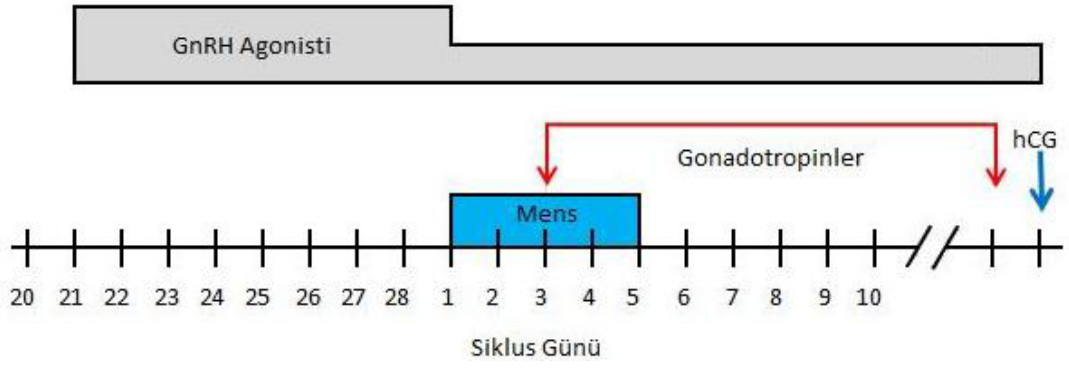
Uzun GnRHa protokolde, adet başlayıncaya kadar veya gonadotropin enjeksiyonuna kadar 1,0 mg löprolid asetat ile tedaviye başlanır. Bundan sonra 0,5 mg'a düşölür ve hCG enjeksiyonuna kadar devam edilir. Naferelin için ise başlama dozu tipik olarak günde 2 kez 400 µg kadardır ve gonadotropinler başladığında doz 200 µg'a düşölürölür.

Kötü over kapasitesi olduğu bilinen veya KOH'a az sayıda folliköler gelişimle cevap vereceği düşünölün hastalarda, aşırı hipofizer baskılanmaya yol açmamak için dozu düşölürmek over cevabında düzelmeye yol açar ve tüm sonuçlarda düzelmeyi sağlayabilir. ¹

Hastaya GnRHa ile önerilen dozda medikasyon başladıktan sonra adetin 2-4. gün arasında serum östradiol (E2) tayini ve transvajinal ultrasonografi ile değeriendirme yapılır. İdeal olarak gonadotropinlerle stimulasıona başlamadan önce serum östradiol (E2) seviyelerinin GnRH agonistiyle etkin bir biçimde baskılandığı (<50 pg/mL) görölmeli ve transvajinal ultrason ile 10 mm'den büyük folliköl izlenmemelidir. Serum E2 seviyesinin baskılanmaması veya >10 mm folliköl saptanması durumunda mevcut siklus iptal edilir. Hipofizer baskılanma saptanmış ise hastanın yaşı, vücut kitle indeksi, antral foliköl sayısı ve önceki ovulasyon indüksiyonunda verdiği optimum cevaba göre bireysel gonadotropin dozu ile uyarım yapılmaya başlanır.

Genel olarak başlangıç dozu 150 ve 300 IU üriner FSH (uFSH), rekombinant FSH (rFSH) veya üriner menotropin (hMG) uygulanır. İndüksiyon şemasında step up ya da daha çok kullanılan step down yöntemi kullanılır. İlk indüksiyona başlanmasından 3-5 gün sonra yapılan serum E2 ölçümü ve follikölometriden sonra hastanın verdiği cevaba göre 1-3 gün aralarla monitorizasyona devam edilir. Çoğu kadın için 7-12 günlük bir uyarı dönemi gerektir. Genelde hedef en az 2 tane 17-18 mm çapında folliköl elde etmektir ve ideal olarak birkaç tane 14-16 mm arasında folliköl olabilir.

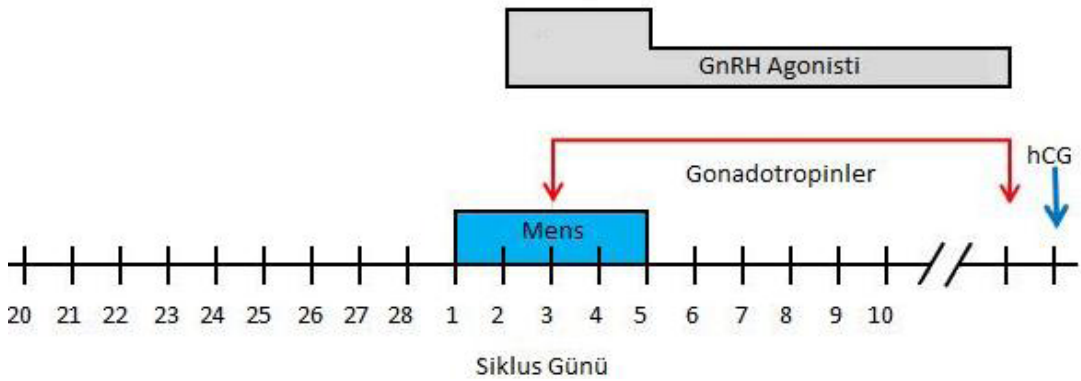
Hedeflenen folliköl sayısına ulaşıldıktan sonra son oosit maturasyonu için 5000-10000 IU hCG uygulanır. Eş dozda rekombinant hCG yaklaşık 250 µg'dır ve uygun bir alternatif yaklaşımdır.



Şekil 2.4. GnRH agonisti ile uzun protokol.

2.3.1.2. GnRH Agonisti ve Ekzojen Gonadotropinlerle Ardışık Olarak Yapılan – Kısa (Stop) veya Flare Protokoller

Kısa veya flare protokoller; Kısa(stop) protokolde gonadotropinlerin flare-up etkisinden yararlanır. Hem uzun dönemli bir GnRH agonistinin ilk baştaki agonistik etkisini hem de daha uzun tedavi döneminde uyarılan endojen gonadotropin salgısındaki baskılanmayı sağlaması açısından uygun alternatif yaklaşımlardır. Kısa protokolde GnRH agonisti adet 2-4 günü verilir, daha sonra dozu azaltılır (günlük 0,5 mg) ve gonadotropin enjeksiyonuna adet 3. günü başlanır. Eğer gerek olursa gonadotropin dozunda yapılacak oynamalar ve hCG zamanı tıpkı diğer protokollerdeki gibidir.

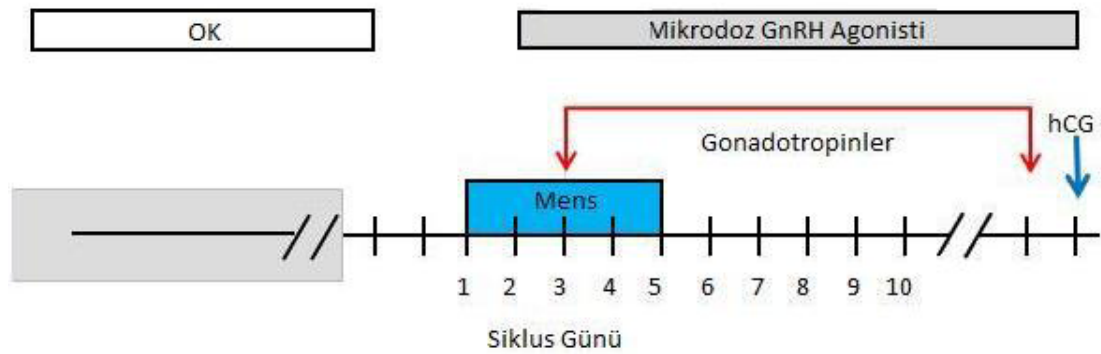


Şekil 2.5. GnRH agonisti ve ekzojen gonadotropinlerle ardışık olarak yapılan kısa (stop) veya flare protokoller.

Ultra kısa GnRH agonist protokolü; flare etkiyi stimule etmek için agonist tedavisi 3 gün boyunca verilir ama daha sonra kesilir; tedaviye sadece gonadotropin ile devam edilir. Kısa ve uzun protokollere göre erken LH artışı (prematür LH surge) daha sıktır.

Oral kontraseptif mikrod doz flare-up protokolü; kısa protokolün bir çeşitidir. Oral kontraseptif ile overyan baskılanmayı (14-21 gün) takiben adet 3. gününden itibaren mikrod doz löprolid asetat (günde 2 kez 40 mikrogram) tedavisi başlanır. Gonadotropin başlanması ve hCG zamanlaması diğer protokollerle aynıdır. Bu protokolün kısa protokole göre avantajı bu rejimde serum progesteron ve androjen konsantrasyonlarında bariz artış olmamasıdır. Bunun nedeni muhtemelen GnRH agonisti miktarının az olması ve oral kontraseptif sebebiyle corpus luteumun baskılanmış olmasıdır.¹

Oral kontraseptif mikrod doz flare protokolü, serum FSH seviyeleri dramatik olarak yükselmiş ve daha önce stimülasyona kötü cevap verdiği bilinen kadınlarda, unilateral ooferektomize olmuş veya over cerrahisi geçirenlerde uygun tedavi yaklaşımıdır. Bu hasta grubunda bu protokol ile daha düşük siklus iptal oranları, daha yüksek tepe östradiol düzeyleri, embriyo transfer oranları ve en önemlisi daha cesaretlendirici klinik ve devam eden gebelik oranları sağlanılabilmektedir.¹



Şekil 2.6. Oral kontraseptif mikrod doz flare protokolü.

2.3.2. GnRH Antagonist (GnRHant) Eklenecek Yapılan Ekzojen Gonadotropin Protokolleri

İlk önce uyaran ama daha sonra inhibe eden uzun etkili agonistlerin tersine GnRH antagonistleri (GnRHant) doz bağımlı şekilde GnRH ile yarışa girerek (kompetitif şekilde) GnRH reseptörlerini bloke ederler ve çabuk bir şekilde (24-72 saat içinde) hipofizer inhibisyon ortaya çıkarırlar.

GnRH antagonistlerin agonistlere göre avantaj ve dezavantajları vardır. Avantajları; stimülasyon süresinin daha kısa olması, hipofizer inhibisyonun daha çabuk ortaya çıkması, folliküler evrenin geç aşamalarına kadar uygulanabilir olması, ortaya çıkabilecek östrojen eksikliği belirtilerinin daha hafif ve az olması, toplam kullanılan gonadotropin dozunun az olması, alevlenme etkisinin olmaması nedeni ile asimetrik follikül gelişiminin daha az olması ve en önemli avantajı hiperstimülasyon riskinin daha az olabileceğidir.¹ Ayrıca son oosit maturasyonu için hCG yerine GnRH agonisti kullanılması imkanını sağlaması GnRH antagonistlerinin diğer bir avantajlarıdır.

GnRH antagonistlerinin dezavantajları da mevcuttur. Günlük düşük dozlarda uygulandığı zaman tedaviye mutlak uymak gerekir. Agonistlere göre endojen gonadotropin salgısını daha belirgin durdurmaktadır. Ayrıca uzun GnRH agonist protokol uygulananlara göre antagonist tedavisi uygulananlarda gebelik oranlarında hafif bir düşüklük olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Bunun nedeninin GnRH antagonistlerinin follikülogenez, blastomer oluşumu ve endometrial gelişimde önemli bir yere sahip olan mitotik programlamayı etkilemelerinden dolayı olabileceği ileri sürülmüştür.¹

2.3.2.1. Multiple Doz GnRH Antagonist Protokolü

Kullanılan iki tip GnRH antagonisti mevcuttur. Cetrorelix ve Ganirelix dir. Her ikisi de erken LH artışını engellemek için cilt altına günlük 0,25 mg kadar uygulanır. Uygulanacak günlük enjeksiyonlar ise iki yöntemle uygulanabilir. Birincisi, tedaviye gonadotropin tedavisi başladıktan 5-6 gün sonra başlanmasıdır ve 'fiks protokol' (sabit protokol) adını alır. Diğer yöntem ise gonadotropinlerle yapılan

stimulasyona verilen cevaba göre, serum E2 seviyesi 400 pg/ml'yi geçtiğinde ya da en büyük follikül 13-14 mm çapına ulaştığında antagonist başlanması şeklindedir ve 'flexible protokol' (esnek protokol) adını alır. Her iki yöntemde de hCG enjeksiyonuna kadar medikasyona devam edilir.¹

2.3.2.2. Tek Doz GnRH Antagonist Protokol

Günlük antagonist enjeksiyonuna alternatif olarak tek ve yüksek dozda cetrorelix enjeksiyonu (3,0 mg) uygulanabilir bir alternatiftir. Böylece LH artışı 96 saat geciktirilebilir. Eğer bu süre sonunda hCG yapılma kriterine ulaşılamadıysa günlük 0.25 mg ek medikasyon gereklidir. Tek doz antagonist tedavi rejimi en büyük follikül 13-14 mm'ye ulaşınca kadar geciktirilebilir.¹

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi, Bilgilendirilmiş Onam, Etik Kurul Onayı

Haziran 2009 – Ocak 2010 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Sağlığı Araştırma ve Uygulama Merkezine başvuran, intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) ve embriyo transferi (ET) için kontrollü overyan hiperstimulasyon yapılacak olan 80 hasta çalışmaya dahil edildi. Her hastanın ICSI ve ET yapılmak üzere kontrollü overyan hiperstimulasyon uygulanan birer siklusunda OPU işlemi sırasında elde edilen follikül sıvısı örneği alındı.

20-38 yaş arası ve erkek faktörü, tubal faktör, ovulatuvar disfonksiyon veya açıklanamayan infertilite nedeniyle ICSI-ET uygulanan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Herhangi bir endokrin veya sistemik hastalığı olan, hipogonadotropik hipogonadizmi olan ve daha önceki IVF/ICSI sikluslarında kötü over cevabı olan hastalar (*poor responder*) çalışmadan dışlandı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları, siklusun 3. günü (bazal) hormon değerleri, vücut kitle indeksleri (VKİ), infertilite süreleri ve nedenleri kaydedildi.

Seçim kriterlerine uygun özellikler taşıyan toplam 80 hastadan, 40 hastaya uzun (long) GnRH agonist protokol (Grup 1) geriye kalan 40 hastaya ise esnek (flexible) multiple doz GnRH antagonist protokol (Grup 2) uygulandı. Ek olarak her grup (Grup 1 ve Grup 2) kendi içinde rekombinant FSH ile birlikte Human Menopozal Gonadotropin (hMG) alan ve almayan 20 hastadan oluşan iki subgruba ayrıldı (hMG alanlar; Grup 1a ve Grup 2a, hMG almayanlar Grup 1b ve Grup 2b).

Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek, çalışmaya dahil edildiklerine dair yazılı bilgilendirilmiş onamları alındı. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı.

3.2. KOH Protokolü, Oosit Toplanması ve Kültürü

Uzun (long) GnRH agonist protokol (Grup 1): Bir önceki menstrüel siklusun yirmi birinci gününden başlanarak hCG gününe kadar hastalara subkutan enjeksiyon ile GnRH agonisti olan Löprolid Asetat (Lucrin, Abbott Laboratuvarları) uygulandı. Bu şekilde hipofizer baskılanma sağlandı. Overyan stimulasyon için menstrüasyonun üçüncü gününden başlanarak gonadotropinler (rekombinant insan follikül stimule edici hormonu (rFSH; Gonal-F, Serono ya da Puregon, Organon) ± insan menopozal gonadotropini (hMG; Menogon, Ferring)) uygulandı (HMG; 75IU FSH ve 75IU LH içerir). Doz ayarlamaları, hastaların stimulasyona yanıtına göre yapıldı. Folliküler gelişim, düzenli aralıklarla bakılan transvajinal ultrason ve serum E2 seviyeleri ile monitorize edildi. En az iki follikülün çapı 17-18 mm'ye ulaştığında, Löprolid asetat, rFSH ve hMG kullanımı kesilerek oosit maturasyonunun ve ovulasyonun tetiklenmesi amacıyla 10000 IU İnsan Koryonik Gonadotropini (hCG; Pregnyl, Organon) intramusküler olarak uygulandı. Bu uygulamayı takiben 35-36 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde oosit toplanması işlemi (oosit pick up) gerçekleştirildi.

Esnek (Flexible) multiple doz GnRH antagonist protokol (Grup 2): Siklusun 2.-3. gününde başlanan gonadotropinlerle (rekombinant insan follikül stimule edici hormonu (rFSH; Gonal-F, Serono ya da Puregon, Organon) ± insan menopozal gonadotropini (hMG; Menogon, Ferring)) over stimulasyonu devam ederken, dominant follikül boyutu 13-14 mm olarak saptandığında GnRH antagonisti cetrorelix (Cetrotide flakon 0.25 mg, Serono) veya ganirelix (Orgalutran enjektör 0.25 mg, Organon) başlandı. En az iki follikülün çapı 17-18 mm'ye ulaştığında, Cetrorelix/ganirelix, rFSH ve hMG kullanımı kesilerek oosit maturasyonunun ve ovulasyonun tetiklenmesi amacıyla 10000 IU İnsan Koryonik Gonadotropin (hCG; Pregnyl, Organon) intramusküler olarak uygulandı. Bu uygulamayı takiben 35-36 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde oosit toplanması işlemi (oosit pick up) gerçekleştirildi.

1. polar cisimcik gözlenen, ooplazması düzgün ve kümülüs ve korana hücreleri ışık demeti şeklinde açılmış olan oositler matür oosit (Metafaz II) olarak değerlendirildi.

Elde edilen oositler, kendilerini çevreleyen kümülüs hücrelerinden hyaz enzimi kullanılarak ayrıştırıldı ve ICSI işlemine kadar %6 CO₂ ve 37°C’de, insan serum albumini de eklenerek, hyaluronan, glukoz, laktat, pirüvat, aminoasitler, elektrolitler ve penisilin G içeren bikarbonat tamponlu bir ortamda (G-Fert; Vitrolife, Kolorado, ABD) bekletildi.

3.3. Follikül Sıvısı Toplanması ve Saklanması

Her hastanın OPU işlemi sırasında en az iki matür follikülünden elde edilen ve kan içermeyen follikül sıvıları, oositler follikül sıvısından ayrıldıktan sonra her bir hasta için biraraya getirilerek havuzlandı. Havuzlanan follikül sıvıları 3000 rpm’de 15 dakika santrifuj edildikten sonra süpernatantları aspire edilerek eppendorf tüplerine konuldu. Örnekler IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, VEGF, İnhibin-B, AMH tayinine kadar -80°C’de saklandı.

3.4. İntrastoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI), Embriyo Transferi ve Luteal Destek

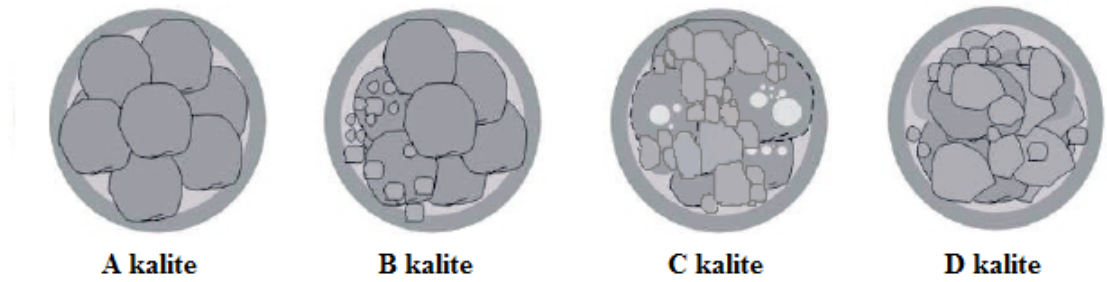
Tüm matür oositlere (metafaz II) 4-6 saat içinde ICSI prosedürü uygulandı. Takip eden 16-18. saatlerde ICSI uygulanmış oositlerde pronukleus (PN) kontrolü yapıldı. İki pronukleusun varlığı normal fertilizasyon olarak kabul edildi. Oluşan embriyolar G1-G2 version 5 (Vitrolife, Kolorado, ABD) medyum ortamına ekilerek %6 CO₂ ve 37°C’de kültüre edildi. Oosit toplanmasını takip eden 2. ve 3. günlerde embriyolar ışık mikroskopu altında incelenerek morfolojik özelliklerine göre skorlandı ve dört sınıfa (Grade A, B, C, D) ayrıldı. Bu sınıflandırma aşağıda belirtilmiştir;

Grade A (yüksek kaliteli embriyo) - Eşit boyutta ve hafif yuvarlak, simetrik blastomerli embryolardır. 48. saatte 4 blastomer, 72. saatte 8 blastomer bulunur. Sitoplazma düzenli görünümde, hafif granülerdir, sitoplazmik fragmentasyon yoktur.

Grade B (2. sınıf embriyo) - Blastomerleri biraz farklı veya düzensiz olan embryolardır. Minör sitoplazmik fragmentasyon (< %10) ya da vakuoller görülür.

Grade C (3. sınıf embriyo) - Belirgin farklı boyutta, asimetrik görünümde blastomerli embryolardır. Stoplazma geniş koyu renkte granüller ve vakuoller içerir, %50'ye kadar sitoplazmik fragmentasyon görülür.

Grade D (kötü embriyo) - Az sayıda farklı boyutta blastomerli embryolardır. Blastomerler birbirinden ayrık görünümündedir ve blastomer zarı yamalı görünümündedir. Stoplazma geniş koyu renkte granüller ve vakuoller içerir, şiddetli ya da tamamen fragmentasyon vardır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Embriyo Sınıflandırması.

Transfer edilecek embriyolar bu sınıflandırmadaki morfolojik özelliklere göre seçildi. Embriyo transferi, oosit toplanmasını takip eden 3. gün içinde, 1-5 adet arasında değişen sayılarda, Swemed (Vitrolife, İsveç) kateter kullanılarak ultrason eşliğinde yapıldı.

Luteal faz desteği tüm hastalara intravaginal yoldan, doğal mikronize progesteron (Progestan, Koçak) 600 mg/gün (3x200mg) veya progesteron jel (Crinone %8 vaginal jel, Serono) 90 mg/gün dozunda, gebelik durumunun aksi ortaya konulana kadar uygulandı.

Embriyo transferinden 12-14 gün sonra serum β hCG değeri ölçülerek gebelik değerlendirildi, β hCG değeri artmayan ve gestasyonel kese saptanmayan durumlar kimyasal gebelik olarak kabul edildi. Klinik gebelik varlığı ise ultrasonografik olarak fetal kalp atımlarının gösterilmesi olarak kabul edildi.

3.5. Folliküler Sıvı Markırlarının Analizi

IGF-I ve IGFBP-3 ölçümleri Immunoradyometrik yöntem (IRMA) kitleri (IGF-1; Immunotech, Fransa) (IGFBP-3; Diagnostic Systems Laboratories, A.B.D) kullanılarak yapıldı. IGF-I için test ölçüm aralığı 2-1200 ng/mL, IGFBP-3 için test ölçüm aralığı 0.5-100 ng/mL idi.

Immunoradyometrik yöntem (IRMA) sandwich yöntemi şeklinde uygulanan bir radyoimmunoassay'dir. Radyoimmunoassay'de temel mekanizma, radyoizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özellik olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır. En fazla kullanılan madde radyoaktif iyottur (I_{125} veya I_{131}). Ölçüm tüpündeki antikor-antijen kompleksinin radyoaktivitesi bir gamma sayacı kullanılarak ölçülür.

IGF-II, VEGF, AMH ve İnhibin-B ölçümleri Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay (ELISA) kitleri (IGF-II; Diagnostic Systems Laboratories, A.B.D) (VEGF; İnvitrogen, ABD) (AMH; Diagnostic Systems Laboratories, A.B.D) (İnhibin-B; Diagnostic Systems Laboratories, A.B.D) kullanılarak yapıldı. Testlerin ölçüm aralığı IGF-II için 2.2-2200 ng/mL, VEGF için 5-1500 pg/mL, AMH için 0.006-15 ng/mL, İnhibin-B için 7-1000 pg/mL idi.

Enzim Linked İmmuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarı, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı ölçülebilir.

Test ölçüm aralıklarının üzerinde çıkan değerler için folikül sıvı örnekleri dilüe edilerek tekrar çalışıldı.

3.6. İstatistik Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı.

Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde Shapiro-Wilk testi kullanıldı.

İki gruptaki sürekli değişkenlerin ortalamalarının/ortancalarının karşılaştırılması, veriler normal dağılıma uyduğunda Student's t testi, uymadığında ise Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

İki grup arasındaki kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi veya Fisher's exact testi kullanıldı.

Değişkenler arasındaki ilişkiler parametrik verilerde Pearson Korelasyon Katsayısı, nonparametrik verilerde Spearman Korelasyon Katsayısı kullanılarak incelendi.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda $p < 0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada, Grup 1 (Uzun GnRH agonist protokolü uygulanan) (n=40) veya Grup 2 (Esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü uygulanan) (n=40)'ye dahil olan toplam 80 hastanın kontrollü overyan hiperstimulasyon sonrası OPU işlemi sırasında aspire edilen follikül sıvılarındaki IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF, AMH konsantrasyonları analiz edildi. İki ana grup (Grup 1 ve Grup 2) arasında ve bu ana grupların her birinin kendi içerisindeki subgrupları (rFSH ile birlikte hMG alanlar; Grup 1a ve Grup 2a, rFSH ile birlikte hMG almayanlar Grup 1b ve Grup 2b) arasında folliküler sıvı markırı konsantrasyonları ve tedavi sonuçları açısından fark olup olmadığı araştırıldı.

Ayrıca folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonlarının toplanan oosit sayısı, matür (Metafaz II) oosit sayısı, yüksek kaliteli embriyo sayısı (Grade A) gibi embriyolojik siklus sonuçları ve fertilizasyon oranları, implantasyon oranları, klinik gebelik ve canlı doğum gibi gebelikle ilişkili siklus sonuçları ile ilişki olup olmadığı da değerlendirildi.

4.1. Uzun GnRH Agonist Protokol ile Esnek Multiple Doz GnRH Antagonist Protokol Uygulanan Grupların İstatiksel Karşılaştırmaları

Agonist protokol (Grup 1) ve antagonist protokol (Grup 2) uygulanan hastaların demografik özellikleri (yaş, vücut kitle indeksi, infertilite süresi, bazal (3. gün) serum hormon değerleri (FSH, E2, LH) arasında istatistiksel farklılık yoktu ($p>0.05$), (Tablo 4.1).

İnfertilite nedenlerine göre gruplar değerlendirildiğinde; her iki grupta infertilite nedenlerinin benzer dağılım gösterdiği izlendi ($p=0.387$) ve erkek faktör infertilitesinin her iki grupta en sık görülen etyolojik neden olduğu görüldü, (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların demografik özellikleri.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
Yaş (Yıl)	28.7 (± 4.8)	28.1 (± 4.4)	0.597 ^a
İnfertilite süresi (ay)	60 (18-204)	63 (12-204)	0.127 ^b
VKİ (kg/m ²)	24.3 (19.9-37.8)	22.3 (17.3-33.4)	0.053 ^b
Bazal FSH (mIU/mL)	6.2 (2.1-11.5)	6.6 (2.3-10.9)	0.348 ^b
Bazal E2 (pg/mL)	41.0 (15.5-232)	38.4 (17-90)	0.791 ^b
Bazal LH (mIU/mL)	5.0 (1.7-15.6)	5.7 (1.6-22.8)	0.184 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Tablo 4.2. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların infertilite nedenlerinin dağılımı.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)
Açıklanamayan infertilite n(%)	13 (32.5)	13 (32.5)
Erkek faktörü n(%)	19 (47.5)	22 (55)
Tubal faktör n(%)	5 (12.5)	1 (2.5)
Ovulatuvar disfonksiyon n(%)	3 (7.5)	4 (10)

Ki-kare testi kullanılmıştır. p=0.387

İki grup arasında siklus süresi, stimulasyon süresi ve kullanılan toplam gonadotropin dozu açısından yapılan karşılaştırma sonucunda anlamlı istatistiksel farklılık saptanmadı (p>0.05), (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Agonist ve antagonist grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
Siklus süresi (gün)	12.8 ±2.4	12.3 ±2.3	0.355
Stimulasyon süresi (gün)	9.4 ±1.9	9.5 ±1.9	0.819
Kullanılan toplam gonadotropin dozu (ampul)	32.4 ±16	28.8 ±8.5	0.220

Student's t testi kullanılmıştır. (±ss)= ±standart sapma

İnsan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonunun yapıldığı gündeki siklus parametreleri her iki grup için değerlendirildi; hCG günü ortalama serum östradiol (E2) düzeyleri (3567.2 pg/ml'ye karşı 2930.8 pg/ml; p=0.151), hCG günü serum luteinize edici hormon (LH) ortanca değerleri (2.83 mIU/mL'ye karşı 1.80 mIU/mL, p= 0.003), hCG günü ortalama serum progesteron düzeylerinden (1.28 ng/mL'ye karşı 1.54 ng/mL; p=0.109) sadece LH düzeyi Grup 1'de Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulundu, (Tablo 4.4).

Ayrıca hCG günü endometrium kalınlığına bakıldığında, grup 1 ve Grup 2 için sırası ile 10.0 mm, 10.4 mm idi ve aralarında anlamlı istatistiksel fark yoktu (p=0.365), (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların hCG günü siklus parametreleri.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
Serum E2 (pg/ml)	3567.2 (±2294.4)	2930.8 (±1565.8)	0.151 ^a
Serum LH (mIU/mL)	2.83 (1.6-11.4)	1.80 (0.28-11.3)	0.003 ^{* b}
Serum Progesteron (ng/mL)	1.28 (±0.61)	1.54 (±0.63)	0.109 ^a
Endometrium kalınlığı (mm)	10.0 (±1.9)	10.4 (±1.8)	0.365 ^a

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Grup 1 ve Grup 2'nin embriyolojik siklus sonuçları değerlendirildiğinde; toplanan oosit sayısı (13.6'ya karşı 13.0; p=0.656) ve toplanan matür oosit (MII) sayısı (11.7'ye karşı 10.9; p=0.518) ortalamaları grup 1'de daha yüksek olmakla beraber iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı, (Tablo 4.5).

Grup 1 ve Grup 2'nin diğer embriyolojik siklus sonuçlarına bakıldığında; 3. gün toplam embriyo sayısı (7.0'a karşı 6.0; p=0.252), 3. gün yüksek kaliteli embriyo (Grade A) sayısı (3.0'a karşı 2.0; p=0.560) ve transfer edilen embriyo sayısı (3.0'a karşı 3.0; p=0.796) ortancaları her iki grupta istatistiksel olarak benzerdi, (Tablo 4.5).

Ayrıca iki grubun gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçlarına bakıldığında; ortalama fertilizasyon oranları (%59.4'e karşı %52.7; p=0.104), implantasyon oranları (%18.4'e karşı 18.7; p=0.865), embriyo transferinin 12-14. günü β hCG pozitifliği (gebelik) oranları (%45'e karşı %42.5; p=0.822), klinik gebelik oranları (%37.5'e karşı %37.5; p=1.000), canlı doğum oranları (%32.5'e karşı %30; p=0.809) istatistiksel olarak benzerdi. Mann Whitney testi kullanılarak hesaplanan implantasyon oranlarının median değeri %0'a denk geldiği için ortalama değerleri de gözönüne alındı, (Tablo 4.6).

İki grup arasında erken gebelik abortus oranları (%13.3'e karşı %20; p=0.644) arasında da anlamlı fark saptanmadı, (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların embriyolojik siklus sonuçları.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
Toplanan oosit sayısı	13.6 ($\pm$ 6.7)	13.0 ($\pm$ 5.0)	0.656 ^a
Matür oosit sayısı	11.7 ($\pm$ 6.3)	10.9 ($\pm$ 4.9)	0.518 ^a
3. gün embriyo sayısı	7.0 (2-20)	6.0 (1-14)	0.252 ^b
3. gün yüksek kaliteli embriyo sayısı	3.0 (0-6)	2.0 (0-5)	0.560 ^b
Transfer edilen embriyo sayısı	3.0 (1-5)	3.0 (1-5)	0.796 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama($\pm$ ss)= $\pm$ standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Ek olarak çoğul gebeliklerin varlığına bakıldığında; her iki grupta da 4 hastada ikiz gebelik ve Grup 2’de ayrıca 1 hastada üçüz gebelik olduğu belirlendi. Bu sonuçlar istatistiksel olarak benzerdi (p=0.455).

Tablo 4.6. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
Fertilizasyon oranı (%)	59.4 ±14.3	52.7 ±21.2	0.104 ^a
İmplantasyon oranı (%) [*]	18.4 ±26.0 0.00 (0-100)	18.7 ±28.7 0.00 (0-100)	0.865 ^b
βhCG pozitifliği (%)	45 (18/40)	42.5 (17/40)	0.822 ^c
Klinik gebelik oranı (%)	37.5 (15/40)	37.5 (15/40)	1.000 ^c
Canlı doğum oranı (%)	32.5 (13/40)	30 (12/40)	0.809 ^c
Abortus oranı (%)	13.3 (2/15)	20 (3/15)	0.624 ^c

a; Student’s t testi , b; Mann-Whitney-U testi, c; Ki-kare testi kullanılmıştır.

* Ortanca değerleri %0 olduğundan ortalama değerler de verilmiştir.

İki grupta Overyan Hiperstimulasyon Sendromu (OHSS) görülme oranları Fisher’s exact testi kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (%7.5’e karşı %10; p=1.000).

Foliküler sıvı markırlarının follikül sıvısındaki konsantrasyonları Grup 1 ve Grup 2 için kıyaslandığında; IGF-I konsantrasyonu (115.9 ng/mL’ye karşı 113.9 ng/mL; p=0.866), IGF-II konsantrasyonu (1251.5 ng/mL’ye karşı 1302.8 ng/mL; p=0.634) ve IGFBP-3 konsantrasyonu (4250 ng/mL’ye karşı 4162.5 ng/mL; p=0.743) ortalamaları iki grupta benzer değerlerdeydi ve aralarında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Diğer üç parametre normal dağılım göstermediğinden ortanca (median) değerlerine göre kıyaslandı. İnhibin-B konsantrasyonu (7550 pg/mL’ye karşı 7900 pg/mL; p=0.620), VEGF konsantrasyonu (958.0 pg/mL’ye karşı 966.0 pg/mL; p=0.773) ve AMH konsantrasyonu (1.6 ng/mL’ye karşı 1.9 ng/mL; p=0.169)

ortancaları açısından da iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark saptanamadı, (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Agonist ve antagonist gruplardaki hastaların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.

	Grup 1 (Agonist) (n=40)	Grup 2 (Antagonist) (n=40)	P değeri
IGF-I (ng/mL)	115.9 ±52.4	113.9 ±55.4	0.866 ^a
IGF-II (ng/mL)	1251.5 ±523.8	1302.8 ±431.1	0.634 ^a
IGFBP-3 (ng/mL)	4250 ±1229.9	4162.5 ±1142.3	0.743 ^a
İnhibin-B (pg/mL)	7550 (1200-45000)	7900 (2660-46600)	0.620 ^b
VEGF (pg/mL)	958 (10-3000)	966 (180-3000)	0.773 ^b
AMH (ng/mL)	1.6 (0-7)	1.9 (1-8)	0.169 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama (±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

4.2. Subgrupların İstatistiksel Karşılaştırmaları

Subgrupların istatistiksel analizleri yapılırken; Grup 1a (Uzun GnRH agonist protokolü, rFSH'a hMG eklenmiş) Grup 1b (Uzun GnRH agonist protokolü, rFSH'a hMG eklenmemiş) ile, Grup 2a (Esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü, rFSH'a hMG eklenmiş) Grup 2b (Esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü, rFSH'a hMG eklenmemiş) ile kıyaslandı.

4.2.1. Uzun GnRH Agonist Protokolü Uygulanan Subgrupların İstatistiksel Karşılaştırmaları

Uzun GnRH agonist protokolü uygulanan subgrupların (Grup 1a ve Grup 1b) demografik verilerinin istatistiksel karşılaştırması sonucunda; Grup 1a'da Grup 1b'ye göre yaş ortalaması (31.1'e karşı 26.2; p=0.001) istatistiksel anlamlı daha yüksek, bazal

LH düzeyi (4.1 mIU/mL'ye karşı 5.9 mIU/mL; p=0.017) ise istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı. Diğer demografik veriler iki grupta benzerdi, (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki hastaların demografik özellikleri.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Yaş (Yıl)	31.1 (± 4.5)	26.2 (± 3.9)	0.001^{* a}
İnfertilite süresi (ay)	72 (28-204)	45 (18-84)	0.059 ^b
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	24.4 (21.2-37.8)	24.3 (19.9-28.4)	0.705 ^b
Bazal FSH (mIU/mL)	6.5 (2.1-11.5)	6.1 (4.6-9.9)	0.372 ^b
Bazal E2 (pg/mL)	41.0 (15.5-232)	38.4 (17-90)	0.181 ^b
Bazal LH (mIU/mL)	4.1 (1.7-8.2)	5.9 (3-15.6)	0.017^{* b}

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

İnfertilite nedenlerine göre uzun GnRH agonist protokolü uygulanan subgruplar karşılaştırıldığında, infertilite nedenlerinin dağılımı istatistiksel olarak farklıydı (p=0.036). Grup 1a'da ovulatuvar disfonksiyon Grup 1b'de ise tubal faktör nedenli infertilitesi olan hasta yoktu, (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki infertilite nedenlerinin dağılımı.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)
Açıklanamayan infertilite n(%)	7 (35)	6 (30)
Erkek faktör n(%)	8 (40)	11 (55)
Tubal faktör n(%)	5 (25)	0 (0)
Ovulatuvar disfonksiyon n(%)	0 (0)	3 (15)

Ki-kare testi kullanılmıştır.

GnRH agonist protokolü uygulanan subgruplar siklus süresi, stimulasyon süresi ve kullanılan toplam gonadotropin dozu açısından karşılaştırıldıklarında; Grup 1a’ da kullanılan toplam gonadotropin dozu (42.9 ampule karşı 21.9 ampul; $p=0.000$) ve stimulasyon süresi (10.1’e karşı 8.8; $p=0.042$) Grup 1b’ye göre istatistiksel anlamlı daha fazlalaydı, (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Siklus süresi (gün)	13.5 $\pm$ 3.0	12.2 $\pm$ 1.4	0.109
Stimulasyon süresi (gün)	10.1 $\pm$ 2.2	8.8 $\pm$ 1.4	0.042*
Kullanılan toplam gonadotropin dozu (ampul)	42.9 $\pm$ 16.5	21.9 $\pm$ 4.7	0.000*

Student’s t testi kullanılmıştır. ($\pm$ ss)= $\pm$ standart sapma

İnsan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonunun yapıldığı gündeki siklus parametreleri Grup 1a ve Grup 1b için değerlendirildiğinde; hCG günü ortalama serum östradiol (E2) düzeyleri (2429.6 pg/ml’ye karşı 4704 pg/ml; $p=0.001$), hCG günü serum luteinize edici hormon (LH) ortanca değerleri (2.38 mIU/mL’ye karşı 3.1 mIU/mL, $p= 0.002$), hCG günü ortalama serum progesteron düzeyleri (1.1 ng/mL’ye karşı 1.4 ng/mL; $p=0.166$) arasından E2 ve LH düzeyi Grup 1a’da Grup 1b’ye göre istatistiksel anlamlı daha düşük bulundu, (Tablo 4.11).

Ayrıca hCG günü endometrium kalınlığına bakıldığında; grup 1a ve Grup 1b için sırası ile 10.3 mm, 9.8 mm idi ve aralarında anlamlı istatistiksel fark yoktu ($p=0.409$), (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların hCG günü siklus parametreleri.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Serum E2 (pg/ml)	2429.6 (±1385.1)	4704 (±2482.5)	0.001^{* a}
Serum LH (mIU/mL)	2.38(1.6-6.5)	3.1 (1.8-11.4)	0.002^{* b}
Serum Progesteron (ng/mL)	1.1 (±0.49)	1.4 (±0.67)	0.166 ^a
Endometrium kalınlığı (mm)	10.3 (±2.1)	9.8 (±1.7)	0.409 ^a

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Grup 1a ve Grup 1b'nin embriyolojik siklus sonuçları değerlendirildiğinde; toplanan oosit sayısı ortalaması (9.9'a karşı 17.3; p=0.000), toplanan matür oosit (MII) sayısı ortalaması (8.7'ye karşı 14.8; p=0.001) ve 3. gün toplam embriyo sayısı ortancası (4.5'e karşı 7.0; p=0.004) Grup 1b'de istatistiksel anlamlı daha yüksek saptandı. 3. gün yüksek kaliteli embriyo (Grade A) sayısı (2.0'a karşı 3.0; p=0.058) ve transfer edilen embriyo sayısı (3.0'a karşı 3.0; p=0.802) ortancaları istatistiksel olarak iki grup için benzerdi, (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların embriyolojik siklus sonuçları.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Toplanan oosit sayısı	9.9 (±4.9)	17.3 (±6.4)	0.000^{* a}
Matür oosit sayısı	8.7 (±4.7)	14.8 (±6.3)	0.001^{* a}
3. gün embriyo sayısı	4.5 (2-14)	7.0 (4-20)	0.004^{*b}
3. gün yüksek kaliteli embriyo sayısı	2.0 (0-5)	3.0 (0-6)	0.058 ^b
Transfer edilen embriyo sayısı	3.0(1-5)	3.0 (1-4)	0.802 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

İki agonist subgrubun gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçlarına bakıldığında; ortalama fertilizasyon oranları (%58.7'ye karşı %60.0; p=0.770), implantasyon oranları (%16.8'e karşı 20.0; p=0.939), embriyo transferinin 12-14. günü β hCG pozitifliği(gebelik) oranları (%55'e karşı %35; p=0.204), klinik gebelik oranları (%40'a karşı %35; p=0.744), canlı doğum oranları (%35'e karşı %30; p=0.736) iki grupta istatistiksel olarak benzerdi. Mann Whitney testi kullanılarak hesaplanan implantasyon oranlarının median değeri %0'a denk geldiği için ortalama değerleri de göz önüne alındı, (Tablo 4.13).

İki grup arasında erken gebelik abortus oranlarının da istatistiksel olarak benzer olduğu görüldü (%12.5'e karşı %14.3; p=0.919), (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Fertilizasyon oranı (%)	58.7 $\pm$ 16.2	60.0 $\pm$ 12.4	0.770 ^a
İmplantasyon oranı (%)	16.8 $\pm$ 20.9 0.00 (0-67)	20.0 $\pm$ 30.8 0.00 (0-100)	0.939 ^b
β hCG pozitifliği (%)	55 (11/20)	35 (7/20)	0.204 ^c
Klinik gebelik oranı (%)	40 (8/20)	35 (7/20)	0.744 ^c
Canlı doğum oranı (%)	35 (7/20)	30 (6/20)	0.736 ^c
Abortus oranı (%)	12.5 (1/8)	14.3 (1/7)	0.919 ^c

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi, c; Ki-kare testi kullanılmıştır.

* Ortanca değerleri %0 olduğundan ortalama değerler de verilmiştir.

Ek olarak çoğul gebeliklerin varlığına bakıldığında; Grup 1a'da 1 hastada Grup 1b'de 3 hastada ikiz gebelik olduğu belirlendi. Bu sonuçlar istatistiksel olarak

benzerdi ($p=0.185$). İki grupta Overyan Hiperstimulasyon Sendromu (OHSS) görülme oranları Fisher's exact testi kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı (%5'e karşı %10; $p=1.000$).

Foliküler sıvı markırlarının follikül sıvısındaki konsantrasyonları Grup 1a ve Grup 1b için değerlendirildiğinde; IGF-I konsantrasyonu (98.2 ng/mL 'ye karşı 133.7 ng/mL ; $p=0.030$), IGF-II konsantrasyonu (1100.8 ng/mL 'ye karşı 1402.2 ng/mL ; $p=0.068$) ve IGFBP-3 konsantrasyonu (4115.0 ng/mL 'ye karşı 4385 ng/mL ; $p=0.495$) ortalamaları IGF-I dışında iki grup için istatistiksel olarak benzerdi. IGF-I'in konsantrasyonu Grup 1b'de Grup 1a'ya göre istatistiksel anlamlı daha yüksekti, (Tablo 4.14).

Diğer üç parametre normal dağılım göstermediğinden ortanca (median) değerlerine göre kıyaslandı. İnhibin-B konsantrasyonu (6450.0 pg/mL 'ye karşı 9300.0 pg/mL ; 0.829), VEGF konsantrasyonu (1052.0 pg/mL 'ye karşı 932.0 pg/mL ; 0.903) ve AMH konsantrasyonu (1.15 ng/mL 'ye karşı 2.0 ng/mL ; $p=0.019$) ortancaları AMH dışında iki grup için istatistiksel olarak benzerdi. AMH'nin konsantrasyonu Grup 1b'de Grup 1a'ya göre istatistiksel anlamlı daha yüksekti, (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Agonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.

	Grup 1a (n=20) (Agonist, hMG eklenen)	Grup 1b (n=20) (Agonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
IGF-I (ng/mL)	98.2 ± 46.2	133.7 ± 53.2	0.030^a
IGF-II (ng/mL)	1100.8 ± 469.3	1402.2 ± 543.2	0.068^a
IGFBP-3 (ng/mL)	4115.0 ± 1348.0	4385.0 ± 1117.9	0.495^a
İnhibin-B (pg/mL)	6450.0 (2700-45000)	9300.0 (1200-36800)	0.829^b
VEGF (pg/mL)	1052.0 (160-3000)	932.0 (10-3000)	0.903^b
AMH (ng/mL)	1.15 (1-5)	2.0 (0-7)	0.019^a

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama ($\pm ss$)= $\pm$ standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

4.2.2. Esnek Multiple Doz GnRH Antagonist Protokolü Uygulanan Subgrupların İstatiksel Karşılaştırılmaları

Esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü uygulanan subgrupların (Grup 2a ve Grup 2b) demografik özelliklerinin istatistiksel karşılaştırılması sonucunda; iki grup arasında demografik özellikler açısından anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ($p>0.05$), (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki hastaların demografik özellikleri.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Yaş (Yıl)	27.8 ($\pm$ 5.1)	28.4 ($\pm$ 3.6)	0.672 ^a
İnfertilite süresi (ay)	60 (18-204)	78 (12-180)	0.241 ^b
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	21.4 (17.6-33.4)	24.5 (17.3-32.1)	0.204 ^b
Bazal FSH (mIU/mL)	7.0 (2.3-10.9)	6.5 (3.8-9.9)	0.250 ^b
Bazal E2 (pg/mL)	38.9 (23-71)	36.0 (17-90)	0.465 ^b
Bazal LH (mIU/mL)	5.3 (2.2-10)	5.9 (1.6-22.8)	0.655 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama($\pm$ ss)= $\pm$ standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

İnfertilite nedenlerine göre esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü uygulanan subgruplar (Grup 2a ve Grup 2b) karşılaştırıldığında, infertilite nedenlerinin dağılımı iki grupta istatistiksel anlamda benzerdi ($p=0.228$), (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen gruplardaki infertilite nedenlerinin dağılımı.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)
Açıklanamayan infertilite n (%)	5 (25)	8 (40)
Erkek faktör n (%)	14 (70)	8 (40)
Tubal faktör n (%)	0 (0)	1 (5)
Ovulatuvar disfonksiyon n (%)	1 (5)	3 (15)

Ki-kare testi kullanılmıştır.

Multiple doz GnRH antagonist protokolü uygulanan subgruplar (Grup 2a ve Grup 2b) siklus süresi, stimülasyon süresi ve kullanılan toplam gonadotropin dozu açısından karşılaştırıldıklarında; sadece Grup 2a’ da kullanılan toplam gonadotropin dozu (31.6 ampule karşı 26.1 ampul; $p=0.042$) Grup 1b’ye göre istatistiksel anlamlı daha yüksekti. Diğer tedavi karakteristikleri açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu, (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların tedavi karakteristikleri ile ilgili veriler.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Siklus süresi (gün)	12.5 $\pm$ 2.1	12.2 $\pm$ 2.5	0.740
Stimülasyon süresi (gün)	9.6 $\pm$ 1.9	9.5 $\pm$ 1.9	0.810
Kullanılan toplam gonadotropin dozu (ampul)	31.6 $\pm$ 9.4	26.1 $\pm$ 6.7	0.042*

Student’s t testi kullanılmıştır. ($\pm$ ss)= $\pm$ standart sapma

İnsan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonunun yapıldığı gündeki siklus parametreleri Grup 2a ve Grup 2b için değerlendirildiğinde; hCG günü ortalama serum östradiol (E2) düzeyleri (2750.9 pg/ml'ye karşı 3110.8 pg/ml; p=0.475), hCG günü serum luteinize edici hormon (LH) ortanca değerleri (1.8 mIU/mL'ye karşı 1.8 mIU/mL, p= 0.824), hCG günü ortalama serum progesteron düzeyleri (1.5 ng/mL'ye karşı 1.5ng/mL; p=0.932) açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu, (Tablo 4.18).

Ayrıca hCG günü endometrium kalınlığına bakıldığında, grup 2a ve Grup 2b için sırası ile 10.3 mm, 10.5 mm idi ve aralarında anlamlı istatistiksel fark yoktu (p=0.662), (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların hCG günü siklus parametreleri.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Serum E2 (pg/ml)	2750.9 (±1287.1)	3110.8 (±1287.1)	0.475 ^a
Serum LH (mIU/mL)	1.8 (0.28-9.5)	1.8 (0.89-11.3)	0.824 ^b
Serum Progesteron (ng/mL)	1.5 (±0.56)	1.5 (±0.73)	0.932 ^a
Endometrium kalınlığı (mm)	10.3 (±2.2)	10.5 (±1.5)	0.662 ^a

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Grup 2a ve Grup 2b'nin embriyolojik siklus sonuçları değerlendirildiğinde; toplanan oosit sayısı (11.6'a karşı 14.4; p=0.088) ve toplanan matür oosit (MII) sayısı (9.8'e karşı 12.1; p=0.142) ortalamaları açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı, (Tablo 4.19).

Grup 2a ve Grup 2b'nin diğer embriyolojik siklus sonuçlarına bakıldığında; 3. gün toplam embriyo sayısı (5.0'e karşı 6.5; p=0.103), 3. gün yüksek kaliteli

embriyo (Grade A) sayısı (2.0'a karşı 3.0; p=0.078) ve transfer edilen embriyo sayısı (3.0'a karşı 3.0; p=0.362) ortancaları iki grup için istatistiksel olarak benzerdi, (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların embriyolojik siklus sonuçları.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Toplanan oosit sayısı	11.6 (±5.5)	14.4 (±4.2)	0.088 ^a
Matür oosit sayısı	9.8 (±5.0)	12.1 (±4.5)	0.142 ^a
3. gün embriyo sayısı	5.0 (2-13)	6.5 (1-14)	0.103 ^b
3. gün yüksek kaliteli embriyo sayısı	2.0 (0-5)	3.0 (0-5)	0.078 ^b
Transfer edilen embriyo sayısı	3.0 (2-4)	3.0 (1-5)	0.362 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

Ayrıca iki antagonist subgrubun gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçlarına bakıldığında; ortalama fertilizasyon oranları (%50.6'ya karşı %54.8; p=0.534), implantasyon oranları (%13.7'ye karşı 23.75; p=0.318), embriyo transferinin 12-14. günü βhCG pozitifliği (gebelik) oranları (%35'e karşı %50; p=0.337), klinik gebelik oranları (%30'a karşı %45; p=0.327), canlı doğum oranları (%25'e karşı %35; p=0.490) olarak saptandı. Mann Whitney testi kullanılarak hesaplanan implantasyon oranlarının median değeri %0'a denk geldiği için ortalama değerleri de göz önüne alındı, (Tablo 4.20).

Ek olarak çoğul gebeliklerin varlığına bakıldığında; her iki grupta da 2 hastada ikiz gebelik olduğu, ayrıca Grup 2b'de 1 hastada üçüz gebelik olduğu belirlendi. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.659). İki grup arasında erken gebelik abortus oranları istatistiksel olarak benzerdi (%16.7'ye karşı %22.2; p=0.792), (Tablo 4.20).

İki grupta Overyan Hiperstimulasyon Sendromu (OHSS) görülme oranları Fisher's exact testi kullanılarak karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (%10'e karşı %10; p=1.000).

Tablo 4.20. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçları.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
Fertilizasyon oranı (%)	50.6 ±20.5	54.8 ±22.3	0.534 ^a
İmplantasyon oranı (%)	13.7 ±23.4 0.00 (0-67)	23.75±33.0 0.00 (0-100)	0.318 ^b
βhCG pozitifliği (%)	35 (7/20)	50 (10/20)	0.337 ^c
Klinik gebelik oranı (%)	30 (6/20)	45 (9/20)	0.327 ^c
Canlı doğum oranı (%)	25 (5/20)	35 (7/20)	0.490 ^c
Abortus oranı (%)	16.7 (1/6)	22.2 (2/9)	0.792 ^c

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi, c; Ki-kare testi kullanılmıştır.

Ortalama(±ss)= ±standart sapma

Foliküler sıvı markırlarının follikül sıvısındaki konsantrasyonları Grup 2a ve Grup 2b için kıyaslandığında; IGF-I konsantrasyonu (107.1 ng/mL'ye karşı 120.6ng/mL; p=0.449), IGF-II konsantrasyonu (1296.2 ng/mL'ye karşı 1309.4 ng/mL; p=0.924) ve IGFBP-3 konsantrasyonu (4045.0 ng/mL'ye karşı 4280.0 ng/mL; p=0.522) ortalamaları açısından iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu, (Tablo 4.21).

Diğer üç parametre normal dağılım göstermediğinden ortanca (median) değerlerine göre kıyaslandı. İnhibin-B konsantrasyonu (5900.0 pg/mL'ye karşı 10725.0 pg/mL; 0.064), VEGF konsantrasyonu (910.0 pg/mL'ye karşı 1070.0 pg/mL; 0.351) ve AMH konsantrasyonu (1.45 ng/mL'ye karşı 2.4 ng/mL; p=0.019) ortancaları AMH dışında iki grup için istatistiksel olarak benzerdi. AMH'nin konsantrasyonu Grup 2b'de Grup 2a'ya göre istatistiksel anlamlı daha yüksekti, (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. Antagonist protokolde hMG eklenen ve eklenmeyen grupların folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.

	Grup 2a (n=20) (Antagonist, hMG eklenen)	Grup 2b (n=20) (Antagonist, hMG eklenmeyen)	P değeri
IGF-I (ng/mL)	107.1 ±58.5	120.6 ±52.8	0.449 ^a
IGF-II (ng/mL)	1296.2 ±495.3	1309.4 ±368.9	0.924 ^a
IGFBP-3 (ng/mL)	4045.0 ±1242.0	4280.0 ±1051.6	0.522 ^a
İnhibin-B (pg/mL)	5900.0 (2660-24400)	10725.0 (3500-46600)	0.064 ^b
VEGF (pg/mL)	910.0(180-3000)	1070.0 (396-2834)	0.351 ^b
AMH (ng/mL)	1.45 (1-5)	2.4 (1-8)	0.006^{* b}

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama (±ss)= ±standart sapma, ortanca (min-maks)=minimum-maksimum

4.3. Folliküler Sıvı Markırları ile Siklus Sonuçları Arasındaki İlişkilerin İstatiksel Analizleri

Toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı ve yüksek kalite embriyo sayısı ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. AMH konsantrasyonu ile toplanan oosit sayısı ve matür oosit sayısı arasında (sırası ile $r=0.300$; $p=0.007$ ve $r=0.253$; $p=0.024$) istatiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon, VEGF ile yüksek kalite embriyo sayısı arasında ($r = -0.278$; $p=0.012$) istatiksel olarak anlamlı negatif korelasyon olduğu saptandı, (Tablo 4.22).

Fertilizasyon oranları ile foliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucunda fertilizasyon oranları ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon tespit edilmedi, (Tablo 4.22).

İmplantasyon oranları ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı da Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucunda yalnızca AMH ile implantasyon oranları arasında

istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r = 0.227$; $p = 0.045$), (Tablo 4.22).

Embriyo transferinin 12-14. günü β hCG pozitifliği olması (gebelik) ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucunda gebelik ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon tespit edilmedi.

Klinik gebelik ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucunda klinik gebelik ile IGF-II ve VEGF konsantrasyonları arasında negatif korelasyon olduğu saptandı (sırası ile $r = -0.220$; $p = 0.049$, $r = -0.250$; $p = 0.025$), (Tablo 4.22).

Canlı doğum ile folliküler sıvı markırları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı da Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak değerlendirildi. Analiz sonucunda canlı doğum ile IGF-II ve VEGF konsantrasyonları arasında negatif korelasyon olduğu saptandı (sırası ile $r = -0.277$; $p = 0.013$, $r = -0.342$; $p = 0.002$), (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. Folliküler sıvı markırları ile siklus sonuçları arasındaki korelasyonlar.

	Toplanan oosit sayısı	Matür oosit sayısı	Yüksek Kaliteli Embriyo	Fertilizasyon oranı	İmplantasyon oranı	Klinik gebelik	Canlı doğum
IGF-I	$r = 0.044$ $p = 0.697$	$r = 0.017$ $p = 0.878$	$r = 0.023$ $p = 0.836$	$r = 0.125$ $p = 0.270$	$r = -0.003$ $p = 0.978$	$r = -0.062$ $p = 0.583$	$r = -0.098$ $p = 0.389$
IGF-II	$r = 0.134$ $p = 0.235$	$r = 0.095$ $p = 0.400$	$r = -0.142$ $p = 0.210$	$r = -0.027$ $p = 0.812$	$r = -0.104$ $p = 0.364$	$r = -0.220$ $p = 0.049^*$	$r = -0.277$ $p = 0.013^*$
IGFBP-3	$r = 0.066$ $p = 0.558$	$r = 0.027$ $p = 0.810$	$r = -0.106$ $p = 0.348$	$r = 0.007$ $p = 0.951$	$r = -0.121$ $p = 0.291$	$r = -0.193$ $p = 0.086$	$r = -0.195$ $p = 0.083$
İnhibin-B	$r = 0.134$ $p = 0.236$	$r = 0.046$ $p = 0.688$	$r = 0.076$ $p = 0.502$	$r = -0.091$ $p = 0.420$	$r = 0.055$ $p = 0.635$	$r = 0.162$ $p = 0.152$	$r = 0.123$ $p = 0.278$
VEGF	$r = -0.104$ $p = 0.361$	$r = -0.106$ $p = 0.348$	$r = -0.278$ $p = 0.012^*$	$r = 0.015$ $p = 0.894$	$r = -0.196$ $p = 0.086$	$r = -0.250$ $p = 0.025^*$	$r = -0.342$ $p = 0.002^*$
AMH	$r = 0.300$ $p = 0.007^*$	$r = 0.253$ $p = 0.024^*$	$r = 0.191$ $p = 0.089$	$r = -0.139$ $p = 0.218$	$r = 0.227$ $p = 0.045^*$	$r = 0.194$ $p = 0.085$	$r = 0.168$ $p = 0.137$

Parametrik verilerde Pearson Korelasyon Katsayısı, non-parametriklerde Spearman Korelasyon Katsayısı kullanılmıştır. r = Korelasyon katsayısı.

Klinik gebelik ve folliküler sıvı markırları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; klinik gebeliği olan hastalarda IGF-II ve VEGF konsantrasyonlarının klinik gebelik oluşmayan hastalara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı (sırası ile 1105 ng/mL'ye karşı 1357.8 ng/mL; $p=0.049$, 714 pg/mL'ye karşı 1028 pg/mL; $p=0.026$). Diğer folliküler sıvı markırları açısından klinik gebeliği olan ve olmayanlar arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu, (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. Klinik gebelik pozitif ve negatif olanlarda folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.

	Klinik gebelik pozitif	Klinik gebelik negatif	P değeri
IGF-I (ng/mL)	110.6 $\pm$ 60.1	117.5 $\pm$ 49.7	0.583 ^a
IGF-II (ng/mL)	1105 $\pm$ 562.7	1357.8 $\pm$ 402.8	0.049^{a *}
IGFBP-3 (ng/mL)	3913.3 $\pm$ 1360.9	4382 $\pm$ 1032.2	0.086 ^a
İnhibin-B (pg/mL)	9350(3100-45000)	6650(1200-46600)	0.151 ^b
VEGF (pg/mL)	714 (10-3000)	1028(10-3000)	0.026^{b *}
AMH (ng/mL)	2.0(1-8)	1.55(0-7)	0.085 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama, ($\pm$ ss)= $\pm$ standart sapma, ortanca, (min-maks)=minimum-maksimum

Canlı doğum ile sonuçlanan gebelikler ile folliküler sıvı markırları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; aynen klinik gebeliği olan hastalardaki gibi siklusu canlı doğum ile sonuçlanan hastalarda IGF-II ve VEGF konsantrasyonlarının canlı doğum gerçekleştiremeyen hastalara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı (sırası ile 1103.2 ng/mL'ye karşı 1356.2 ng/mL; $p=0.027$, 600 pg/mL'ye karşı 1048 pg/mL; $p=0.002$). Diğer folliküler sıvı markırları için anlamlı istatistiksel fark saptanmadı, (Tablo 4.24).

Tablo 4.24. Canlı doğum pozitif ve negatif olanlarda folliküler sıvı markırlarının konsantrasyonları.

	Canlı doğum pozitif	Canlı doğum negatif	P değeri
IGF-I (ng/mL)	108.2 ±62.3	117.9 ±49.4	0.453 ^a
IGF-II (ng/mL)	1103.2 ±594.8	1356.2 ±394.6	0.027^a *
IGFBP-3 (ng/mL)	3828 ±1395.9	4378.1 ±1037	0.053 ^a
İnhibin-B (pg/mL)	9100(3100-45000)	7300(1200-46600)	0.276 ^b
VEGF (pg/mL)	600(10-3000)	1048(10-3000)	0.002^b *
AMH (ng/mL)	2.0(1-8)	1.6(0-7)	0.136 ^b

a; Student's t testi , b; Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır.

Ortalama, (±ss)= ±standart sapma, ortanca, (min-maks)=minimum-maksimum

5. TARTIŞMA

İdeal koşullarda ovulasyon sonucunda oluşan matür ve fertilizasyon kapasitesi olan oosit gelişimi için, follikülogenez esnasında gonadotropinlerin ve intraoveryan otokrin-parakrin faktörlerin harmonik olarak düzenlenmesi gerekir. Folliküler ve oosit matürasyon süreci karmaşık bir şekilde birbirine bağlanmış trofik değişiklikler kompleksidir. Overyan follikül sıvısı incelenerek, granüloza hücrelerinde sentezlenerek oosit büyümesini ve matürasyonunu etkileyen faktörlerin folliküler maturasyon üzerine etkileri açıklanabilir.

Günümüzde KOH uygulanan sikluslarda endojen hipofizer gonadotropin stimülasyonunu baskılamak için GnRH agonist ve GnRH antagonistleri yaygın şekilde kullanıldığını bilmekteyiz.^{2,3} GnRH'nın over, uterus ve plasenta gibi hipofiz bezi dışındaki bazı dokularda da spesifik reseptörlere bağlandığı da gösterilmiştir.⁴⁻⁶ Dolayısıyla dışardan verdiğimiz GnRH agonist ve antagonistleri hipofiz bezindeki reseptörlerine ek olarak over dokusundaki reseptörleri de etkileyerek overyan parakrin ve otokrin sinyallerde değişikliklere yol açarak folliküler mikroçevreyi ve follikülogenezi etkileyebilirler. Ancak farklı etki mekanizmaları olması nedeniyle GnRH antagonist protokol ile GnRH agonist protokol uygulanan KOH sikluslarında meydana gelen folliküler mikroçevrenin birbirinden farklı olabileceği dolayısıyla agonist ve antagonist sikluslar arasında folliküler büyüme paterninde ve oosit maturasyonunda farklılıklar olabileceği daha önce yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür.¹⁵⁻¹⁷

Şimdiye kadar yapılan pek çok çalışmada YÜT uygulanan hastalarda folliküler sıvı ve kan serumu analizleri ile intraoveryan faktörlerin tedavi sonuçları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Biz yaptığımız bu çalışmada; uzun GnRH agonist protokol veya esnek (*flexible*) multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan hastaların follikül sıvılarındaki IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF ve AMH konsantrasyonları ile siklus sonuçlarını değerlendirdik. Farklı stimülasyon protokolü uygulanan gruplar arasında folliküler sıvı markırı konsantrasyonları açısından fark olup olmadığını ve folliküler sıvı markırları ile toplanan oosit sayısı, embriyo kalitesi, fertilizasyon

oranları, implantasyon oranları, erken gebelik oranları ve canlı doğum oranları arasında ilişki olup olmadığını araştırdık. Ayrıca stimülasyon protokolüne LH eklenen ve eklenmeyen subgrupları da birbirleriyle kıyasladık.

Uzun GnRH agonist protokol ve esnek (flexible) multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan gruplar

Öncelikle uzun GnRH agonist protokol ile esnek (flexible) multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan grupların istatistiksel karşılaştırmalarını gerçekleştirdik. Her iki gruptaki hastaların yaş, infertilite süresi, infertilite nedeni, siklusun 3. günü (bazal) hormon düzeyleri, VKİ gibi demografik özellikleri ve stimülasyon süresi, kullanılan toplam gonadotropin dozu gibi tedavi karakteristikleri istatistiksel olarak analiz edildi. İki grup arasında demografik özellikler ve tedavi karakteristikleri açısından fark bulunmadı. Dolayısıyla grupların KOH sonuçları ve folliküler sıvı markırı konsantrasyonları açısından kıyaslanabilir olduğu gösterildi.

Günümüze kadar agonist protokol ile antagonist protokolün sonuçlarını kıyaslayan birçok çalışma yapılmış ancak sınırlı sayıda derleme yayınlanmıştır. İlk olarak Ludwing tarafından yapılan agonist ve antagonist protokolü kıyaslayan metaanalizde altı prospektif randomize ve bir retrospektif kontrollü çalışmanın verileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların beşinde sabit multiple doz ikisinde tek doz antagonist protokol uygulanmış, antagonist olarak üçünde ganirelix diğerlerinde cetoreliks kullanılmıştır. Toplanan oosit sayısının antagonist protokollerde daha düşük olduğu ancak klinik gebelik oranlarının sadece ganireliks kullanılan gruplarda uzun agonist protokole göre düşük olduğu, cetoreliks kullanılan gruplarda ise bu oranın uzun agonist protokolle benzer olduğu ve istatistiksel fark olmadığı bildirilmiştir.⁸¹

Takiben en sonuncusu 2006 yılında yayınlanan üç derlemede agonist ve antagonist protokoller kıyaslanmıştır. Bunlardan ilkinde 5 randomize kontrollü çalışma değerlendirilmiş (dördünde sabit multiple doz, birinde tek doz antagonist protokolü uygulanmış); antagonist protokolde agonist protokole göre daha az oosit toplandığını, agonist protokolde transfer edilen iyi kalite embriyo sayısı ile aynı sayıda embriyo transferi yapılmasına rağmen antagonist protokol uygulananlarda klinik gebeliğin istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun antagonistlerin endometrium ve implantasyon üzerine olan etkilerinden

kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca hasta özelliklerinin de dikkate alındığı esnek antagonist protokollerin geliştirilmesi ile klinik sonuçlarda iyileşme olabileceğini bildirmişlerdir.⁸² İkinci derleme yine Al-Inany ve arkadaşları tarafından yapılmış ve 27 randomize kontrollü çalışma değerlendirilmiştir. Yirmiyedi çalışmanın onüçünde esnek multiple doz antagonist diğerlerinde ya tek doz veya sabit multiple doz antagonist protokolü uygulanmıştır. Önceki derlemelerindekine benzer şekilde toplanan oosit sayısının, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının antagonist gruplarda istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.⁸³ En son yapılan derlemede (metaanaliz) Kolibianakis ve arkadaşları tarafından 22 randomize kontrollü çalışma değerlendirilmiş; antagonist grupta daha az sayıda oosit toplanmasına rağmen canlı doğum oranlarının agonist protokol uygulananlardan farklı olmadığı (canlı doğum oranları agonist grupta %2.7 daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı değil) bildirilmiştir. Bu derlemedeki yirmiiki çalışmanın onüçünde esnek multiple doz antagonist protokolü (önceki derlemelere göre daha yüksek oranda) uygulanmıştır.⁸⁴ Yapılan üç derlemede de stimülasyon süresinin, kullanılan gonadotropin dozunun antagonist grupta daha düşük olduğu dolayısıyla toplanan oosit sayısının ve OHSS gelişiminin de bu grupta daha düşük olmasının beklenen bir sonuç olduğu belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise toplanan oosit ve matür oosit sayısı, 3. gün embriyo ve yüksek kaliteli embriyo sayısı gibi embriyolojik siklus sonuçları için yapılan istatistiksel analizde iki grup arasında fark saptanmadı (sırası ile $p=0.656$, $p=0.518$, $p=0.252$, $p=0.560$). Her iki gruptaki hastalara benzer sayıda ve kalitede embriyo transferi yapıldı. Fertilizasyon ve implantasyon oranları, gebelik, klinik gebelik, canlı doğum ve abortus oranları da istatistiksel olarak her iki grup için benzerdi (sırası ile $p=0.104$, $p=0.865$, $p=0.822$, $p=1.000$, $p=0.809$ ve $p=0.624$).

Ludwig ve arkadaşları antagonist tedavisine sabit günde baslamaktan ziyade folliküler gelişmenin erken safhasının daha az etkilendiği, antagonistlerin kişiye özgün günde başlandığı esnek (flexible) protokollerin daha etkili olabileceğini ileri sürmüşler⁸¹ ve yaptıkları prospektif randomize çalışmalarında daha düşük gonadotropin dozları kullanmalarına rağmen toplanan oosit sayılarının ve serum östradiol (E2) seviyelerinin esnek multiple doz antagonist protokolde sabit multiple

doz antagonist protokole göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.⁸⁵

Loutradis ve arkadaşları ise antagonist protokolde hCG günü serum östrodiol (E2) değerlerinin düşük olmasının gebelik oranlarının daha düşük olmasına neden olduğu hipotezini kurmuşlar ve düşük serum E2 düzeylerini ICSI sırasında ani membran kırılması, etkilenmiş stoplazmik maturasyon ve etkilenmiş endometrial reseptiviteyle ilişkilendirmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı antagonist protokolü modifiye ederek esnek multiple doz şeklinde uygulamışlar ve uzun agonist protokol ile kıyaslamışlardır. Çalışmanın sonucunda; hCG günü serum östradiol (E2) değerlerinin, toplanan oosit ve iyi kalite embriyo sayılarının, implantasyon ve klinik gebelik oranlarının iki grup arasında istatistiksel olarak farklı olmadığını saptamışlardır. Ancak bu çalışmada öncekilerden farklı olarak her iki grupta kullanılan gonadotropin dozu ve stimülasyon süresinin benzer olduğu görülmüştür.⁸⁶

Wikland çalışmasında, antagonist siklularda başlangıç dozunun ve toplam gonadotropin dozunun daha yüksek olmasının daha fazla toplanan oosit sayısı ile sonuçlanacağını ancak siklus sonuçlarının değişmeyeceğini ileri sürmüştür.⁸⁷

Biz de çalışmamızda antagonist protokol uygulananlarda tedaviyi optimize etmek için esnek (*flexible*) multiple doz protokolünü kullandık. Başlangıç gonadotropin dozlarını hastanın tedaviye cevap beklentimize göre, siklus boyunca doz ayarlamasını ise over cevabına göre belirledik. Çalışmamızın sonucunda agonist ve antagonist siklusların embriyolojik ve gebelikle ilişkili sonuçlarının önceki iki metaanalizden^{82, 83} farklı olarak istatistiksel anlamda benzer olmasını iki grubun hasta dermografik özelliklerinin, stimülasyon sürelerinin, kullanılan toplam gonadotropin dozlarının benzer olması, zayıf overyan yanıtı hastaların (*poor responder*) çalışmaya dahil edilmemesi ve kişiselleştirilmiş esnek multiple doz antagonist protokolü uygulamamız ile ilişkilendirdik.

GnRH reseptör mRNA'sının over dokusunda granüloza hücrelerinde gösterilmiş olması çalışmacıların bu konuya yoğunlaşmasına neden olmuştur. GnRH reseptör mRNA'sının regülasyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda bu reseptörlerin ve ekspresyonlarının GnRH ile arttığı (up regüle), hCG ile azaldığı (down regüle) tespit edilmiştir.⁷ Brus ve arkadaşları GnRH reseptörlerinin over dokusunda LH piki oluşuktan sonra baskın olarak bulunduğunu ancak preovulatuvar foliküllerde tespit

edilemediğini ileri sürmüşlerdir.⁸⁸ Dolayısıyla GnRH reseptörlerinin insan over dokusunda bulunmasına rağmen fonksiyonel olup olmadığı halen net değildir. Agonist ve antagonist protokollerin tedavi sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda antagonist protokol uygulanan grubun sonuçlarının daha az başarılı olması çalışmacıları acaba GnRH analoglarının bu reseptörler üzerinde etkisi var mı sorusuna götürmüştür. Antagonistlerin, GnRH'nın overyan otokrin ve parakrin sinyal sistemini bozarak intrafolliküler mikroçevreyi değiştirebileceği dolayısıyla agonistlere göre antagonistlerde KOH sonuçlarının daha az başarılı olmasının bu değişikliklerle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Literatürde GnRH analoglarının folliküler otokrin ve parakrin faktörler üzerine etkisini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır.

IGF otokrin ve parakrin sistemi folliküler gelişimin otokrin ve parakrin regülasyonunda temel rol oynar.

Emons ve arkadaşları yaptıkları invitro çalışmada, GnRH antagonistlerinin IGF'lerin sentezini ve büyümeyi stimule edici etkilerini azaltarak hücre büyümesini sınırladıklarını yayınlamıştır.⁸⁹

Choi ve arkadaşları IVF-ET sikluslarında KOH amacıyla uzun agonist ve esnek multiple doz antagonist protokol uygulanan 68 hastanın follikül sıvılarındaki IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-4 ve PAPP-A konsantrasyonlarını kıyaslamış; agonist protokol uygulanan grupta IGF-II ve IGFBP-4 konsantrasyonlarını anlamlı derecede daha yüksek, IGF-I/IGFBP-4 oranının ise anlamlı derecede daha düşük olduğunu ancak mikroçevredeki bu farklılığın klinik sonuçlar üzerinde fark yaratmadığını bildirmişlerdir.¹⁴ Bu çalışmanın öncesinde yapılmış farklı bir çalışmada ise antagonistlerin IGF-II konsantrasyonlarında değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir.⁹⁰

2006 yılında yayınlanan iki farklı çalışmada folliküler IGF-I konsantrasyonlarının KOH amacıyla agonist ve antagonist protokol uygulanan hastalarda benzer olduğu saptanmıştır.^{73,91}

Ferrari ve arkadaşları ise tüm bu sonuçlardan farklı olarak antagonist protokol uygulananlarda folliküler IGF-I konsantrasyonun istatistiksel anlamlı daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu sonucu açıklarken antagonistlerle follikül gelişiminin daha kötü olduğunu ve apoptozun daha yüksek oranda görüldüğünü bildiren hayvan

çalışmalarını temel almışlar ve antagonistlerde görülen artmış apoptoza yanıt olarak IGF-I'in arttığını ileri sürmüşlerdir.⁹²

Biz çalışmamızda folliküler IGF-I, IGF-II ve IGFBP-3 konsantrasyonlarının ortalamalarının her iki tedavi protokolünde de istatistiksel olarak benzer olduğunu tespit ettik (sırası ile 115.9 ng/mL'ye karşı 113.9 ng/mL; $p=0.866$, 1251.5 ng/mL'ye karşı 1302.8 ng/mL; $p=0.634$, 4250 ng/mL'ye karşı 4162 ng/mL; $p=0.743$). IGF sistemi ile ilişkili şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçları çelişkili olsada elde ettiğimiz bu sonuç GnRH reseptörünün preovulatuvar folliküllerde eksprese olmadığı ancak LH piki oluşuktan sonra baskın olarak bulundukları⁸⁸ dolayısıyla hCG öncesi uyguladığımız farklı GnRH analogları ile folliküler mikroçevrenin farklı şekilde etkileneceği görüşünü desteklemiştir. Ek olarak IGF'lerin ve IGFBP'lerin folliküler üretimlerinin ekzojen gonadotropinlerle regüle edildiği ve over rezervi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.³⁰ Dolayısıyla çalışmamızdaki her iki KOH protokolünde kullanılan toplam gonadotropin dozunun ve hastaların yaş, 3. gün (bazal) hormon düzeyleri gibi dermografik özelliklerinin benzer olduğunu göz önüne alırsak elde ettiğimiz sonuç beklenmedik bir durum değildir.

Antimülleryan hormonun (AMH) da follikülogenezde lokal regülatör olarak rol oynaması follikül sıvısındaki konsantrasyonunun farklı KOH protokollerinden nasıl etkilendiğinin araştırılmasına neden olmuştur ancak yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmanın sonuçları IGF sisteminde olduğu gibi çelişkilidir.

Agonist ve antagonist protokollerin folliküler AMH konsantrasyonu üzerine olan etkilerinin kıyaslandığı 87 vakalık ilk çalışma 2008 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yayınlanmış ve folliküler AMH konsantrasyonu açısından iki grup arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.⁷¹ Yakın zamanda 74 vakalık ikinci çalışmalarını yapmışlar ve yine iki grup arasında fark olmadığını göstermişlerdir.⁹³

Winkler ve arkadaşları insan granüloza hücre kültürü kullanarak yaptıkları çalışmalarında; GnRH antagonistlerinin granüloza hücrelerine direkt etki ederek AMH ekspresyonunu doz bağımlı şekilde azalttıklarını, GnRH agonistlerinin ise granüloza hücrelerine direkt etki ederek AMH ekspresyonunu doz bağımlı şekilde artırdıklarını gözlemlemişlerdir. Bu etkilerin transkripsiyon faktörleri aracılığıyla ortaya çıktığını saptamışlardır.⁹⁴

Baarends ve arkadaşları ise GnRH antagonisti ve rekombinat FSH'ı kombine şekilde kullanarak rat overinde AMH ekspresyonunun tüm folliküllerde olmamakla birlikte preantral ve küçük (erken) antral foliküllerde azaldığını tespit etmişlerdir.⁹⁵

Biz çalışmamızda agonist ve antagonist grupların folliküler sıvıdaki AMH konsantrasyonları ortancaları arasında istatistiksel fark saptamadık (1.6 ng/mL'ye karşı 1.9 ng/mL; p=0.169). Lee'nin ve bizim çalışmamızın sonucunun diğer iki çalışma ile farklı çıkmasının nedeni AMH düzeylerini çalıştığımız follikül sıvılarını dominant foliküllerden elde etmemiz olabilir çünkü Baarends AMH ekspresyonunun özellikle tüm folliküllerde değilde preantral ve erken antral foliküllerde azaldığını bildirmiştir.

Granüloza hücrelerinden salgılanan İnhibin-B overdeki hücre büyümesi, hücre maturasyonu ve steroidogenezde lokal regülatör gibi etki eder.⁷³ İnhibin-B'nin follikül sıvısındaki değerinin agonist ve antagonist protokollerde farklı olup olmadığını kıyaslayan iki çalışma mevcuttur.^{71, 73} Her iki çalışmada da agonist ve antagonist protokolde follikül sıvısı İnhibin-B konsantrasyonlarının benzer olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamız da İnhibin-B için literatürü destekler niteliktedir ve iki grup arasında fark saptanmamıştır (7550 pg/mL'ye karşı 7900 pg/mL; p=0.773).

Folikülogenezde mikrosirkülasyon temel gerekliliktir ve burada esas rolü oynayan intraoveryan sitokin VEGF'dir.

Ferrari ve arkadaşları 60 vaka ile yaptıkları çalışmada; esnek multiple doz antagonist protokol uyguladıkları hastaların follikül sıvısındaki VEGF konsantrasyonlarının uzun agonist protokol uygulananlara göre daha yüksek düzeyde olduğunu saptamışlardır. Bu durumu açıklarken antagonistlerin agonistlere göre LH'ı daha fazla baskıladığını bunun sonucu olarak da steroidogenezin ve folliküler çevrenin bozulduğunu, apoptozun arttığını ve tüm bunlara yanıt olarak folliküler VEGF düzeylerinin yükseldiğini ileri sürmüşlerdir.⁹⁶ Ancak GnRH antagonistlerinin granüloza hücrelerindeki steroidogenezi etkilemediğine dair de pek çok çalışma mevcuttur.

Asimakopoulos ve arkadaşları granüloza hücre kültürü kullanarak yaptıkları invivo çalışmalarında; üç grup oluşturmuşlar ilk grubu antagonistle ikinci grubu agonistle muamele edip üçüncü grubu kontrol grubu olacak şekilde herhangi bir GnRH analogu ile muamele etmeyip kültür süpernatantlarında VEGF düzeylerine bakmışlardır. Sonuçta, VEGF düzeyi agonist grupta kontrol grubu ile benzer,

antagonist grubta ise hem kontrol grubuna göre hem de agonist grubuna göre azalmış olarak saptanmıştır.⁹⁷

Yine Asimakopoulos ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışmada; ICSI siklusuna alınan, uzun agonist protokol (n=12) ve esnek multiple doz antagonist protokol (n=56) uygulanan hastaların follikül sıvılarındaki sitokin ve hormon düzeylerine bakılmış, ne hormon düzeylerinde (östradiol, progesteron, testosteron) ne de VEGF düzeylerinde (2991.8 ng/mL'ye karşı 3013.8 ng/mL; p=0.819) iki grup arasında fark olmadığı bildirilmiştir.⁹⁸

Biz çalışmamızda agonist ve antagonist protokol uyguladığımız hastaların follikül sıvılarındaki VEGF konsantrasyonlarının ortancalarının istatistiksel olarak farklı olmadığını saptadık (958 ng/mL'ye karşı 966 ng/mL; p=0.773). Asimakopoulos'un ilk çalışması ile bizimle benzer sonucu bulduğu ikinci çalışması ve bizim çalışmamızın sonuçlarının çelişmesinin nedeni ilk çalışmanın invitro granüloza hücre kültürü ile yapılan bir çalışma olması ve VEGF'nin invivo granüloza hücrelerine ek olarak büyük kısmının teka hücrelerinden de sentezleniyor olmasının ihmal edilmiş olması olabilir.

Sonuç olarak agonist ve antagonist gruplarla ilgili olan kısmı özetlersek; çalışmamızda siklus sonuçları ve folliküler sıvı markırlarının (IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, AMH, İnhibin-B ve VEGF) konsantrasyonları belirlendikten sonra yapılan istatiki analiz sonucunda agonist ve antagonist protokol uygulanan gruplar arasında ne siklus sonuçları ne de folliküler sıvı markırları konsantrasyonları açısından istatistiksel fark saptamadık. Elde ettiğimiz sonuçlar, antagonistlerin intaoveryan GnRH reseptörlerini etkileyerek foliküler mikroçevreyi kötü yönde değiştirdiği ve buna bağlı olarak agonistlere göre daha az başarılı siklus sonuçlarına neden oldukları fikrini desteklememiştir.

Agonist ve antagonist grupların karşılaştırılmasına ek olarak sadece rekombinant FSH ile rekombinant FSH ve hMG'nin kombine verildiği subgrupları (agonist protokol uygulananları kendi içerisinde, antagonist protokol uygulananları da kendi içerisinde) da siklus sonuçları ve follikül sıvı markırı konsantrasyonları açısından birbirleriyle kıyasladık.

Uzun GnRH agonist protokolü uygulanan subgruplar

Demografik özellikler ve tedavi karakteristikleri açısından iki agonist protokol sub grubunu karşılaştırdığımızda; yaş, stimülasyon süresi ve kullanılan toplam gonadotropin dozu ortalamaları rFSH'ın hMG ile kombine edildiği grupta (Grup 1a) sadece rFSH uygulanan gruba (Grup 1b) göre istatistiksel anlamlı daha yüksekti (sırası ile 31.1'e karşı 26.2; $p=0.001$, 10.1'e karşı 8.8; $p=0.042$, 42.9 ampule karşı 21.9 ampul; $p=0.000$).

Embriyolojik siklus sonuçları değerlendirildiğinde; hMG eklenen grubun toplanan toplam ve matür (MII) oosit sayısının, 3. gün embriyo sayısının ortalama ve ortancalarının hMG eklenmeyen gruba göre istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu saptadık (sırası ile 9.9'a karşı 17.3; $p=0.000$, 8.7'ye karşı 14.8; $p=0.001$, 4.5'e karşı 3.0; $p=0.004$). Bu durumu artan yaşla toplanan oosit sayısının ve kalitesinin ters korelasyon gösterdiğini bildiren birçok çalışmada olduğu gibi hMG eklenen grubun yaş ortalamasının daha yüksek olması ile ilişkilendirdik.

Balasch ve arkadaşlarının aynı demografik özelliklere sahip uzun agonist protokol uyguladıkları hastalar ile yaptıkları çalışmalarında⁹⁹ sadece FSH kullanılan grup ile FSH ve hMG'nin kombine kullandığı grup arasında embriyolojik ve gebelikle ilişkili siklus sonuçlarının benzer olması bizim bu görüşümüzü desteklemektedir.

İki sub grubun yüksek kaliteli embriyo (grade A) ve transfer edilen embriyo sayıları arasında ise istatistiksel fark yoktu (sırası ile 2.0'a karşı 3.0; $p=0.058$, 3.0'a karşı 3.0; $p=0.802$). Fertilizasyon, implantasyon, klinik gebelik, canlı doğum ve abortus oranlarının da her iki sub grupta istatistiksel anlamda benzer olduğunu saptadık (sırası ile %58.7'ye karşı %60.0; $p=0.770$, %16.8'e karşı %20.0; $p=0.939$, %40'a karşı %35; $p=0.744$, %35'e karşı %30; $p=0.736$ ve %12.5'e karşı %14.3; $p=0.919$). Gebelikle ilişkili siklus sonuçlarının iki sub grupta benzer çıkması, literatüdeki agonist protokol uygulanan hastalarda hMG eklenen ve eklenmeyen grupların siklus sonuçları arasında fark olmadığını bildiren mevcut iki çalışmayı^{99,100} destekler nitelikteydi.

Uzun agonist protokol uygulanan hastalarda sadece FSH ile FSH ve hMG'nin kombine kullanımını karşılaştıran çalışma sayısının çok kısıtlı olmasıyla birlikte uzun agonist protokol uygulanan hastalarda rFSH ile hMG'yi kıyaslayan

2008 yılına ait iki metaanaliz mevcuttur.^{101,102} Al-Inany 12 randomize kontrollü çalışmayı dahil ettiği metaanalizinde, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarının hMG grubunda daha iyi olduğunu göstermiştir.¹⁰¹ HMG'nin başarısını içeriğinde yer alan orta ve geç folliküler fazda follikül büyümesini ve maturasyonunu direkt uyarabilen LH aktivitesiyle ilişkilendirmiştir. Coomarasamy ve arkadaşları da 7 randomize kontrollü çalışmayı dahil ettikleri metaanalizlerinde Al-Inany ile benzer sonuçları elde etmişlerdir.¹⁰²

Follikül sıvı markırlarının konsantrasyonları iki subgrup arasında kıyaslandığında; IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF değerleri iki grup için benzerdi (sırası ile $p=0.068$, $p=0.495$, 0.829 , $p=0.903$). Ancak IGF-I ve AMH değerlerinin hMG eklenen grupta istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu saptadık (sırası ile 98.2 ng/mL'ye karşı 133.7 ng/mL; $p=0.030$, 1.15 ng/mL'ye karşı 2.0 ng/mL; $p=0.019$).

Folliküler sıvıdaki IGF-I konsantrasyonunun hMG eklenen grupta daha düşük olmasının iki nedeni olabilir.

Birincisi, artan yaşla birlikte serum ve folliküler IGF-I konsantrasyonunun düştüğünü gösteren çalışmanın olmasıdır.³⁰ Dolayısıyla hMG eklenen grupta yaş ortalamasının istatistiksel anlamlı yüksek olması IGF-I'in daha düşük konsantrasyonlarda olmasına sebep olmuş olabilir.

İkincisi, hMG eklenmesi folliküler IGF-I düzeyinin düşmesine neden olmuş olabilir. HMG'nin IGF-I üzerine etkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Fried ve arkadaşları IVF siklusuna alınan dermografik özellikleri benzer olan 63 hasta ile yaptıkları çalışmalarında; stimülasyon için 53 hastaya hMG 10 hastaya hpFSH verip iki grubun follikül sıvısındaki büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarını kıyaslamışlar ve folliküler sıvıdaki IGF-I konsantrasyonunun hMG ile stimule edilen sikluslarda FSH ile stimule edilen sikluslara göre daha düşük olduğunu saptamışlardır (120 µg/L'ye karşı 146 µg/L; $p=0.0078$) (IGFBP-I için ise tam tersi olduğunu saptamışlar). Bu sonucun hMG'nin içeriğinde bulunan LH'nin folliküler IGF-I'i inhibe etmesi ve/veya IGFBP-I'i stimule etmesi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak literatürde LH'nin IGF-I'in ekspresyonunu regüle ettiğine dair herhangi bir veri bulamamakla birlikte LH'nin IGFBP'leri stimule ettiğine dair yayınların olduğunu ileri sürmüşlerdir.¹⁰³ Hammadah ve arkadaşları ise agonist protokol uyguladıkları 85 ICSI hastasını 3 gruba ayırarak; birinci gruba hMG, ikinci

gruba FSH, üçüncü gruba FSH ile hMG'yi kombine verip follikül sıvılarındaki IGF-I düzeylerine bakmışlar. Bizim çalışmamızdan farklı olarak hastaların yaşları arasında istatistiksel fark saptamamışlardır. IGF-I'in FSH ile hMG'yi kombine ettikleri grupta FSH grubuna göre istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (0.40 ng/mL'ye karşı 0.42 ng/mL; $p=0.036$).¹⁰⁴ Bu iki çalışma bizim ikinci görüşümüzü destekler niteliktedir. Ancak bu çalışmalarla birlikte farklı gonadotropin preparatlarının folliküler IGF-I düzeyinde farklılığa yol açmadığını bildirenler de vardır.^{34, 105}

Şimdiye kadar FSH'a hMG eklenen ve eklenmeyen grupların follikül sıvılarındaki AMH konsantrasyonlarını karşılaştıran herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Biz yaptığımız bu çalışmada, uzun agonist protokol uyguladığımız hastalarda rFSH'a hMG eklenen (Grup 1a) ve eklenmeyen (Grup 1b) grupların follikül sıvılarındaki AMH konsantrasyonlarını karşılaştırdık ve daha önce belirttiğimiz üzere folliküler sıvıdaki AMH'nin hMG eklenen grupta daha düşük olduğunu saptadık. Bu sonucun nedeni olarak üç görüş ileri sürebiliriz.

Birincisi, aynen IGF-I'de olduğu gibi artan yaşla birlikte folliküler sıvıdaki AMH konsantrasyonunun düştüğünü gösteren çalışmaların olmasıdır.^{50, 71} Ancak yaşla birlikte folliküler sıvıdaki AMH düzeylerinde önemli değişikliğin olmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur.^{52, 62}

İkincisi, daha önce yapılan bir çalışmada follikül matür hale geldikçe ve lüteinize oldukça AMH üretiminin bu süreçten negatif etkilendiği görüşünün ileri sürülmüş olmasıdır.⁵⁹ Bu görüşü hMG içeriğindeki LH'nin orta-geç folliküler fazda folliküler büyüme ve maturasyonu pozitif yönde etkiliği görüşü ile birleştirirsek hMG eklenen grupta AMH'nin daha düşük olması beklenen bir sonuç olacaktır.

Üçüncüsü, hMG eklenen grupta kullanılan toplam gonadotropin dozunun istatistiksel anlamlı daha yüksek olması bu grupta AMH'nin follikül sıvısındaki konsantrasyonunun daha düşük olmasına neden olmuş olabilir. Literatürde ekzojen ve yüksek doz FSH'nın AMH üretimi üzerine negatif etkisinin olduğunu ileri süren yayınlar mevcuttur.^{106, 107} Jancar ve arkadaşları doğal siklus ile stimule sikluslardaki folliküler sıvı AMH düzeylerini kıyaslamışlar, stimule sikluslarda düşük buldukları AMH düzeylerinin ekzojen FSH'nın negatif etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (sırası ile 6.9 ng/mL'ye karşı 2.5 ng/mL; $p=0.001$).¹⁰⁶ Sanchez ve

arkadaşları ise fare overi üzerinde yaptıkları çalışmalarında; preantral folliküllerin preovulatar folliküle kadar ilerleyebilecekleri 12-gün kültür sistemini kullanarak farklı dozlardaki FSH etkisinde oosit ve kümülüs hücre transkriptlerinin ekspresyonunun değişip değişmediğine bakmışlardır. Yüksek doz FSH'nın uygulandığı kümülüs hücrelerinde AMH ekspresyonunun azaldığını tespit etmişlerdir.¹⁰⁷ Bu iki çalışma bizim daha fazla gonadotropin kullandığımız grup 1a'daki daha düşük folliküler AMH değerini açıklıyor gibi gözükmektedir.

Esnek (Flexible) multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan subgruplar

Demografik özellikler ve tedavi karakteristikleri açısından iki antagonist protokol sub grubunu karşılaştırdığımızda; rFSH'ın hMG ile kombine verildiği grupta (Grup 2a) kullanılan toplam gonadotropin dozunun sadece rFSH verilen gruba (Grup 2b) göre daha yüksek olması dışında diğer özellikler açısından iki subgrup arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadık (31.6 ampule karşı 26.1 ampul; $p=0.042$).

Embriyolojik siklus sonuçlarını değerlendirildiğimizde; toplanan oosit sayısı, matür oosit (MII) sayısı, 3. gün embriyo sayısı, 3. gün yüksek kaliteli (Grade A) embriyo sayısı ve transfer edilen embriyo sayısı ortalamaları (ortancaları) her iki antagonist sub grubunda istatistiksel olarak benzerdi (sırası ile 11.6'ya karşı 14.4; $p=0.088$, 9.8'e karşı 12.1; $p=0.142$, 5.0'a karşı 6.5; $p=0.103$, 2.0'a karşı 3.0; $p=0.078$ ve 3.0'a karşı 3.0; $p=0.362$).

Fertilizasyon, implantasyon, klinik gebelik, canlı doğum ve abortus oranları gibi gebelik sonuçları ile ilişkili siklus sonuçlarının da her iki grupta istatistiksel anlamda benzer olduğunu saptadık (sırası ile %50.6'ya karşı %54.8; $p=0.534$, %13.7'ye karşı %23.75; $p=0.318$, %30'a karşı %45; $p=0.327$, %25'e karşı %35; $p=0.490$ ve %16.7'ye karşı %22.2; $p=0.792$).

Folliküler gelişimin orta-geç fazında FSH etkisiyle granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin arttığı takiben follikül gelişimi ve östradiol üretiminde FSH bağımlı genlerin bu süreçte LH'nın da kontrolü altına girmesi ve antagonistlerin hızlı reseptör blokajına bağlı olarak belirgin LH baskılanması yaratıyor olması birlikte değerlendirildiğinde çalışmacıların antagonist protokole LH eklemesine ve LH eklenen ve eklenmeyen grupların siklus sonuçlarını kıyaslamalarına neden olmuştur. Ancak son zamanlarda yapılan hiçbir çalışmada antagonist protokol uygulanan hastalarda FSH'a hMG eklenmesinin tedavi sonuçları açısından FSH'a üstünlüğü

gösterilememiştir.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Bizim de çalışmamızda siklus sonuçları arasında fark saptamamamız literatürü destekler niteliktedir.

Folikül sıvı markırlarının konsantrasyonları iki antagonist subgrubu arasında kıyaslandığında; AMH dışındaki follikül sıvı markırlarının konsantrasyonları iki subgrupta benzerdi ancak AMH değerleri hMG eklenen subgrupta istatistiksel anlamlı daha düşüktü (1.45 ng/mL'ye karşı 2.4 ng/mL; p=0.006).

Antagonist subgrupları arasında folliküler IGF-I konsantrasyonları ve yaş ortalamaları açısından istatistiksel fark saptanmamış olması agonist subgruplarda ortaya çıkan istatistiksel farklılığın yaşa bağlı olabileceği görüşümüzü desteklemiştir.

Antagonist protokol uygulanan hastalardan rFSH'a hMG eklenen grupta (Grup 2a) hMG eklenmeyen gruba (Grup 2b) göre foliküler sıvı AMH değerinin daha düşük saptanması ve bu iki grubun yaş ortalamalarının benzer olması agonist gruplar arasındaki AMH değerleri arasındaki farklılığı yaş ile ilişkilendirerek açıklamış olmamızı desteklememiştir. Diğer yandan agonist gruplardaki folliküler AMH değerlerindeki farklılığın nedeni açıklamak için ileri sürdüğümüz ikinci ve üçüncü görüşler antagonist gruplardaki farklı AMH düzeylerini de açıklayabilir.

Foliküler sıvı markırları ile siklus sonuçları arasındaki ilişkiler

Çalışmamızda farklı tedavi protokollerinin siklus sonuçları ve folliküler sıvı markırları üzerine etkilerini araştırmamız yanında folliküler sıvı markırları ile toplanan oosit sayısı, yüksek kaliteli embriyo sayısı, fertilizasyon ve implantasyon oranı, klinik gebelik ve canlı doğum gibi siklus sonuçları arasında ilişki olup olmadığını da araştırdık.

IGF-I

IGF-I'in gonadotropinlerle birlikte follikülogenezde ve overyan steroidogenezde lokal regülatör gibi rol oynaması birçok çalışmacıyı folliküler sıvı IGF-I konsantrasyonu ile siklus sonuçları arasında ilişki olup olmadığını araştırmaya yöneltmiştir.

Jimena ve arkadaşları IVF siklusu uygulanan hastaların follikül sıvılarını incelediklerinde aynı hastanın matür ve fertilize olabilen oositinin elde edildiği follikül sıvısındaki IGF-I düzeyinin matür ve fertilize olamayan oositinin elde edildiği follikül sıvısındakinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir²⁸. Yine IVF hastaları ile yapılan farklı bir çalışmada ise folliküler IGF-I'in oosit maturasyonu ile

ilişkili olduğu ancak fertilizasyon ve IVF sonuçları ile ilişkisi olmadığı ileri sürülmüştür.¹¹¹

Takiben yapılan pek çok çalışmada folliküler IGF-I ile siklus sonuçlarının predikte edilemeyeceği bildirilmiştir.^{12, 91, 104, 112}

Biz çalışmamızda her bir follikül sıvısının oositini ayrı ayrı takip etmediğimiz ve follikül sıvı markırı düzeylerine havuzlanmış follikül sıvısında baktığımız için IGF-I'in oosit maturasyonu ile olan bire bir ilişkisini gösteremedik. Ancak IGF-I düzeyinin siklus sonuçları ile ilişki olmadığını göstermiş olmamız literatürdeki diğer çalışmaları desteklemiştir.

IGF-II

IGF-II follikülogenezde ve overyan steroidogeneizde temel rol oynayan IGF'dir. Buna rağmen IGF-II ve siklus sonuçları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır.

Wang ve arkadaşları 225 matür oositin follikül sıvısını inceledikleri çalışmalarında; IGF-II'nin daha iyi maturasyon gösteren ve takiben ilk 48 saat içinde erken embriyo gelişimi gösteren oositlerin follikül sıvılarında daha yüksek konsantrasyonda olduğunu göstermişlerdir.¹¹

Zhang ve arkadaşları agonist protokol uyguladıkları 88 hastanın follikül sıvılarındaki IGF-II konsantrasyonunun kullanılan toplam gonadotropin dozuyla pozitif korelasyon gösterdiğini ancak klinik sonuçlarla ilişkisi olmadığını ileri sürmüşlerdir.¹¹³

Klein ve arkadaşları ise yaş ile serum ve folliküler sıvıdaki IGF-I düzeylerin azalmasına rağmen IGF-II düzeylerinin değişmediğini saptamışlar¹¹⁴ takiben Stadtmayer ve arkadaşları azalan over rezervi ve yaş ile birlikte IGFBP'lerdeki değişikliklere bağlı olarak folliküler IGF-I'in azaldığını IGF-II'nin ise arttığını ileri sürmüşlerdir.³⁰

Biz çalışmamızda klinik gebelik ve canlı doğum ile folliküler IGF-II arasında istatistiksel anlamlı negatif korelasyon olduğunu (sırası ile $r=-0.220$; $p=0.049$, $r=-0.277$; $p=0.013$) ayrıca bununla paralel olarak klinik gebelik ve canlı doğum pozitif olanlarda negatif olanlara göre folliküler IGF-II konsantrasyonlarının daha düşük olduğunu saptadık (sırası ile 1142.6 ng/mL'ye karşı 1357.8 ng/mL; $p=0.049$ ve 1103.2 ng/mL'ye karşı 1356.2 ng/mL; $p=0.027$). Elde ettiğimiz bu sonuç her ne

kadar Zhang'ın çalışmasıyla uyuşmasada Statmaurer'in ileri sürdüğü azalmış over rezervi ve artmış IGF-II ilişkisi ile paralellik göstermektedir.

IGFBP-3

IGFBP-3'ün IGF'lerin esas taşıyıcı proteini olarak önemi çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır.³³

Nardo ve arkadaşları IVF siklusuna aldıkları hastaların dominant folliküllerinden elde ettikleri follikül sıvısındaki IGFBP-3 düzeyleri ile oosit maturasyonu arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.¹¹⁵

Wang ve arkadaşları da Nardo'nun sonucuna ek olarak foliküler IGFBP-3 düzeylerinin oosit maturasyonu ile pozitif korelasyon göstermesinin yanında oosit toplanmasını takiben ilk 48 saat içinde oluşan erken embriyo gelişimi ile de pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.¹¹

Dorn ve arkadaşları ise IVF siklusuna alınan hastalarla yaptıkları çalışmada; IGFBP-3'ün serum ve follikül sıvısındaki konsantrasyonları ile gebelik oranları arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, gebeliğin olduğu hastalarda serum IGFBP-3 düzeyinin yüksek olduğunu saptamışlar ancak folliküler IGFBP-3 düzeyleri ile IVF sonuçları arasında herhangi bir korelasyon olduğunu gösterememişlerdir.¹¹¹

Biz çalışmamızda her bir follikül sıvısının oositini ayrı ayrı takip etmediğimiz ve follikül sıvı markırı düzeylerine havuzlanmış follikül sıvısında baktığımız için IGFBP-3 'ün oosit maturasyonu ve embriyo gelişimi ile olan bire bir ilişkisini gösteremedik. Ancak folliküler IGFBP-3 düzeyinin siklus sonuçları ile ilişki olmadığını göstermiş olmamız Dorn ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemiştir.

İnhibin-B

İnhibin-B'nin de follikülogenezde rol oynayan intraoveryan lokal regülatörlerden biri olması siklus sonuçları ile folliküler sıvıdaki İnhibin-B konsantrasyonu arasında ilişki olup olmadığını araştıran çalışmaların yapılmasına neden olmuştur.

Chang ve arkadaşları 156 IVF hastası ile yaptıkları çalışmalarında; folliküler İnhibin-B konsantrasyonları ile 2. ve 3. gün embriyo kalitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu ve İnhibin-B'nin embriyo kalitesini tahmin etmede iyi bir prediktif markır olduğunu ileri sürmüşlerdir.⁷⁶

Öcal ve arkadaşları ise artmış folliküler İnhibin-B düzeylerinin KOH'da daha iyi overyan yanıt ve yüksek gebelik oranları ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.⁴⁷ Wunder ve arkadaşları da 276 IVF/ICSI hastası ile yaptıkları çalışmalarında benzer şekilde gebelik ile folliküler İnhibin-B düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir.⁷²

Tüm bu çalışmaların aksine Wen ve arkadaşları 35 IVF/ICSI hastası ile yaptıkları çalışmalarında folliküler İnhibin-B düzeyleri ile fertilizasyon oranları arasında herhangi bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir.¹¹⁶

Biz çalışmamızda her ne kadar klinik gebeliği olanlarda olmayanlara göre folliküler inhibin-B düzeylerini yüksek saptamış olsakda (9100 ng/mL'ye karşı 7300 ng/mL; p=0.276) siklus sonuçları ile folliküler İnhibin-B düzeyleri arasında istatistiksel herhangi bir korelasyon saptamadık. Bu durum literatürdeki İnhibin-B ile ilişkili yapılan çalışmalara göre hasta sayımızın daha az olmasıyla ilişkili olabilir.

VEGF

VEGF follikülogenezde temel gereklilik olan mikrosirkülasyonun oluşmasında ana rol oynayan intraoveryan sitokindir. VEGF ile ilgili yapılmış olan hayvan çalışmalarında³⁸ yüksek folliküler VEGF seviyelerinin daha başarılı follikülogenez süreciyle ilişkili olduğu gösterilmiş olsada yapılan klinik çalışmaların çoğu stimule sikluslarda hipoksik ve kötü intraoveryan mikroçevre oluşumuna yanıt olarak folliküler VEGF düzeyinin arttığını ve siklus sonuçlarının yüksek folliküler VEGF düzeylerinden kötü etkilendiğini göstermiştir.

Barroso ve arkadaşları 16 IVF hastasının 55 follikül sıvısını incelemişler ve artmış folliküler VEGF düzeylerinin folliküler hipoksi ve suboptimal embriyo gelişimi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.⁴⁵

Hem Öcal ve arkadaşları hem de Asimakopoulos ve arkadaşları folliküler VEGF ile gebelik oranları arasında negatif korelasyon olduğunu göstermişlerdir.⁴⁷

Farklı bir çalışmada da toplanan oosit sayısı ile folliküler VEGF düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır.⁴⁶

Dorn ve arkadaşları ise IVF siklusuna alınan 100 hastanın follikül sıvısını değerlendirmişler ve diğer çalışmalardan farklı olarak siklus sonuçları ile folliküler VEGF düzeyleri arasında herhangi bir ilişki saptayamamışlardır.¹¹²

50 IVF hastası ile yapılan farklı bir çalışmada da yukardaki çalışmaların tam tersi olarak daha fazla oosit elde edilen, fertilizasyon ve gebelik oranları daha yüksek olan hastalardan elde edilen luteinize granüloza hücrelerinde VEGF mRNA ekspresyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir.⁴⁸

Biz çalışmamızda literatürün çoğunluğuyla uyumlu olacak şekilde folliküler VEGF düzeyleri ile yüksek kaliteli embriyo sayısı, klinik gebelik ve canlı doğum arasında negatif korelasyon olduğunu gösterdik (sırası ile $r=-0.278$; $p=0.012$, $r=-0.250$; $p=0.025$ ve $r=-0.342$; $p=0.002$). Klinik gebelik ve canlı doğumun pozitif olduğu hastalarda negatif olanlara göre folliküler VEGF konsantrasyonunun istatistiksel anlamlı daha düşük olduğunu saptadık (sırası ile 714 pg/mL'ye karşı 1028 pg/mL; $p=0.026$, 600 pg/mL'ye karşı 1048 pg/mL; $p=0.002$) Elde ettiğimiz bu sonuç, kötü intraoveryan mikroçevre oluşumuna bağlı olarak folliküler VEGF seviyesinin arttığı görüşünü desteklemiştir.

AMH

Overyan aktivite üzerine düzenleyici etkisi olduğu bilinen AMH'nin de folliküler sıvıdaki düzeyi ile siklus sonuçları arasında ilişkisi olup olmadığını araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Ancak mevcut çalışmaların sonuçları çelişkilidir.

Fanchin ve arkadaşları IVF siklusuna alınan 118 hasta ile yaptıkları çalışmada; follikül sıvısındaki AMH düzeyleri ile implantasyon oranları arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.⁷⁰

Farklı bir çalışmada ise folliküler AMH konsantrasyonunun fertilizasyonu olan hastalarda olmayanlara göre yaklaşık 3.5 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.⁶⁹

Wunder ve arkadaşları ise daha fazla hasta ($n=276$) ile yaptıkları çalışmalarında; folliküler AMH düzeylerinin siklusu gebelik ile sonuçlanan kadınlarda gebe olmayanlara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.⁷²

Yine farklı iki çalışma sonucunda toplanan oosit sayısı ile folliküler AMH düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir.^{71, 93}

Literatürde bu çalışmaların tersini bulan çalışmalar da mevcuttur. Cupisti ve arkadaşları oosit maturasyonu ve kalitesi ile folliküler AMH konsantrasyonları arasında negatif korelasyon olduğunu saptamışlardır.⁶⁸ Takiben yakın zamanda

yapılan diğ er bir çalışmada da Cupisti'nin sonuçları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.⁶⁶

Mashiach ve arkadaşları ise IVF siklusuna aldıkları PCOS'lu hastalarla yaptıkları çalışmalarında; folliküler AMH düzeyleri ile embriyo kalitesi arasında negatif korelasyon olduğunu ancak oosit maturasyonu, fertilizasyon ve klivaj oranları ile folliküler AMH düzeyleri arasında anlamlı korelasyon olmadığını saptamışlardır.¹¹⁸

Biz  alışmamızda toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı ve implantasyon oranları ile folliküler AMH düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu saptadık (sırası ile $r=0.253$; $p=0.024$, $r=0.227$; $p=0.045$) ancak klinik gebelik ve canlı doğumun pozitif olduğu hastalarda negatif olanlara göre folliküler AMH değeri daha yüksek olmasına rağmen aralarında anlamlı istatistiksel fark saptayamadık (sırası ile 2.0 ng/mL'ye karşı 1.55 ng/mL; $p=0.085$ ve 2.0 ng/mL'ye karşı 1.6 ng/mL; $p=0.136$).

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada uzun GnRH agonist protokol ile esnek multiple doz GnRH antagonist protokolü uyguladımız toplam 80 ICSI-ET hastasının siklus sonuçlarını ve folliküler sıvı markırlarını değerlendirdiğimizde elde ettiğimiz sonuçlar;

1. Uzun GnRH agonist protokol (Grup 1) ile esnek multiple doz GnRH antagonist protokol (Grup 2) uygulanan hastaların embriyolojik ve gebelikle ilişkili siklus sonuçları arasında istatiksek fark saptanmamıştır.
2. Uzun GnRH agonist protokol (Grup 1) ile esnek multiple doz GnRH antagonist protokol (Grup 2) uygulanan hastaların follikül sıvıları incelendiğinde; IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF ve AMH konsantrasyonlarının her iki grupta istatikselsel anlamda benzer olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla folliküler mikroçevrenin değerlendirilen follikül sıvısı markırları açısından agonist ve antagonist protokolde farklı olmadığı görülmüştür.
3. Uzun GnRH agonist protokol uygulanan hastalar stimulasyon rejimine hMG eklenen (Grup 1a) ve eklenmeyenler (Grup 1b) olarak iki subgruba ayrılıp kıyaslandığında; Grup 1a'da yaş ortalamasının, stimulasyon süresinin ve kullanılan toplam gonadotropin dozunun Grup 1b'ye göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.
4. Uzun GnRH agonist protokol uygulanan ve stimulasyon rejimine hMG eklenen grupta (Grup 1a) eklenmeyen gruba (Grup 1b) göre toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı ve 3. gün embriyo sayısı istatikselsel anlamlı daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç Grup 1a'nın yaş ortalamasının daha yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir.
5. Uzun GnRH agonist protokol uygulanan ve stimulasyon rejimine hMG eklenen (Grup 1a) ve eklenmeyen (Grup 1b) gruplar follikül sıvı markırları açısından kıyaslandığında; Grup 1a'da folliküler IGF-I ve AMH'nın Grup 1b'ye göre istatikselsel anlamlı daha düşük olduğu saptanmıştır. IGF-I'in Grup 1a'da daha düşük olması bu grupta yaş

ortalamasının daha yüksek olmasıyla, folliküler AMH'nın daha düşük olması ise bu grupta hem kullanılan toplam gonadotropin dozunun daha yüksek olmasıyla hem de LH kullanımıyla ilişkilendirilmiştir.

6. Uzun GnRH agonist protokol uygulanan ve stimülasyon rejimine hMG eklenen grup (Grup 1a) ile eklenmeyen grubun (Grup 1b) gebelikle ilişkili siklus sonuçları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.
7. Esnek multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan hastalar stimülasyon rejimine hMG eklenen (Grup 2a) ve eklenmeyenler (Grup 2b) olarak iki subgruba ayrılıp kıyaslandığında; sadece kullanılan toplam gonadotropin dozunun Grup 2a'da Grup 2b'ye göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.
8. Esnek multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan ve stimülasyon rejimine hMG eklenen (Grup 2a) ve eklenmeyen (Grup 2b) gruplar follikül sıvı markırları açısından kıyaslandığında; sadece folliküler AMH'nın Grup 2a'da Grup 2b'ye göre istatistiksel anlamlı daha düşük olduğu saptanmıştır. Grup 2a'da folliküler AMH'nın daha düşük olması ise aynen agonistlerde olduğu gibi bu grupta hem kullanılan toplam gonadotropin dozunun daha yüksek olmasıyla hem de LH kullanımıyla ilişkilendirilmiştir.
9. Esnek multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan ve stimülasyon rejimine hMG eklenen (Grup 2a) ve eklenmeyen (Grup 2b) gruplar arasında embriyolojik ve gebelikle ilişkili siklus sonuçları açısından istatistiksel fark saptanmamıştır.
10. Folliküler IGF-II konsantrasyonları ile klinik gebelik, canlı doğum arasında negatif korelasyon olduğu ve folliküler IGF-II konsantrasyonlarının klinik gebelik ve canlı doğumun pozitif olduğu hastalarda daha düşük olduğu saptanmıştır.
11. Folliküler VEGF konsantrasyonları ile yüksek kaliteli embriyo sayısı, klinik gebelik, canlı doğum arasında negatif korelasyon olduğu ve folliküler VEGF konsantrasyonlarının klinik gebelik ve canlı doğumun pozitif olduğu hastalarda daha düşük olduğu saptanmıştır.

12. Folliküler AMH konsantrasyonları ile toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı ve implantasyon oranları arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır.
13. Folliküler IGF-I, IGFBP-3 ve İnhibin-B konsantrasyonları ile embriyolojik ve gebelikle ilişkili siklus sonuçları arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

ÖZET

Farklı kontrollü hiperstimulasyon protokollerinin follikülogenezde rol oynayan folliküler sıvı markırları üzerine etkisi

YÜT’de multifoliküler gelişimi sağlamak için uygulanan kontrollü overyan hiperstimulasyon sırasında meydana gelebilecek erken LH pikini engellemek için GnRH agonistleri ve GnRH antagonistleri yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak GnRH agonistleri ve GnRH antagonistlerinin siklus sonuçları üzerindeki etkilerinin farklı olup olmadığı halen tartışmalı bir konudur. GnRH reseptörlerinin over dokusunda eksprese olduğu gösterildikten sonra GnRH antagonistlerinin folliküler mikroçevreyi kötü yönde etkilediği görüşü ileri sürülmüştür.

Biz yaptığımız bu çalışmada ICSI-ET sikluslarında uzun GnRH agonist protokol uygulanan hastalar ile esnek multiple doz GnRH antagonist protokol uygulanan hastaların folliküler sıvılarındaki IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF ve AMH konsantrasyonlarını belirleyip, farklı stimulasyon protokollerinden nasıl etkilendiklerini ve siklus sonuçları ile aralarında ilişki olup olmadığını saptamayı hedefledik.

Çalışma Haziran 2009 - Ocak 2010 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran, ICSI-ET için kontrollü overyan hiperstimulasyon uygulanacak olan seksen hasta ile yapıldı. Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek, çalışmaya dahil edildiklerine dair yazılı bilgilendirilmiş onamları alındı. Hasta seçim kriterlerine uygun özellikler taşıyan 80 hastanın 40’ına uzun GnRH agonist protokolü (Grup 1), 40’ına esnek multidoz GnRH antagonist protokolü (Grup 2) uygulandı. Ayrıca her grup uygulanan gonadotropinlere göre kendi içinde 20’şer kişilik subgruplara ayrıldı. Hastaların yarısına rFSH ve hMG kombinasyonu (Grup 1a ve Grup 2a) diğer yarısına sadece rFSH (Grup1b ve Grup 2b) verildi. Tüm hastaların OPU işlemi sırasında matür folliküllerinden elde edilen follikül sıvıları analiz edilene kadar -80⁰C’de saklandı. IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, İnhibin-B, VEGF ve AMH’nin follikül sıvısındaki konsantrasyonları IRMA veya ELİSA yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Çalışmanın sonucunda; Uzun GnRH agonist protokol (Grup 1) ile esnek multiple doz GnRH antagonist protokol (Grup 2) uygulanan hastaların siklus sonuçları ve folliküler sıvı markırları arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı, ($p < 0.05$). Subgrupları değerlendirdiğimizde; rFSH ve HMG'nin kombine verildiği subgruplarda (Grup 1a ve Grup 2a) folliküler sıvıdaki AMH konsantrasyonunun sadece rFSH verilen subgruplara (Grup 1b ve Grup 2b) göre istatistiksel anlamlı daha düşük olduğu saptandı, (1.15 ng/mL'ye karşı 2.0 ng/mL; $p = 0.019$, 1.45 ng/mL'ye karşı 2.4 ng/mL; $p = 0.006$). Folliküler AMH konsantrasyonlarının hMG eklenen gruplarda düşük olması bu gruplarda kullanılan toplam gonadotropin dozunun daha yüksek olması ve LH eklenmiş olması ile ilişkilendirildi. Subgrupların gebelikle ilişkili siklus sonuçları arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$). Follikül sıvı markırları ile siklus sonuçları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; folliküler IGF-II ve VEGF konsantrasyonları ile klinik gebelik, canlı doğum arasında negatif korelasyon olduğu (sırası ile $r = -0.220$; $p = 0.049$, $r = -0.277$; $p = 0.013$ ve $r = -0.250$; $p = 0.025$, $r = -0.342$; $p = 0.002$) ve folliküler IGF-II ve VEGF konsantrasyonlarının klinik gebelik ve canlı doğumun pozitif olduğu hastalarda daha düşük olduğu saptandı, (sırası ile 1142.6 ng/mL'ye karşı 1357.8 ng/mL; $p = 0.049$, 1103.2 ng/mL'ye karşı 1356.2 ng/mL; $p = 0.027$ ve 714 pg/mL'ye karşı 1028 pg/mL; $p = 0.026$, 600 pg/mL'ye karşı 1048 pg/mL; $p = 0.002$). Ayrıca folliküler AMH konsantrasyonları ile toplanan oosit sayısı, matür oosit sayısı ve implantasyon oranları arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edildi (sırası ile $r = 0.300$; $p = 0.007$, $r = 0.253$; $p = 0.024$, $r = 0.277$; $p = 0.045$).

Sonuç olarak, GnRH agonist ve antagonist protokollerinin follikülogenezde rol oynayan folliküler sıvı markırları dolayısıyla folliküler mikroçevre üzerindeki etkilerinin farklı olmadığı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Folliküler sıvı markırları, GnRH agonist, GnRH antagonist, ICSI-ET, Siklus sonuçları

SUMMARY

The effect of the different types of controlled ovarian hyperstimulation protocols on the follicular fluid markers that play a role in folliculogenesis

GnRH agonists and GnRH antagonists are widely used to prevent premature LH surge which may occur during controlled ovarian hyperstimulation, applied for multifollicular development in ART. However, whether the effects of GnRH agonists and GnRH antagonists on cycle outcomes are different or not is still a controversial issue. After observing that GnRH receptors expressed in ovarian tissue, the opinion of GnRH antagonists affect the follicular microenvironment adversely has been suggested.

The aim of our study was to determine the follicular fluid IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, Inhibin-B, VEGF and AMH concentrations of patients undergoing ICSI-ET cycles, stimulated with either the long GnRH agonist protocol or flexible multidose GnRH antagonist protocol and how they are affected by different stimulation protocols. Additionally, it was aimed to determine whether there is a relationship between them and cycle outcomes.

Between June 2009 and January 2010, Eighty patient admitted to Ankara University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology undergoing controlled ovarian hyperstimulation for ICSI-ET cycle were recruited to this study. All of the patients have been informed about the study and have signed a written informed consent to participate in the study. Of the 80 patient conforming selection criteria; 40 patient received long GnRH agonist protocol (Group 1), 40 patient received flexible multidose GnRH antagonist protocol (Group 2). Also, each group were divided into two subgroups involving 20 patients according to gonadotropin application. Half of the patients received rFSH alone (Group 1a and Group 2a) and the other half received rFSH and hMG combination (Group 1b and Group 2b). All patients follicular fluid samples were obtained from mature follicles during oocyte retrieval and stored at 80°C until assayed. Follicular concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, Inhibin-B, VEGF and AMH were measured by IRMA or ELISA methods.

Outcomes of the study were these: There was no significantly difference in cycles outcomes and follicular fluid markers between long GnRH agonist protocol (Grup 1) and flexible multidose GnRH antagonist protocol (Grup 2) cycles ($p < 0.05$). When we have evaluated the subgroups, follicular fluid concentrations of AMH were significantly lower in the rFSH and hMG combination subgroups (Group 1a ve Group 2a) than the rFSH alone subgroups (Grup 1b ve Grup 2b), (1.15 ng/mL vs 2.0 ng/mL; $p = 0.019$, 1.45 ng/mL vs 2.4 ng/mL; $p = 0.006$). The follicular fluid concentrations of AMH which is lower in subgroups that received hMG may related to higher amount of administered gonadotrophis and adding LH to stimulation protocol. Cycle outcomes related to pregnancy were not statistically different beetween subgroups ($p > 0.05$). When we have evaluate the relationship between follicular fluid markers and cycle outcomes; follicular fluid concentratios of IGF-II and VEGF were negatively corelated with clinical pregnancy and live birth (Respectively; $r = -0.220$; $p = 0.049$, $r = -0.277$; $p = 0.013$ and $r = -0.250$; $p = 0.025$, $r = -0.342$; $p = 0.002$). At the same time follicular fluid concentratios of IGF-II and VEGF were lower in the group of patient who became pregnant and had live birth (Respectively; 1142.6 ng/mL vs 1357.8 ng/mL; $p = 0.049$, 1103.2 ng/mL vs 1356.2 ng/mL; $p = 0.027$ and 714 pg/mL vs 1028 pg/mL; $p = 0.026$, 600 pg/mL vs 1048 pg/mL; $p = 0.002$). Additionally, there were a positive corelation between follicular fluid concentration of AMH with retrieved oocytes, mature oocytes and implantation rates (Respectively; $r = 0.300$; $p = 0.007$, $r = 0.253$; $p = 0.024$, $r = 0.277$; $p = 0.045$).

In conclusion, it is thought that there is no significant difference of agonist and antagonist protocol cycles on follicular fluid markers concentrations and consequently on follicular microenvironment.

Key words: Cycle outcomes, Follicular fluid markers, GnRH agonist, GnRH antagonist, ICSI-ET.

KAYNAKLAR

1. Speroff L, Fritz MA. Assisted Reproductive Technology. In: Speroff L, Fritz MA, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 1215-74.
2. Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using buserelin and gonadotropins. *Lancet*. 1984; 2(8414): 1284-5.
3. Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, al-Hasani S, Reissmann T, et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 1994; 9(5): 788-91.
4. Hsueh AJ, Erickson GF. Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: direct inhibition ovarian steroidogenesis. *Science*. 1979; 204(4395): 854-5.
5. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189(1): 289-95.
6. Ortmann O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues. *Hum Reprod*. 1999; 14 Suppl 1: 194-206.
7. Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 1994; 135(5): 1740-6.
8. Minaretzis D, Jakubowski M, Mortola JF, Pavlou SN. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80(2): 430-4.

9. Kang SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N, Leung PC. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology*. 2000; 141(1): 72-80.
10. Kang SK, Choi KC, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor gene expression and antagonizes the growth inhibitory effects of GnRH in human ovarian surface epithelial and ovarian cancer cells. *Endocrinology*. 2001; 142(2): 580-8.
11. Wang TH, Chang CL, Wu HM, Chiu YM, Chen CK, Wang HS. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril*. 2006; 86(5): 1392-401.
12. Bahceci M, Ulug U, Turan E, Akman MA. Comparisons of follicular levels of sex steroids, gonadotropins and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in poor responder and normoresponder patients undergoing ovarian stimulation with GnRH antagonist. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007; 130(1): 93-8.
13. Keay SD, Liversedge NH, Akande VA, Mathur RS, Jenkins JM. Serum IGF-1 concentrations following pituitary desensitization do not predict the ovarian response to gonadotrophin stimulation prior to IVF. *Hum Reprod*. 2003; 18(9): 1797-801.
14. Choi YS, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, et al. Comparison of follicular fluid IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A concentrations and their ratios between GnRH agonist and GnRH antagonist protocols for controlled ovarian stimulation in IVF-embryo transfer patients. *Hum Reprod*. 2006; 21(8): 2015-21.
15. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazabal A, Remohi J, Simon C, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetrorelix). *Hum Reprod*. 2001; 16(12): 2533-9.

16. de Jong D, Macklon NS, Eijkemans MJ, Mannaerts BM, Coelingh Bennink HJ, Fauser BC. Dynamics of the development of multiple follicles during ovarian stimulation for in vitro fertilization using recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon) and various doses of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Orgalutran/Antagon). *Fertil Steril*. 2001; 75(4): 688-93.
17. Fornaro F, Cobellis L, Mele D, Tassou A, Badolati B, Sorrentino S, et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist/recombinant follicle-stimulating hormone versus gonadotropin-releasing hormone antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone on follicular fluid levels of adhesion molecules during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007; 87(1): 39-47.
18. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000; 21(2): 200-14.
19. Speroff L, Fritz MA. The Ovary-Embryology and Development. In: Speroff L, Fritz MA, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 97-111.
20. Speroff L, Fritz MA. Regulation of the menstrual cycle. In: Speroff L, Fritz MA, eds. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 187-231.
21. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*. 1986; 1(2): 81-7.
22. Yong EL, Baird DT, Hillier SG. Mediation of gonadotrophin-stimulated growth and differentiation of human granulosa cells by adenosine-3',5'-monophosphate: one molecule, two messages. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992; 37(1): 51-8.
23. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*. 1997; 18(1): 71-106.

24. Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, et al. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res.* 1987; 43: 231-76.
25. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 109-26.
26. Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 163(1-2): 89-93.
27. Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod Domest Anim.* 2003; 38(4): 247-58.
28. Jimena P, Castilla JA, Peran F, Molina R, Ramirez JP, Acebal M, et al. Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1992; 96(2): 641-7.
29. Pawshe CH, Rao KB, Totey SM. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev.* 1998; 49(3): 277-85.
30. Stadtmauer L, Vidali A, Lindheim SR, Sauer MV. Follicular fluid insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 vary as a function of ovarian reserve and ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15(10): 587-93.
31. Giudice LC. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev.* 1992; 13(4): 641-69.
32. Cunha-Filho JS, Lemos NA, Freitas FM, Facin AC, Gewher-Filho PE, Passos EP. Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-

- 1 and 3 in the follicular fluid of infertile patients submitted to in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22(5): 207-11.
33. Thierry van Dessel HJ, Chandrasekher Y, Yap OW, Lee PD, Hintz RL, Faessen GH, et al. Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81(3): 1224-31.
 34. Oosterhuis GJ, Vermes I, Lambalk CB, Michgelsen HW, Schoemaker J. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum Reprod.* 1998; 13(2): 285-9.
 35. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 2000; 74(3): 429-38.
 36. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992; 13(1): 18-32.
 37. Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Baranao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod.* 2001; 16(9): 1814-8.
 38. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol.* 2005; 5(2): 111-36.
 39. Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* 1997; 11(6): 371-81.
 40. Geva E, Jaffe RB. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet Gynecol Surv.* 2000; 55(8): 511-9.

41. Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4: 18.
42. Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2003; 68(4): 1112-8.
43. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka SG, Tziotis J, Rizos D, Hassiakos D, et al. Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization. *Fertil Steril*. 2001; 76(1): 98-101.
44. Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000; 55: 109-19.
45. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril*. 1999; 72(6): 1024-6.
46. Koo YA, Lee B, Park HJ, Choi J, Lee E, Choi D. Altered vascular endothelial growth factor expression during GnRH antagonist protocol in women of reproductive age with normal baseline hormone profiles. *Fertil Steril*. 2009; 91(3): 744-8.
47. Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, et al. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004; 115(2): 194-9.

48. Doldi N, Bassan M, Fusi FM, Ferrari A. In controlled ovarian hyperstimulation, steroid production, oocyte retrieval, and pregnancy rate correlate with gene expression of vascular endothelial growth factor. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14(10): 589-92.
49. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 234(1-2): 81-6.
50. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev.* 2001; 22(5): 657-74.
51. Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005; 20(4): 923-7.
52. Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Hum Reprod.* 2010; 25(5): 1282-7.
53. Lutterodt M, Byskov AG, Skouby SO, Tabor A, Yding Andersen C. Anti-Mullerian hormone in pregnant women in relation to other hormones, fetal sex and in circulation of second trimester fetuses. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18(5): 694-9.
54. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2002; 143(3): 1076-84.
55. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10(2): 77-83.

56. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod.* 2009; 24(9): 2264-75.
57. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002; 17(12): 3065-71.
58. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction.* 2002; 124(5): 601-9.
59. Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril.* 2005; 84(1): 167-73.
60. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19(9): 340-7.
61. Eilso Nielsen M, Rasmussen IA, Fukuda M, Westergaard LG, Yding Andersen C. Concentrations of anti-Mullerian hormone in fluid from small human antral follicles show a negative correlation with CYP19 mRNA expression in the corresponding granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16(9): 637-43.
62. Yding Andersen C, Rosendahl M, Byskov AG. Concentration of anti-Mullerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(6): 2344-9.
63. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999; 140(12): 5789-96.

64. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001; 142(11): 4891-9.
65. Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, et al. Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(1): 240-5.
66. Desforges-Bullet V, Gallo C, Lefebvre C, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Increased anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010; 94(1): 198-204.
67. Andersen CY, Lossl K. Increased intrafollicular androgen levels affect human granulosa cell secretion of anti-Mullerian hormone and inhibin-B. *Fertil Steril*. 2008; 89(6): 1760-5.
68. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, et al. Correlations between anti-mullerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res*. 2007; 12(12): 604-8.
69. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008; 89(3): 586-91.
70. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(5): 1796-802.
71. Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, et al. Follicular fluid anti-Mullerian hormone and inhibin B concentrations: comparison between

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89(4): 860-7.

72. Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhauser MH, Bersinger NA. Anti-Mullerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2008; 90(6): 2203-10.
73. Ulug U, Turan E, Tosun SB, Erden HF, Bahceci M. Comparison of preovulatory follicular concentrations of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and inhibins A and B in women undergoing assisted conception treatment with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists and GnRH antagonists. *Fertil Steril*. 2007; 87(4): 995-8.
74. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM. Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65(5): 954-61.
75. Buckler HM, Healy DL, Burger HG. Purified FSH stimulates production of inhibin by the human ovary. *J Endocrinol*. 1989; 122(1): 279-85.
76. Chang CL, Wang TH, Horng SG, Wu HM, Wang HS, Soong YK. The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development. *Hum Reprod*. 2002; 17(7): 1724-8.
77. Miro F, Hillier SG. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75(6): 1556-61.
78. Sawetawan C, Carr BR, McGee E, Bird IM, Hong TL, Rainey WE. Inhibin and activin differentially regulate androgen production and 17 alpha-hydroxylase expression in human ovarian thecal-like tumor cells. *J Endocrinol*. 1996; 148(2): 213-21.
79. Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and

preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(10): 4064-9.

80. Vitale A, Lancuba S, Ballerini MG, Groome N, Campo S, Tesone M. Inhibin A and B levels in follicular fluid of patients undergoing assisted reproduction: correlation with hormone levels and pregnancy. *Fertil Steril.* 2001; 75(1): 221-2.
81. Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2001; 265(4): 175-82.
82. Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2002; 17(4): 874-85.
83. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 3: CD001750.
84. Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(6): 651-71.
85. Ludwig M, Katalinic A, Banz C, Schroder AK, Loning M, Weiss JM, et al. Tailoring the GnRH antagonist cetrorelix acetate to individual patients' needs in ovarian stimulation for IVF: results of a prospective, randomized study. *Hum Reprod.* 2002; 17(11): 2842-5.
86. Loutradis D, Stefanidis K, Drakakis P, Milingos S, Antsaklis A, Michalas S. A modified gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist protocol failed to increase clinical pregnancy rates in comparison with the long GnRH protocol. *Fertil Steril.* 2004; 82(5): 1446-8.

87. Wikland M, Bergh C, Borg K, Hillensjo T, Howles CM, Knutsson A, et al. A prospective, randomized comparison of two starting doses of recombinant FSH in combination with cetrorelix in women undergoing ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2001; 16(8): 1676-81.
88. Brus L, Lambalk CB, de Koning J, Helder MN, Janssens RM, Schoemaker J. Specific gonadotrophin-releasing hormone analogue binding predominantly in human luteinized follicular aspirates and not in human pre-ovulatory follicles. *Hum Reprod.* 1997; 12(4): 769-73.
89. Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, et al. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53(22): 5439-46.
90. Weiss JM, Krautmacher B, Polack S, Diedrich K, Ortmann O. Actions of GnRH antagonists on IGF-II, IGF-binding protein-2 and pregnancy-associated plasma protein-A in human granulosa-lutein cells. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149(1): 31-7.
91. Asimakopoulos B, Schopper B, Dawson A, Caglar GS, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, et al. IGF-I and epidermal growth factor levels in follicular fluid of women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using the multidose GnRH-antagonist protocol or the long GnRH-agonist protocol. *J Endocrinol Invest.* 2006; 29(5): RC5-8.
92. Ferrari B, Pezzuto A, Barusi L, Coppola F. Gonadotropin-releasing hormone antagonists increase follicular fluid insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor during ovarian stimulation cycles. *Gynecol Endocrinol.* 2006; 22(6): 289-96.
93. Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, et al. Anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Hum Reprod.* 2010; 25(10): 2597-604.

94. Winkler N, Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR. Gonadotropin releasing hormone antagonists suppress aromatase and anti-Mullerian hormone expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2010; 94(5): 1832-9.
95. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, et al. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*. 1995; 136(11): 4951-62.
96. Ferrari B, Pezzuto A, Barusi L, Coppola F. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are increased during GnRH antagonist/FSH ovarian stimulation cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006; 124(1): 70-6.
97. Asimakopoulos B, Nikolettos N, Nehls B, Diedrich K, Al-Hasani S, Metzen E. Gonadotropin-releasing hormone antagonists do not influence the secretion of steroid hormones but affect the secretion of vascular endothelial growth factor from human granulosa luteinized cell cultures. *Fertil Steril*. 2006; 86(3): 636-41.
98. Asimakopoulos B, Koster F, Felberbaum R, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. Cytokine and hormonal profile in blood serum and follicular fluids during ovarian stimulation with the multidose antagonist or the long agonist protocol. *Hum Reprod*. 2006; 21(12): 3091-5.
99. Balasch J, Fabregues F, Creus M, Moreno V, Puerto B, Penarrubia J, et al. Pure and highly purified follicle-stimulating hormone alone or in combination with human menopausal gonadotrophin for ovarian stimulation after pituitary suppression in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1996; 11(11): 2400-4.
100. Campo S, Garcea N. Efficacy assessment of highly purified follicle-stimulating hormone alone or in combination with human menopausal gonadotropin during pituitary suppression in patients undergoing GIFT for unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol*. 1998; 12(3): 161-6.

101. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI. Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16(1): 81-8.
102. Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM, van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008; 23(2): 310-5.
103. Fried G, Wramsby H, Tally M. Transforming growth factor-beta1, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid are differentially regulated by the type of ovarian hyperstimulation used for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998; 70(1): 129-34.
104. Hammadeh ME, Braemert B, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between ovarian stimulation regimen and cytokine concentration in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome of patients undergoing ICSI program. *Am J Reprod Immunol*. 2000; 43(1): 12-20.
105. Choi D, Hwang SS, Lee EY, Park CE, Yoon BK, Lee JH, et al. Recombinant FSH and pregnancy-associated plasma protein. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003; 109(2): 171-6.
106. Jancar N, Virant-Klun I, Osredkar J, Vrtacnik Bokal E. Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Mullerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16(5): 640-8.
107. Sanchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smits J. Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice. *Biol Reprod*. 2010; 83(4): 514-24.

108. Martin-Johnston M, Beltsos AN, Grotjan HE, Uhler ML. Adding human menopausal gonadotrophin to antagonist protocols - is there a benefit? *Reprod Biomed Online*. 2007; 15(2): 161-8.
109. Bosch E, Vidal C, Labarta E, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists--a randomized study. *Hum Reprod*. 2008; 23(10): 2346-51.
110. Requena A, Landeras JL, Martinez-Navarro L, Calatayud C, Sanchez F, Maldonado V, et al. Could the addition of hp-hMG and GnRH antagonists modulate the response in IVF-ICSI cycles? *Hum Fertil (Camb)*. 2010; 13(1): 41-9.
111. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, et al. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod*. 1994; 9(5): 902-6.
112. Dorn C, Reinsberg J, Kupka M, van der Ven H, Schild RL. Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 concentrations in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet*. 2003; 268(3): 187-93.
113. Zhang J, Li Y, Liu J, Liu D, Liu N, Chen X. [Effect of 7-day gonadotropin-releasing hormone agonist protocol on IGF-II and IGFBP-4 levels in the follicular fluid]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009; 34(3): 190-4.
114. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(5): 1946-51.
115. Nardo LG, Bellanca SA, Burrello N, Longo G, D'Agata R, Nardo F, et al. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in the follicular fluid of women undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. *Gynecol Endocrinol*. 2001; 15(6): 413-20.

116. Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril*. 2006; 85(6): 1723-9.
117. Asimakopoulos B, Nikolettos N, Papachristou DN, Simopoulou M, Al-Hasani S, Diedrich K. Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Physiol Res*. 2005; 54(3): 263-70.
118. Mashiach R, Amit A, Hasson J, Amzalzg S, Almog B, Ben-Yosef D, et al. Follicular fluid levels of anti-Mullerian hormone as a predictor of oocyte maturation, fertilization rate, and embryonic development in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010; 93(7): 2299-302.