



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθυντής: Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

---

**Διδακτορική διατριβή**

**‘Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΝΟΣ GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ LH  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΓΥΝΑΙΚΩΝ’**

**ΣΕΡΑΦΕΙΜ Χ. ΠΟΥΣΙΑΣ**  
**ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΙΑΤΡΟΣ**  
**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2019**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν. 5343/1932)».

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία υποβολής αιτήσεως: 31/01/2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 05/10/2011

Ημερομηνία κατάθεσης τελευταίας έκθεσης προόδου: 05/10/2018

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 05/04/2019

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 19/06/2019

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **κ. Νταφόπουλος Κωνσταντίνος**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας – (Επιβλέπων)
2. **κ. Δαπόντε Αλέξανδρος**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **κ. Γκαράς Αντώνιος**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής πλέον των παρακάτω μελών ΔΕΠ.

4. **κ. Γεωργούλιας Παναγιώτης**, Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. **κ. Πετεινάκη Ευθυμία**, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. **κ. Γριβέα Ιωάννα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Νεογνολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. **κ. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα**, Επίκουρος Καθηγήτρια – Μόνιμη Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή και μέντορά μου κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για την επίβλεψή του σε όλα τα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής και για την ουσιαστική συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αλέξανδρο Δαπόντε, τον Επίκουρο Καθηγητή Αντώνιο Γκαρά και την Λέκτορα Χριστίνα Μεσσήνη για την συμμετοχή τους στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής κ. Παναγιώτη Γεωργούλια, την Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας – Κλινικής Μικροβιολογίας κ. Πετεινάκη Ευθυμία, καθώς και όλη την ομάδα των εργαστηρίων τους, για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων της διδακτορικής μου διατριβής.

Σεραφείμ Χ. Πούσινας

**Στους αγαπημένους μου γονείς, Χρήστο και Βασιλική,  
στην αδερφή μου Κατερίνα,  
στη σύζυγό μου Μαρία**

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ- CURRICULUM VITAE



**ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΟΥΣΙΑΣ, M.D., M.Sc.**

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα	ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΟΥΣΙΑΣ
Διεύθυνση	Γ. Δροσίνη 9, Κηφισιά, Τ.Κ.: 14562
Τηλέφωνο	00306937244254
E-Mail	<a href="mailto:pouser@live.com">pouser@live.com</a>
Ημ. Γέννησης	5.10.1985

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΟΔΟΣ

- Ημερομηνία 04.05.2017-03.05.2019
  - Ίδρυμα Α' Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική Γ.Ν.Α.Αλεξάνδρα
- Περιγραφή θέσεως Ειδικευόμενος Μαιευτικής/Γυναικολογικής κλινικής.
  
- Ημερομηνία 25.01.2017
  - Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος στη Γερμανία
  
- Ημερομηνία 03.03.2015-11.04.2017
  - Ίδρυμα ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΒΟΛΟΥ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ/ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
- Περιγραφή θέσεως Ειδικευόμενος Μαιευτικής/Γυναικολογικής κλινικής.

- Ημερομηνία 20.01.2014-20.10.2014
  - Ίδρυμα Στρατός/Στρατιωτική θητεία
- Περιγραφή θέσεως Ιατρός Στρατού
  
- Ημερομηνία 18.04.2012-19.03.2013
  - Ίδρυμα ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΤΡΙΚΑΛΩΝ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
- Περιγραφή θέσεως Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής.
  
- Ημερομηνία 25.01.2012-09.04.2012
  - Ίδρυμα ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ- Κ.Υ. ΓΟΝΝΩΝ
- Περιγραφή θέσεως Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου

## ΣΠΟΥΔΕΣ

- Ημερομηνία 05.10.2011
  - Ίδρυμα ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ- ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
  - Τίτλος Υποψήφιος Διδάκτωρ. Θέμα διατριβής: « Η επίδραση ενός GnRH-Ανταγωνιστή στην έκκριση της LH φυσιολογικών γυναικών»  
Επιβλέπων κ. Νταφόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογικής κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
  
- Ημερομηνία 27.9.2010-17.10.2011
  - Ίδρυμα ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ- ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
  - Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Βιολογία της αναπαραγωγής»  
Συντονιστής του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Ιωάννης Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογικής κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.  
Θέμα διπλωματικής «GnRH antagonists Endocrine Action and Feedback mechanisms», Βαθμολογία διπλωματικής: 10/10
  - Τίτλος Μεταπτυχιακό Δίπλωμα με βαθμό “Άριστα”

- Ημερομηνία 1.9.2003-5.7.2010
  - Ίδρυμα ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ- ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
  - Τίτλος Πτυχίο με βαθμό “Λίαν Καλώς”
- 
- Ημερομηνία 4.9.2000-20.6.2003
  - Ίδρυμα 1<sup>ο</sup> ΕΝΙΑΙΟ ΛΥΚΕΙΟ ΚΗΦΙΣΙΑΣ
  - Τίτλος Απολυτήριο με βαθμό ‘Άριστα’

#### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ**

- 19.01.2013: Basic Life Support (BLS), European Resuscitation Council*
- 29.05.2016: Advanced Life Support in Obstetrics (ALSO)*
- 04.09.2016: Instructors’ Course in Obstetrics and Gynaecology (ICOG)*
- 22.04.2018: IOTA Certified Member*
- 27.09.2018: 16<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Σεμινάριο Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου*

#### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- CASE REPORT: HETEROTOPIC PREGNANCY IN NATURAL CONCEPTION. A CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW, HJOG, VOLUME 16, ISSUE 1, JANUARY- MARCH 2017
- PROGESTERONE APPLICATIONS IN CURRENT GYNECOLOGY, MOJ WOMENS HEALTH, VOLUME 5, ISSUE 3, 2017
- THE EFFECT OF A GnRH ANTAGONIST ON FOLLICLE MATURATION IN NORMAL WOMEN, REPROD BIOMED ONLINE, VOLUME 39, ISSUE 1, 2019



**ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ  
ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

28<sup>ο</sup> ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ 2012:  
ΚΥΚΛΙΚΗ ΜΑΣΤΑΛΓΙΑ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ  
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ  
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΑΣΣΙΚΟΥΣ  
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

7<sup>ο</sup> ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΦΥΚΕ 2015:  
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΕΩΣ ΚΑΙ ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ  
ΤΟΥ ΣΤΟ ΕΜΒΡΥΟ

8<sup>ο</sup> ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΦΥΚΕ 2016:  
Test-Pap ΣΕ ΕΦΗΒΕΣ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ. ΝΕΟΤΕΡΑ  
ΔΕΔΟΜΕΝΑ

14<sup>TH</sup> ISUOG INTERNATIONAL SYMPOSIUM, ATHENS 2018:  
E.P.: FOLLOW UP OF PATIENTS AFTER SURGICAL  
TREATMENT OF ENDOMETRIOMAS. ULTRASOUND  
FINDINGS BEFORE AND AFTER THE SURGERY AND  
EVALUATION OF TREATMENT EFFICACY TO THEIR  
SYMPTOMS.

**ΓΛΩΣΣΕΣ**

Ελληνικά (Μητρική)  
Αγγλικά (FCE Cambridge, 1999)  
*Γερμανικά (B2 Niveau)*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I.</b>	<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	12
<b>II.</b>	<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ	15
2.	GnRH ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ	19
2.1	Εισαγωγή	19
2.2	Δομή των GnRH ανταγωνιστών	20
2.3	Ενδοκρινική δράση των GnRH ανταγωνιστών	22
2.4	Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των GnRH ανταγωνιστών	25
2.5	Κλινική εφαρμογή των GnRH ανταγωνιστών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	28
3.	ΚΙΣΠΕΠΤΙΝΗ	32
3.1	Εισαγωγή	32
3.2	Δομή της Κισπεπτίνης και του υποδοχέα της KISS 1 R	34
3.3	Δράση της Κισπεπτίνης	36
3.4	Επίδραση των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης στους νευρώνες της κισπεπτίνης	38
3.5	Κλινική εφαρμογή της Κισπεπτίνης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	41
4.	ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΥΦΙΣΤΑΜΕΝΩΝ ΓΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΗΣ GnRH	43
5.	ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΖΟΥΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	46

<b>III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48
2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	52
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
<b>IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	91
<b>V. SUMMARY</b>	93
<b>VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	95

## I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη ρυθμίζεται από μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (feedback mechanisms), με τελικό αποτέλεσμα την ωρίμανση ενός ωοθυλακίου. Μέσω των ανωτέρω μηχανισμών, οι στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, επηρεάζουν την έκκριση των γοναδοτροφινών, LH και FSH, από την υπόφυση, καθώς και της GnRH, από τον υποθάλαμο. Η διερεύνηση και η προσπάθεια κατανόησης αυτής της αλληλεπίδρασης επέφερε σημαντικές εξελίξεις στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

Η ιδιότητα των GnRH αναλόγων, αγωνιστών και ανταγωνιστών, να απευαισθητοποιούν την υπόφυση, με σκοπό την πρόληψη της πρόωμης αιχμής της LH, τους κατέστησε απαραίτητα εργαλεία στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, καθώς συνέβαλαν στη μείωση των ποσοστών ακύρωσης των κύκλων θεραπείας. Η αποτελεσματικότητά τους αποτέλεσε αντικείμενο συγκριτικών μελετών μεταξύ τους και μετα-αναλύσεων, με αντικρουόμενα, όμως, αποτελέσματα. Από το 2000, οι GnRH ανταγωνιστές χρησιμοποιούνται ευρέως στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με ιδιαίτερος ενθαρρυντικά αποτελέσματα, καθώς στερούνται των παρενεργειών των GnRH αγωνιστών. Προκειμένου, δε, να διερευνηθεί η επίδραση των GnRH ανταγωνιστών στην ωοθήκη, την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την στεροειδογένεση, πραγματοποιήθηκαν αρκετές *in vivo* και *in vitro* μελέτες, οι οποίες, ωστόσο, δεν κατέληξαν σε ομόφωνα αποτελέσματα.

Περαιτέρω, νεότερα επιστημονικά δεδομένα έχουν εστιάσει στην ενδοκρινική δράση του νευροπεπτιδίου κισπεπτίνη και στη συμμετοχή του στη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, προκαλώντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα. Το 1996, μάλιστα, η κισπεπτίνη απομονώθηκε από καρκινικά κύτταρα του μελανώματος και αναγνωρίστηκε ως ένας κατασταλτικός παράγοντας μετάστασης του καρκίνου.

Σε εργασίες που ακολούθησαν από το 2003 και εφεξής βρέθηκε ότι η κισπεπτίνη διαδραματίζει, πιθανώς, κύριο ρόλο στην έναρξη της ήβης, στους μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης που λαμβάνουν χώρα στον εμμηνορρυσιακό κύκλο, στην εκδήλωση του κύματος της LH και σε παθήσεις, όπως ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός, η πρόωμη ήβη κεντρικού τύπου και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Το 2014 η κισπεπτίνη χρησιμοποιήθηκε για

πρώτη φορά σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης για την τελική ωρίμανση ωαρίων με αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Ωστόσο, αν και είναι πλέον γνωστό ότι η εξωγενώς χορηγούμενη κισπεπτίνη διεγείρει την έκκριση της GnRH και των γοναδοτροφινών, δεν υπάρχει ομοφωνία στα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τον ρόλο της στον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο για το πώς οι μεταβολές των συγκεντρώσεών της επηρεάζουν ή επηρεάζονται, μέσω μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, από τις γοναδοτροφίνες και τις στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του GnRH ανταγωνιστή Ganirelix στην έκκριση της LH και στην ωοθυλακική ωρίμανση κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του γεννητικού κύκλου, σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπλέον, έγινε ανάλυση των επιπέδων της κισπεπτίνης στον φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο και διερεύνηση της συσχέτισης των συγκεντρώσεών της και των μεταβολών των επιπέδων αυτής με τις γοναδοτροφίνες και τις στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης, με σκοπό να διαπιστωθεί εάν αυτό αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης του GnRH ανταγωνιστή.

## **II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος των γυναικών διαρκεί 28 με 35 ημέρες και αποτελείται από την ωοθυλακική και την ωχρινική φάση. Ειδικότερα, κατά την ωοθυλακική φάση, εντός περίπου 14 ημερών, πραγματοποιείται η ωρίμανση του ωοθυλακίου, το οποίο αναπτύσσεται σε ώριμο γρααφιανό, διαστάσεων περίπου 18 έως 20mm. Την 14<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου και 36 ώρες, κατ' ελάχιστον, μετά την εκκριτική αιχμή της LH, επέρχεται η ρήξη του ώριμου αυτού ωοθυλακίου, η οποία ονομάζεται ωοθυλακιόρρηξια. Το χρονικό αυτό σημείο σηματοδοτεί την έναρξη της ωχρινικής φάσης του κύκλου, κατά τη διάρκεια της οποίας το σχηματισθέν από το ωοθυλάκιο ωχρό σωματίο μεταπίπτει από την ακμή στη γήρανση, η οποία ακολουθείται από την έμμηνο ρύση (1).

Η επιλογή του επικρατούς ωοθυλακίου λαμβάνει χώρα κατά τη διακυκλική αύξηση της FSH, την επονομαζόμενη και ως παράθυρο της FSH. Ειδικότερα, στο τέλος της ωχρινικής φάσης, περίπου 2 ημέρες πριν από την έμμηνο ρύση, οι συγκεντρώσεις της FSH αυξάνονται και παραμένουν αυξημένες έως και την πρώιμη ωοθυλακική φάση, οπότε και αρχίζουν να μειώνονται, επανέρχονται, δε, στα βασικά τους επίπεδα κατά τη μέση ωοθυλακική φάση (1).

Κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου, οι θετικοί και αρνητικοί μηχανισμοί παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (feedback mechanisms) του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη επηρεάζονται, ιδίως, από τις στεροειδείς και τις μη στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης (2). Περιληπτικά, η λειτουργία του άξονα είναι η εξής: η GnRH, η οποία εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, διεγείρει την έκκριση, από την υπόφυση, των γοναδοτροφινών, FSH και LH, οι οποίες, με τη σειρά τους, διεγείρουν την έκκριση, από τις ωοθήκες, αφενός των στεροειδών ορμονών, δηλαδή των οιστρογόνων και της προγεστερόνης και αφετέρου των μη στεροειδών ορμονών, ήτοι της ανασταλτίνης (A και B), της ακτιβίνης, της φολλιστατίνης και του παράγοντα GnSAF (2, 3). (Εικόνα 1)

Η δράση των οιστρογόνων στην έκκριση της GnRH είναι διττή. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, μέσω αρνητικού παλίνδρομου μηχανισμού, η αύξηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων οιστρογόνων μειώνει το εύρος των ώσεων της GnRH και καταστέλλει την έκκριση της LH και της FSH από την υπόφυση (1, 4). Έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι, για την πτώση της LH, κατά τη

διέγερση των ωοθηκών με FSH, ευθύνεται η αύξηση των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης (2) και, ειδικότερα, ότι τα οιστρογόνα δρουν απευθείας στην υπόφυση μέσω μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, μεταβάλλοντας την ανταπόκριση των γοναδοτροφινών στην GnRH (5).

Αντίθετα, στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης, τα οιστρογόνα, σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν μία εκκριτική αιχμή της GnRH, συνοδευόμενη, στο μέσο του γεννητικού κύκλου, από το κύμα της LH (1, 4). Για τη δράση αυτή, απαραίτητη προϋπόθεση είναι οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων να ανέρχονται πάνω από 200 pg/ml για τουλάχιστον 48 ώρες. Περαιτέρω, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να συμβάλει, στον ανωτέρω θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, και η προγεστερόνη, μέσω των υποδοχέων της, καθώς, κατά την περιοθυλακιορρηκτική περίοδο, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της (2).

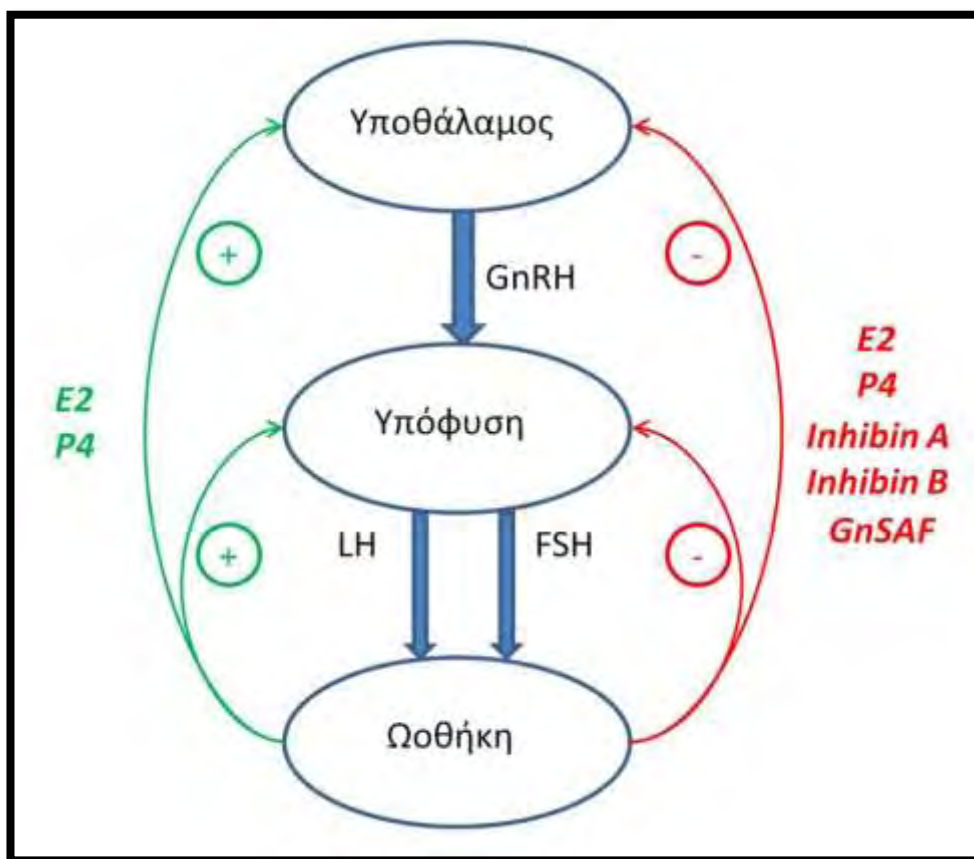
Η διάρκεια της εκκριτικής αιχμής της LH είναι 48 με 72 ώρες. Μετά την έναρξη του κύματος της LH, τα επίπεδα των οιστρογόνων αρχίζουν να μειώνονται, ενώ, αντιθέτως, τα επίπεδα της προγεστερόνης αυξάνονται και, πιθανότατα, η αύξηση αυτή ευθύνεται για τον τερματισμό του κύματος της LH (2). Μελέτη σε γυναίκες, στις οποίες προκλήθηκε κύμα της LH από εξωγενώς χορηγηθέντα οιστρογόνα, υπέδειξε ότι ο τερματισμός του κύματος αυτού δεν σχετίζεται με εξάντληση των εφεδρειών των γοναδοτρόφων κυττάρων, αλλά ενδεχομένως συμβάλλουν σε αυτόν οι εκκρινόμενες από την ωοθήκη ορμόνες, με επικρατέστερη την προγεστερόνη (6). Επιπροσθέτως, έχει προταθεί ότι ο ωοθηκικός παράγοντας GnSAF, ο οποίος εκκρίνεται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια υπό την επίδραση της FSH, εξασθενεί, αμβλύνει, το ενδογενές κύμα της LH, με αποτέλεσμα να ελέγχει το εύρος αυτού (2). (Εικόνα 2)

Υπάρχουν ενδείξεις ότι, κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης, η προγεστερόνη και τα οιστρογόνα επηρεάζουν την έκκριση της FSH και της LH, διατηρώντας τις σε χαμηλά επίπεδα. Συγκεκριμένα, δεδομένα από μελέτες σε γυναίκες, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε εξαρτηματοεκτομή, έδειξαν ότι τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώθηκαν σημαντικά κατά το πρώτο 24ωρο, ενώ, αντίθετα, τα επίπεδα των γοναδοτροφινών (FSH και LH) αυξήθηκαν. Ωστόσο, αν και τα εν λόγω ευρήματα υποδεικνύουν τον ρόλο των στεροειδών ορμονών στην έκκριση των γοναδοτροφινών, δεν διευκρινίζουν τον τρόπο με τον οποίο δρα καθεμία εξ αυτών. Για το λόγο αυτό, ενδέχεται η προγεστερόνη και τα οιστρογόνα να δρουν

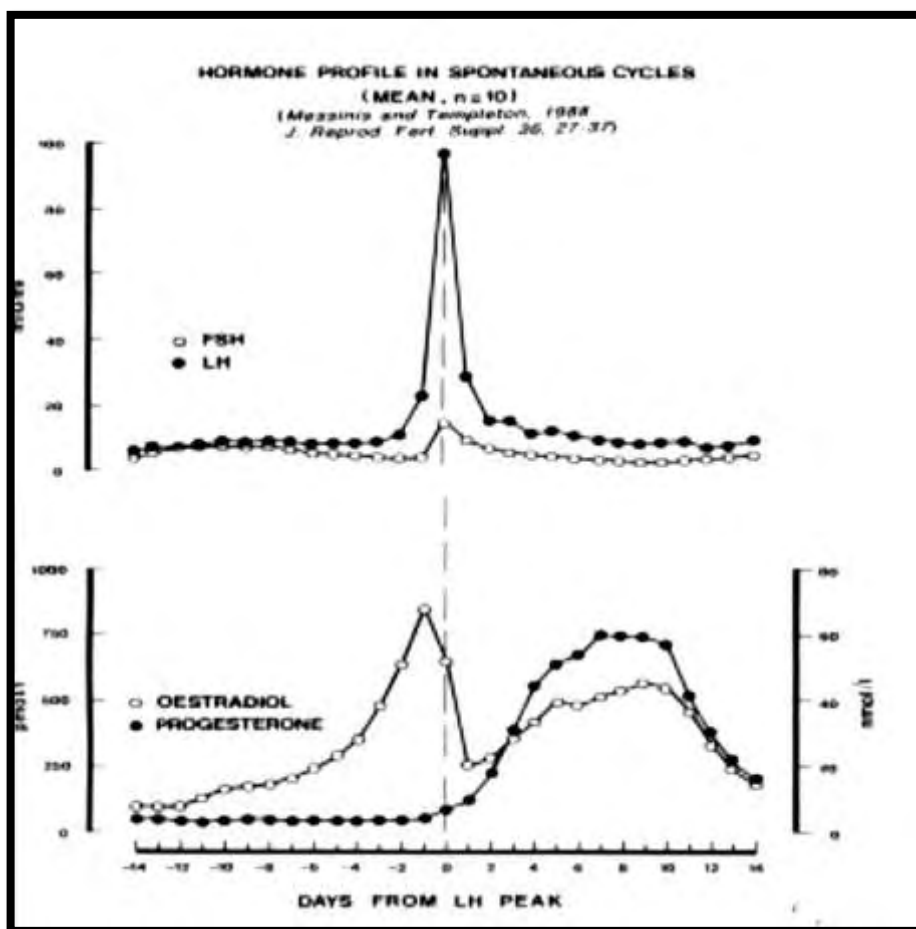


συνεργατικά στην έκκριση της FSH και της LH, μέσω αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (2).

Από τις μη στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης, η ανασταλτίνη (επονομαζόμενη και ως ινχιμπίνη) αναστέλλει την έκκριση κυρίως της FSH (2), δρώντας, πιθανότατα, απευθείας στην υπόφυση (2, 7). Ο ρόλος, δε, της ακτιβίνης στον γεννητικό κύκλο δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Δεδομένα έχουν δείξει ότι δεσμεύεται στον υποδοχέα της (ACT RII) στην υπόφυση και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροφινών και, πιθανότητα, της GnRH από τον υποθάλαμο (7). Όσον αφορά, δε, στη φολλιστατίνη, ο ρόλος της παραμένει ασαφής. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι είναι δεσμευτική πρωτεΐνη της ακτιβίνης, ενώ, σε ζωικά μοντέλα, προκαλεί μείωση των επιπέδων της FSH (2). (Πίνακας 1)



**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη και των μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. **E2**=Οιστραδιόλη, **P4**=Προγεστερόνη, **Inhibin**=Ανασταλτίνη. (+) Θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, (-) Αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης, προγεστερόνης, FSH, LH, με σημείο αναφοράς το μεσοκύκλιο κύμα της LH (day 0).

Follicular phase		Luteal phase		Luteal-follicular transition (intercycle rise of FSH)	
FSH	LH	FSH	LH	Onset	Termination
	Estradiol	Estradiol	Estradiol	Removal of negative action of:	Estradiol
Inhibin B	Progesterone	Inhibin A	Progesterone	Inhibin A	Inhibin B
				Positive action of:	
				Activin A	

Πίνακας 1. Αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των ωοθηκικών ορμονών στην έκκριση των FSH και LH, κατά την ωοθυλακική φάση (Follicular phase) και ωχρινική φάση (Luteal phase), καθώς και στο παράθυρο της FSH (2).

## 2. GnRH ANΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ

### 2.1 Εισαγωγή

Στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, για τη διέγερση των ωοθηκών, χρησιμοποιούνται γοναδοτροφίνες από μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (hMG) ή η ανασυνδυασμένη FSH (rFSH) και για την τελική ωρίμανση του ωαρίου ή την πραγματοποίηση ωοθυλακιορρηξίας χορηγείται η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη (hCG). Στις περιπτώσεις υπερδιέγερσης των ωοθηκών, καθώς και στις περιπτώσεις πρόωμης αιχμής της LH, οι κύκλοι θεραπείας ενδέχεται να ακυρωθούν (8).

Κατά τη διέγερση των ωοθηκών, λόγω της ωρίμανσης περισσότερων του ενός ωοθυλακίων, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στον ορό αυξάνονται ταχύτερα απ' ό τι στο φυσιολογικό κύκλο. Συνέπεια της αύξησης αυτής είναι η ενεργοποίηση του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, με αποτέλεσμα την εκδήλωση πρόωμης εκκριντικής αιχμής της LH. Η τελευταία έχει αρνητική επίδραση στην έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, μειώνοντας τα ποσοστά των κυήσεων, καθώς εμποδίζει την περαιτέρω ωρίμανση των ωοθυλακίων και επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα των ωαρίων, την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και τη γονιμοποίηση (9).

Ενόψει των ανωτέρω, προϋπόθεση της πρόληψης των πρόωμων αιχμών της LH αποτελεί η απευαισθητοποίηση της υπόφυσης. Αυτή επιτεύχθηκε με τα GnRH ανάλογα, ήτοι τους αγωνιστές και τους ανταγωνιστές, με αποτέλεσμα να προλαμβάνονται οι πρόωμες εκκριντικές αιχμές της LH και να μειωθούν τα ποσοστά ακύρωσης των κύκλων από 20% σε ~2% (10).

Ο χρόνος χορήγησης των GnRH αγωνιστών που απαιτείται για να απευαισθητοποιηθεί η υπόφυση είναι περίπου 14 ημέρες. Τις 2 με 3 πρώτες ημέρες της χορήγησής τους, διεγείρουν την υπόφυση να εκκρίνει γοναδοτροφίνες, φαινόμενο που είναι γνωστό ως flare up effect και, εν συνεχεία, την απευαισθητοποιούν, μέσω μείωσης του αριθμού των υποδοχέων της GnRH στην υπόφυση (down regulation) (9, 10). Μετά την πάροδο δύο εβδομάδων από τη διακοπή της χορήγησής τους, οι γοναδοτροφίνες επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ περίπου στις 6 εβδομάδες αποκαθίσταται πλήρως η λειτουργία του άξονα υποθάλαμου-υπόφυση-

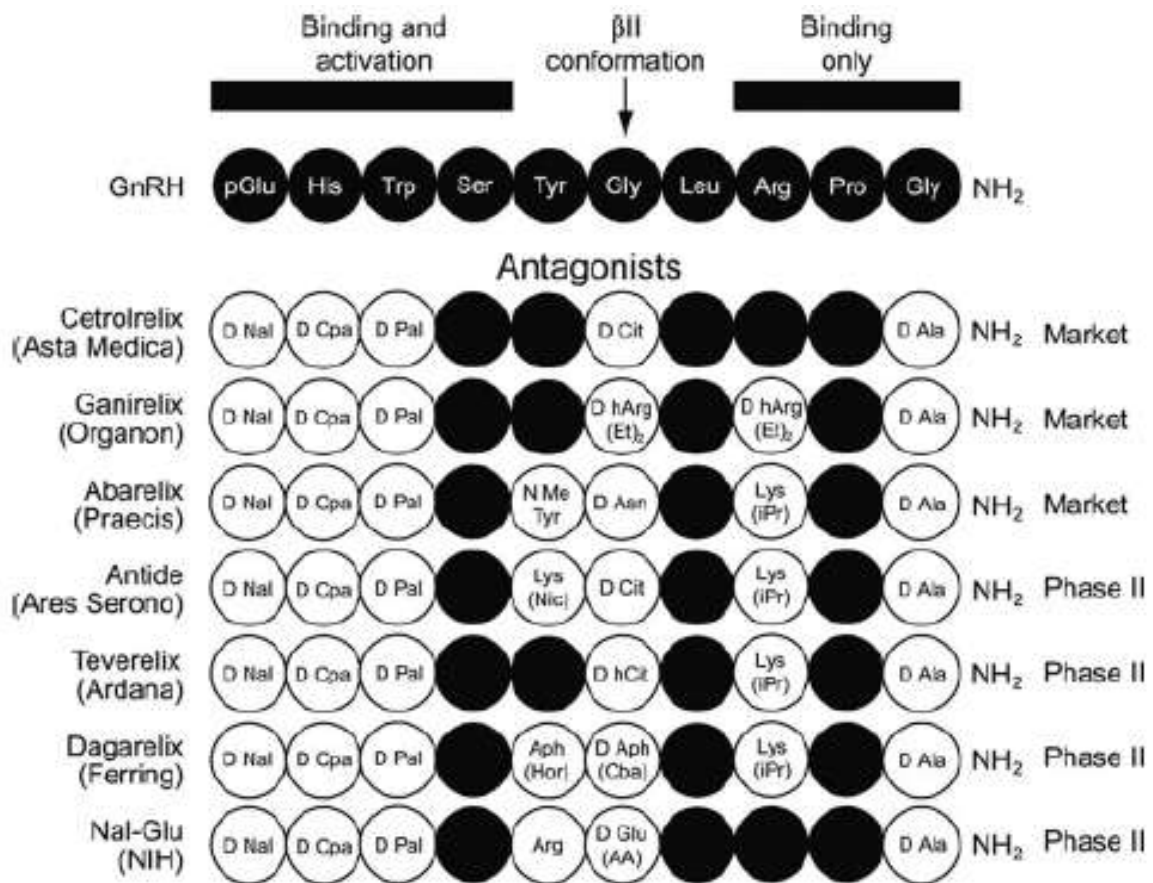
ωοθήκη (11). Κατά τη διάρκεια, όμως, του flare up effect παρατηρήθηκε ότι σχηματίζονται κύστεις στις ωοθήκες και ότι, λόγω της μακράς περιόδου απευαισθητοποίησης της υπόφυσης και της συνεπακόλουθης υποοιστρογοναιμίας, εμφανίζονται στις γυναίκες συμπτώματα, όπως πονοκέφαλοι, ξηρότητα του κόλπου, μητρορραγίες, ζαλάδες, κόπωση και εξάψεις (12, 13).

Η απευαισθητοποίηση της υπόφυσης χωρίς τις ανωτέρω παρενέργειες των GnRH αγωνιστών επιτεύχθηκε το 2001, με την εισαγωγή στην εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) των GnRH ανταγωνιστών (Ganirelix και Cetorelix) (14). Το πλεονέκτημα των ανταγωνιστών αυτών είναι ότι συνδέονται με τον υποδοχέα της GnRH, χωρίς, όμως, να τον ενεργοποιούν, με επακόλουθο την άμεση μείωση της έκκρισης των γοναδοτροφινών, χωρίς να απαιτείται μακρά περίοδος χορήγησής τους, σε αντίθεση με τους GnRH αγωνιστές. Επιπλέον, μετά το πέρας της θεραπείας με GnRH ανταγωνιστές, η υπόφυση ανακάμπτει πιο σύντομα, ήτοι 2 με 4 ημέρες (15).

## 2.2 Δομή των GnRH ανταγωνιστών

Η δημιουργία των GnRH ανταγωνιστών ξεκίνησε την δεκαετία του 1980 (9) με την αντικατάσταση αμινοξέων στο νευροπεπτίδιο της GnRH και, ειδικότερα, της ιστιδίνης (His) και της τρυπροφάνης (Trp), με D-αμινοξέα στις θέσεις 2 και 3, αποτελώντας την πρώτη γενιά ανταγωνιστών. Η μειωμένη, όμως, δράση τους έναντι της καταστολής της έκκρισης των γοναδοτροφινών οδήγησε στη δημιουργία της δεύτερης γενιάς των ανταγωνιστών με την αντικατάσταση και της γλυκίνης (Gly) στη θέση 6 (16). Ωστόσο, παρά την αποτελεσματικότητά τους, οι ανεπιθύμητες παρενέργειες της γενιάς αυτής, λόγω της έκκρισης ισταμίνης και της συνεπακόλουθης εκδήλωσης ήπιων έως σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων, τους κατέστησαν μη κλινικά αξιοποιήσιμους (10). Εμπόδιο που ξεπεράστηκε στην τρίτη γενιά των ανταγωνιστών με την χρησιμοποίηση D-ουρεΐδοακυλο αμινοξέων στη θέση 6 αντί του D-αμινοξέος, D-Arg (16). Μερικοί εξ' αυτών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη και, ιδίως, στην εξωσωματική γονιμοποίηση, είναι ο Cetorelix και ο Ganirelix (17). Τέλος, στο στάδιο κλινικών ερευνών βρίσκονται οι μη-πεπτιδικοί ανταγωνιστές,

οι οποίοι έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με τον GnRH υποδοχέα και να τον μπλοκάρουν (17, 18). (Εικόνα 3)



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της αλληλουχίας αμινοξέων της GnRH ορμόνης και της τρίτης γενιάς των GnRH ανταγωνιστών (17).

### 2.3 Ενδοκρινική δράση των GnRH ανταγωνιστών

Όπως προαναφέρθηκε, οι GnRH ανταγωνιστές στην υπόφυση συνδέονται με τον GnRH υποδοχέα, ανταγωνιζόμενοι την ενδογενή GnRH ορμόνη. Η κατάληψη αυτή του υποδοχέα οδηγεί στην άμεση καταστολή της έκκρισης των γοναδοτροφινών και τη μείωση των συγκεντρώσεών τους στον ορό του αίματος, κυρίως, δε, αυτών της LH. Η συγκριτικά μικρότερη ελάττωση των συγκεντρώσεων της FSH οφείλεται, πιθανότατα, στο μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής της. Η δράση αυτή των ανταγωνιστών έχει αποδειχθεί, από πολυάριθμες εργασίες και πολυκεντρικές μελέτες, ότι είναι δόσο-εξαρτώμενη και σχετίζεται με την αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ της GnRH ορμόνης και του ανταγωνιστή (8, 13). (Εικόνα 4)

Σημαντικό πλεονέκτημα των GnRH ανταγωνιστών έναντι των αγωνιστών και μείζονος κλινικής σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι, μετά το πέρας της θεραπείας με ανταγωνιστές, η λειτουργία της υπόφυσης και η ικανότητα απάντησης αυτής στην GnRH ανακάτται σχεδόν αμέσως (8, 13). Επιπροσθέτως, εργασία σε θηλυκά ποντίκια απέδειξε ότι η χορήγηση GnRH ανταγωνιστή συνοδεύεται από αυξημένη αποθήκευση των FSH και LH, χωρίς μεταβολή των mRNA επιπέδων τους, και μείωση του αριθμού των GnRH υποδοχέων. Η λειτουργικότητα, όμως, των εναπομεινάντων GnRH υποδοχέων διατηρήθηκε (19).

Δεδομένα από μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενδογενής GnRH επηρεάζει ποικίλως την ωοθυλακική ωρίμανση ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα, επάγει την ωρίμανση του ωαρίου και την ωοθυλακιορρηξία στα προωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια, ενώ, αντίθετα, στα μικρότερα ωοθυλάκια προάγει ανασταλτικούς παράγοντες (20). Επιπρόσθετα, αποτελέσματα δύο εργασιών in vitro υποδεικνύουν ότι η GnRH νευροορμόνη ασκεί μια αντιγοναδοτροφική επίδραση στις ωοθήκες ποντικών, μέσω της 'προς τα κάτω ρύθμισης' (down regulation) των υποδοχέων της FSH και LH (21, 22).

Ενόψει της επίδρασης της ενδογενούς GnRH στην ωοθυλακική ωρίμανση, έχουν εκπονηθεί αρκετές μελέτες με αντικείμενο την επίδραση των GnRH ανταγωνιστών σε αυτή με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ειδικότερα, από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ωοθήκες ποντικών ή σε κοκκώδη κύτταρα γυναικών προκύπτει ότι οι GnRH ανταγωνιστές δεν επηρεάζουν την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων (20, 15). Επιπροσθέτως, μετά από ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών σε

κύκλους με Cetorelix σε χαμηλή δοσολογία (0,1mg και 0,25mg), δεν ανιχνεύτηκε στο ωοθυλακικό υγρό ο Cetorelix (23).

Εν αντιθέσει, σε κύκλους θεραπείας με GnRH ανταγωνιστές, αυξημένες συγκεντρώσεις του παράγοντα VEGF παρατηρήθηκαν στο ωοθυλακικό υγρό σε σύγκριση με κύκλους GnRH αγωνιστών (24). Ενόψει τούτου, σε συνδυασμό με το ότι η υποξία και η υπογλυκαιμία διεγείρουν την έκφραση του VEGF, είχε προταθεί ότι οι GnRH ανταγωνιστές δημιουργούν ένα 'εχθρικό' περιβάλλον στα ωοθυλάκια σε σύγκριση με τους GnRH αγωνιστές. Σε νεότερη, όμως, μελέτη, αναφορικά με την παραγωγή του VEGF σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων με GnRH ανταγωνιστή και αγωνιστή, γυναικών που υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενη διέγερση ωοθηκών σε κύκλους με GnRH ανταγωνιστή, παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή του VEGF στις καλλιέργειες με GnRH ανταγωνιστή και καμία επίδραση των GnRH ανταγωνιστών στη στεροειδογένεση (25).

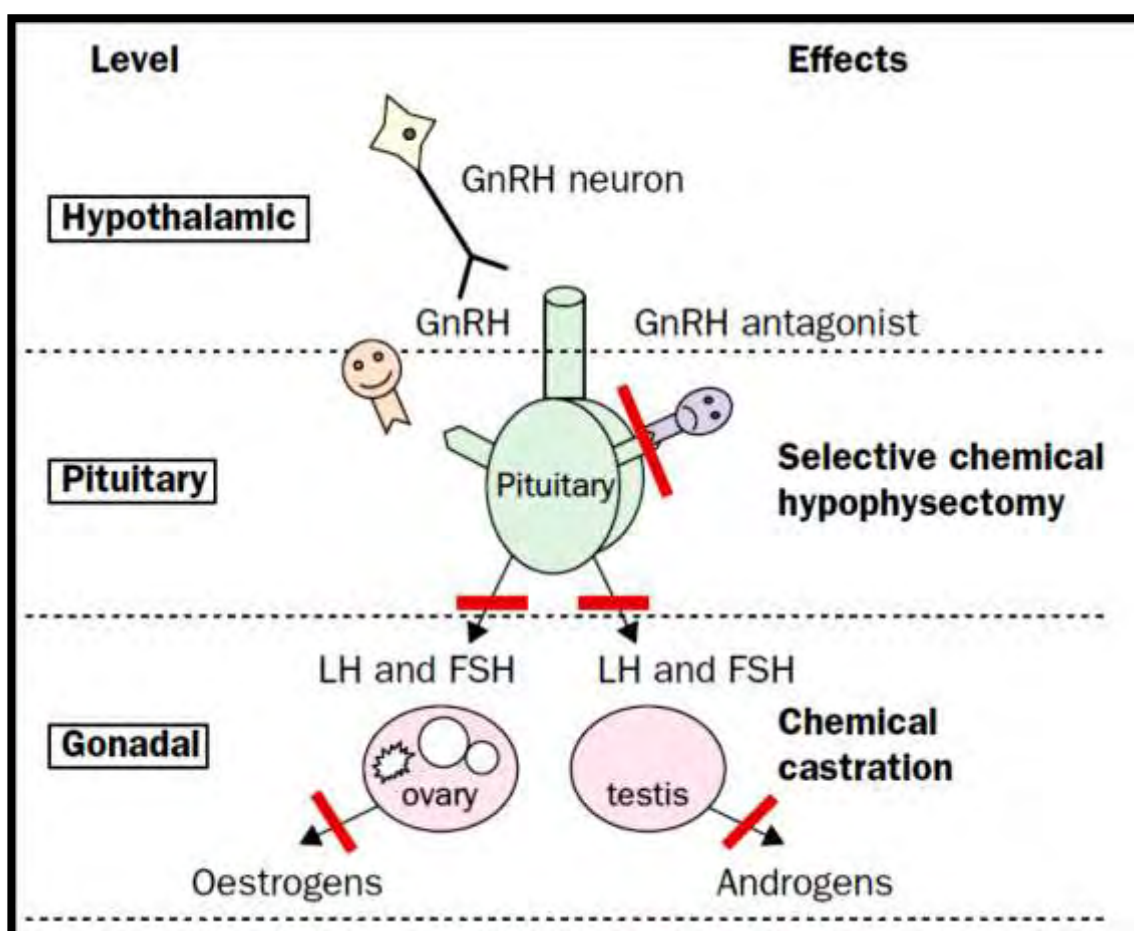
Αναλόγως, σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων γυναικών με GnRH ανάλογα, βρέθηκε ότι οι GnRH ανταγωνιστές δεν επηρεάζουν καθόλου την στεροειδογένεση (26) ή την επηρεάζουν ελάχιστα (27). Αντιθέτως, από δεδομένα δύο εργασιών, στις οποίες μετρήθηκε η συγκέντρωση της οιστραδιόλης, αφενός στο ωοθυλακικό υγρό (28) και αφετέρου στον ορό (29), γυναικών που υποβλήθηκαν σε ελεγχόμενη διέγερση ωοθηκών σε κύκλους με GnRH αγωνιστές ή ανταγωνιστές, προκύπτει στατιστικά σημαντική μειωμένη συγκέντρωση της οιστραδιόλης στους κύκλους θεραπείας με ανταγωνιστές σε σχέση με αυτούς των αγωνιστών. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι οι GnRH ανταγωνιστές επηρεάζουν την στεροειδογένεση, υπόθεση, άλλωστε, η οποία μπορεί να υποστηριχθεί από την πιθανή ανασταλτική δράση των ανταγωνιστών στην έκφραση και δράση της αρωματάσης στα κοκκώδη κύτταρα (30, 31).

Η δοσολογία των GnRH ανταγωνιστών δεν φαίνεται να επηρεάζει την ποιότητα των ωαρίων (13, 14). Ειδικότερα, σε μελέτη με 62 γυναίκες διερευνήθηκε η επίδραση των ανταγωνιστών στην ποιότητα των, μετά από κρυοσυντήρηση, ωαρίων, που είχαν ληφθεί κατόπιν θεραπείας με αγωνιστές και ανταγωνιστές, καθώς και στην ποιότητα των εμβρύων. Προς το σκοπό αυτό συγκρίθηκαν τα ποσοστά εμφύτευσης των ωαρίων και κύησης, τα οποία τελικώς δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των GnRH αναλόγων (10, 13).

Περαιτέρω, μελέτη σε 31 δότριες ωαρίων, στις οποίες χορηγήθηκε rhFSH για διέγερση των ωοθηκών σε κύκλους με Ganirelix (0,25mg, 0,5mg) και GnRH

αγωνιστή μπουσερελίνη (0,6mg/ημέρα), υπέδειξε την απουσία αρνητικής επίδρασης του GnRH ανταγωνιστή στην ανάπτυξη του ενδομητρίου. Συγκεκριμένα, από τα υπερηχογραφικά ευρήματα δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική μεταβολή ούτε στο πάχος ούτε στη μορφολογία του. Επιπλέον, κατόπιν βιοψίας του ενδομητρίου, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση του Ganirelix (σε συνήθη ή και υψηλή δοσολογία) δεν επηρέασε την έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης ούτε τη δομή της επιφάνειας του ενδομητρίου. Τέλος, σε σύγκριση με τον κύκλο που χορηγήθηκε ο GnRH αγωνιστής, στον κύκλο με Ganirelix, η ανάπτυξη του ενδομητρίου προσομοίαζε περισσότερο σε αυτή του φυσιολογικού ενδομητρίου (32).

Ωστόσο, παρά την ευρεία χρησιμοποίηση των GnRH ανταγωνιστών στην εξωσωματική γονιμοποίηση, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες προκειμένου να εξακριβωθεί η ακριβής ενδοκρινική τους δράση.



**Εικόνα 4.** Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης και δράσης των GnRH ανταγωνιστών στον υποδοχέα της GnRH στην υπόφυση (16).



## 2.4 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική των GnRH ανταγωνιστών

Όπως προαναφέρθηκε, οι GnRH ανταγωνιστές που χρησιμοποιούνται στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι ο Cetrorelix και ο Ganirelix, αμφοτέρων, δε, η κατασταλτική δράση στην έκκριση των γοναδοτροφινών είναι αφενός δοσο-εξαρτώμενη και αφετέρου αναστρέψιμη. Και οι δύο χορηγούνται υποδορίως και η βιοδιαθεσιμότητά τους ανέρχεται σε 85% για τον Cetrorelix και 91% για τον Ganirelix (8, 9).

Ο χρόνος ημιζωής του Cetrorelix είναι 20 ώρες για τη δοσολογία των 0,25 mg και 63 ώρες για τη δοσολογία των 3mg (33). Κατόπιν ερευνών, διαπιστώθηκε ότι, μετά από έγχυση μονής δόσης 3mg Cetrorelix, οι συγκεντρώσεις της LH ελαττώνονται κατά 84% μετά την πάροδο 10 ωρών και επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από περίπου 4 ημέρες. Οι, δε, συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης μειώνονται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε χρονικό διάστημα 36 ωρών. Επιπροσθέτως, μετά από άπαξ δόση 0,25mg Cetrorelix, οι συγκεντρώσεις της LH και της FSH μειώνονται, κατά 75% και 23%, αντίστοιχα, εντός χρονικού διαστήματος 6 ωρών. Επιστρέφουν, δε, σε φυσιολογικές τιμές, όπως και αυτές της οιστραδιόλης, σε διάστημα 24 ωρών (9).

Περαιτέρω δεδομένα για την κατασταλτική δράση του Cetrorelix στις γοναδοτροφίνες προέκυψαν από μελέτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε Cetrorelix στις δόσεις των 75, 150, 300, 600 και 1,200 μg ενδομυϊκώς, υποδορίως και ενδοφλεβίως. Οι συγκεντρώσεις των LH και FSH μειώθηκαν σημαντικά και η μέγιστη καταστολή τους παρατηρήθηκε μετά από 6-12 ώρες από την χορήγηση του ανταγωνιστή, ανεξαρτήτως της δόσης ή της οδού χορήγησής του (34). Χορήγηση του Cetrorelix σε υψηλές δόσεις ( 3 ή 5 mg) μπορεί να διακόψει και να καθυστερήσει το κύμα της LH, καταστέλλοντας σημαντικά τις γοναδοτροφίνες και την οιστραδιόλη στον ορό (35, 36).

Μετά από επταήμερη χορήγηση 3mg του Cetrorelix σε πέντε ωοθυλακιόρρηκτικές γυναίκες, οι συγκεντρώσεις των LH, FSH και οιστραδιόλης μειώθηκαν μετά από 75 λεπτά, 195 λεπτά και 8 ώρες, αντιστοίχως. Επιπλέον, η καθημερινή χορήγησή του είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των επιπέδων των γοναδοτροφινών και της οιστραδιόλης σε χαμηλά επίπεδα και την καθυστέρηση της ωοθυλακιόρρηξίας (37). Σε δύο επιπλέον εργασίες μελετήθηκε η επίδραση του

Cetrorelix μετά από άπαξ χορήγησή του, στις δοσολογίες των 1, 3, 5mg, σε υγιείς προεμμηνοπαυσιακές την όγδοη ημέρα του κύκλου τους. Σε αμφότερες τις μελέτες η LH και η οιστραδιόλη μειώθηκαν σημαντικά με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και η ωοθυλακιόρρηξία αναβλήθηκε, ενώ οι συγκεντρώσεις της FSH επηρεάστηκαν λιγότερο (38, 39).

Επιπροσθέτως, δύο εργασίες μελέτησαν το αποτέλεσμα της άπαξ και καθημερινής χορήγησης του Cetrorelix στις δόσεις των 0,25, 0,5 και 1 mg σε ωοθυλακιόρρηκτικές γυναίκες (40, 41). Και στις δύο μελέτες τα επίπεδα της LH μειώθηκαν σημαντικά σε όλες τις γυναίκες και με όλες τις δόσεις, με τη μέγιστη μείωση να παρατηρείται μετά από 6 ώρες. Στις ομάδες των γυναικών στις οποίες χορηγήθηκε καθημερινώς ο ανταγωνιστής, η ωοθυλακιόρρηξία καθυστέρησε για 6, 11 και 13 ημέρες (40) και για 5, 10 και 13 ημέρες (41) στη δοσολογία των 0,25, 0,50 και 1 mg, αντιστοίχως. Τα επίπεδα της FSH επηρεάστηκαν λιγότερο και της οιστραδιόλης μειώθηκαν με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (41).

Όσον αφορά στον Ganirelix, ο χρόνος ημιζωής του είναι 16 ώρες (8). Σε μελέτη στην οποία χορηγήθηκε, σε 15 ωοθυλακιόρρηκτικές γυναίκες, καθημερινώς για μία εβδομάδα στις δόσεις των 0,125, 0,25, 0,50 mg, οι κατώτερες τιμές των συγκεντρώσεων της LH παρατηρήθηκαν μετά από 4 ώρες σε όλες τις ομάδες. Τα χαμηλότερα επίπεδα της FSH παρατηρήθηκαν μετά από 12, 16 και 16 ώρες στις ομάδες των 0,125, 0,25 και 0,50 mg, αντίστοιχα. Ειδικότερα, στην ομάδα των 0,25 mg, οι συγκεντρώσεις της LH ελαττώθηκαν κατά 74%, ενώ της FSH κατά 32%, η δε, οιστραδιόλη μειώθηκε κατά 25% μέσα σε 16 ώρες μετά τη χορήγηση του Ganirelix (42).

Σε πολυκεντρική μελέτη μελετήθηκαν διαφορετικές δόσεις του Ganirelix (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 και 2 mg) σε 333 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε διέγερση ωοθηκών, προκειμένου να καθορισθεί η ελάχιστη δόση του ανταγωνιστή έναντι των πρώιμων αιχμών της LH, σε συνάρτηση με αποδεκτό κλινικό αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η δόση των 0,25 mg του Ganirelix είναι η ελάχιστη ικανή δόση που καλύπτει και τους δύο στόχους, διότι σε μικρότερες δόσεις ο ανταγωνιστής ήταν ανεπαρκής να αποτρέψει τις πρώιμες εκκριτικές αιχμές της LH. Στις, δε, δόσεις του 1 και 2 mg, εξαιτίας των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων της LH, δεν παρατηρήθηκε ωοθυλακική ανάπτυξη με τη χορήγηση μόνο της rFSH και τα ποσοστά των κυήσεων ήταν χαμηλότερα σε αυτές τις δύο ομάδες (43).

Μετά από άπαξ χορήγηση του Ganirelix στην δοσολογία των 1, 3 και 6 mg σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της LH και της FSH και στις τρεις δόσεις του ανταγωνιστή, εντός 1 και 3 ωρών, αντίστοιχα. Η μείωση αυτή διήρκησε για τουλάχιστον 48 ώρες σε όλες τις ομάδες και για 72 ώρες στις δόσεις των 3 και 6 mg (44). Σε εργασία στην οποία χορηγήθηκε καθημερινώς Ganirelix, στις δόσεις των 1 και 2 mg, σε 9 ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες για 8 ημέρες, τα επίπεδα των γοναδοτροφινών μειώθηκαν σημαντικά μετά από 8 ώρες. Οι συγκεντρώσεις της FSH επανέρχονταν στα φυσιολογικά επίπεδα πριν από την επόμενη χορήγηση του ανταγωνιστή, ενώ, αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της LH είχαν την τάση να επανέρχονται στα προ χορήγησης επίπεδα στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε 1 mg και παρέμεναν χαμηλά στην ομάδα των 2 mg. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η έκκριση της FSH επηρεάζεται λιγότερο από τους GnRH ανταγωνιστές. Η οιστραδιόλη μειώθηκε, επίσης, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις δύο ομάδες μετά από 24 ώρες και παρέμεινε χαμηλή. Επιπλέον η ωοθυλακική ανάπτυξη ανεστάλη κατά τη διάρκεια χορήγησης του Ganirelix (45). (Πίνακας 2)

Parameter	Cetrorelix <sup>[18,40]</sup>			Ganirelix <sup>[19,20]</sup>	
	single dose 3mg	single dose 0.25mg	multiple dose 0.25mg	single dose 0.25mg	multiple dose 0.25mg
$t_{max}$ (h)	1.5 (0.5–2) <sup>a</sup>	1.0 (0.5–1.5) <sup>a</sup>	1.0 (0.5–2) <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.23 <sup>b</sup>
$t_{1/2}$ (h)	62.8 (38.2–108) <sup>a</sup>	5.0 (2.4–48.8) <sup>a</sup>	20.6 (4.1–179.3) <sup>a</sup>	12.8 ± 4.3 <sup>b</sup>	16.23 ± 1.64 <sup>b</sup>
$C_{max}$ (μg/L)	28.5 (22.5, 36.2) <sup>c</sup>	4.97 (4.17, 5.92) <sup>c</sup>	6.42 (5.18, 7.96) <sup>c</sup>	14.8 ± 3.2 <sup>b</sup>	11.16 ± 2.41 <sup>b</sup>
AUC (μg • h/L)	536 (451, 636) <sup>c</sup>	31.4 (23.4, 42.0) <sup>c</sup>	44.5 (36.7, 54.2) <sup>c</sup>	94 ± 11 <sup>b,d</sup>	77.13 ± 9.75 <sup>b,e</sup>
Bioavailability (%)	85			91	

a Median (min-max).  
b Mean ± SD.  
c Mean values (95% CI).  
d AUC<sub>48h</sub>.  
e AUC<sub>24h</sub>.

AUC = area under the plasma concentration-time curve;  $C_{max}$  = peak plasma concentration;  $t_{max}$  = time to  $C_{max}$ ;  $t_{1/2}$  = half-life.

**Πίνακας 2.** Συγκεντρωτικός πίνακας των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων των GnRH ανταγωνιστών Cetrorelix και Ganirelix (9).

## 2.5 Κλινική εφαρμογή των GnRH ανταγωνιστών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Κατά τα προαναφερθέντα, οι GnRH ανταγωνιστές χρησιμοποιούνται ευρέως στην εξωσωματική γονιμοποίηση, με σκοπό την απευαισθητοποίηση της υπόφυσης, σε δύο πρωτόκολλα, το πολλαπλών δόσεων (multiple dose) και το μονής δόσης (single dose). Προκειμένου, όμως, να βρεθεί η ελάχιστη δόση που απαιτείται για την επιτυχή πρόληψη της πρόωμης αιχμής της LH, σε συνδυασμό με κλινικώς αποδεκτά ποσοστά κύησης, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από πολυκεντρικές μελέτες. Τα δεδομένα των μελετών αυτών απέδειξαν ότι οι αποτελεσματικές δόσεις είναι αυτές των 0,25 mg για το πολλαπλών δόσεων πρωτόκολλο και των 3 mg για το μονής δόσης πρωτόκολλο (9).

Ειδικότερα, στο πολλαπλών δόσεων πρωτόκολλο χορηγείται υποδορίως ανταγωνιστής στη δοσολογία των 0,25 mg, καθημερινά από την 5<sup>η</sup> ή την 6<sup>η</sup> ημέρα της διέγερσης των ωοθηκών, έως και την ημέρα χορήγησης της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG). Στο μονής δόσης πρωτόκολλο χορηγείται άπαξ, υποδορίως, μία δόση ανταγωνιστή των 3mg, την 7<sup>η</sup> ημέρα της διέγερσης. Κατ' εξαίρεση, εάν δεν υπάρξει ανάπτυξη ωοθυλακίων, με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητη η χρονική μετάθεση της χορήγησης της hCG, χορηγείται καθημερινά ανταγωνιστής στη δόση των 0,25mg, τέσσερις ημέρες μετά την πρώτη δόση έως την ημέρα χορήγησης της hCG (8). Μεταanalύσεις έδειξαν ότι τα ποσοστά κύησης δεν διαφέρουν μεταξύ των ανωτέρω πρωτοκόλλων (17). Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που εκδηλώνονται, συνήθως, κατά τη διάρκεια χορήγησης των GnRH ανταγωνιστών είναι, ιδίως, η κεφαλαλγία, το αίσθημα κόπωσης, καθώς και αντιδράσεις στο σημείο χορήγησής τους, όπως ερύθημα και κνησμός (9). (Εικόνα 5)

Εναλλακτικά του πολλαπλών δόσεων πρωτοκόλλου, στο οποίο, όπως προαναφέρθηκε, επιλέγεται ως χρονική αφετηρία χορήγησης των GnRH ανταγωνιστών η 6<sup>η</sup> ημέρα διέγερσης (fixed protocol), στο flexible protocol οι GnRH ανταγωνιστές χορηγούνται όταν διαπιστωθεί, υπερηχογραφικά, ανάπτυξη ωοθυλακίων διαμέτρου 14-16 mm. Μεταanalύσεις έχουν δείξει ότι τα ποσοστά κύησης στο flexible protocol είναι μικρότερα σε σχέση με το fixed protocol, διαφορά, όμως, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική (17).

Η εφαρμογή των GnRH ανταγωνιστών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα. Ειδικότερα, με τους GnRH ανταγωνιστές επιτυγχάνεται άμεσα (σε διάστημα ωρών) η απευαισθητοποίηση της υπόφυσης, χωρίς το flare up effect των GnRH αγωνιστών και προλαμβάνονται οι πρώιμες αιχμές της LH, με ποσοστά αποτυχίας κάτω του 2% (17). Επιπλέον, σε κύκλους θεραπείας με ανταγωνιστές, λόγω της διατήρησης της ανταπόκρισης της υπόφυσης στην GnRH, δύνανται να χρησιμοποιηθούν, για την τελική ωρίμανση του ωαρίου, GnRH αγωνιστές αντί της hCG. Η εναλλακτική αυτή επιλογή έχει μεν ως όφελος τη μείωση των ποσοστών εκδήλωσης του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS), αλλά, στον αντίποδα, τα ποσοστά κύησης είναι μειωμένα, πιθανότατα, λόγω ανεπάρκειας της ωχρινικής φάσης (17, 46). Επιπροσθέτως, οι κύκλοι θεραπείας με GnRH ανταγωνιστές διαρκούν λιγότερο σε σύγκριση με τους αγωνιστές και, περαιτέρω, χρησιμοποιείται μικρότερη ποσότητα εξωγενώς χορηγούμενων γοναδοτροφινών, με σημαντικό οικονομικό όφελος (17).

Στην επιστημονική κοινότητα τέθηκε ο προβληματισμός ποιο εκ των δύο GnRH αναλόγων προλαμβάνει αποτελεσματικότερα τις πρώιμες αιχμές της LH, με μεγαλύτερα ποσοστά κύσεων και λιγότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως το OHSS. Ο προβληματισμός αυτός έδωσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση συγκριτικών μελετών μεταξύ των GnRH αγωνιστών και ανταγωνιστών στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ορισμένες εξ αυτών αναφέρουν μικρή μείωση των ποσοστών κύησης στους κύκλους θεραπείας με GnRH ανταγωνιστές σε σύγκριση με αυτούς με GnRH αγωνιστές (17), χωρίς, ωστόσο, να λείπουν και συγκριτικές μελέτες, οι οποίες, αντιθέτως, υποδεικνύουν ότι δεν υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά κύησης μεταξύ των ανωτέρω δύο GnRH αναλόγων (47-49). Από την πλειονότητα, όμως, των συγκριτικών μελετών και μεταanalύσεων προκύπτει ότι η χορήγηση των GnRH ανταγωνιστών στην εξωσωματική γονιμοποίηση συνδέεται με μικρότερα ποσοστά εκδήλωσης του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (47-49).

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι δεδομένα κλινικών μελετών θέτουν υπό αμφισβήτηση την ικανότητα των GnRH ανταγωνιστών να προλαμβάνουν τις πρώιμες αιχμές της LH (50-52). Ειδικότερα, σε μία εξ αυτών, χορηγήθηκε, σε 107 γυναίκες, για ήπια ωοθηκική διέγερση, κιτρική κλομιφαίνη, σε συνδυασμό με hMG ή rhFSH, σε πολλαπλών δόσεων πρωτόκολλο του GnRH ανταγωνιστή στη δόση των 0,25 mg/ημέρα, με έναρξη την 6<sup>η</sup> ημέρα της διέγερσης, έως και την ημέρα χορήγησης της HCG. Στις γυναίκες αυτές παρατηρήθηκε πρώιμη αιχμή της LH σε ποσοστό που

ανήλθε συνολικά σε 21,5%, το οποίο δεν είναι, σε καμία περίπτωση, αποδεκτό στην κλινική πρακτική. Μία πιθανή εξήγηση των ευρημάτων της ανωτέρω μελέτης είναι ότι η προσθήκη της, έχοντας αντι-οιστρογονική δράση, κιτρικής κλομιφαίνης πιθανώς συνδέεται με την αύξηση της έκκρισης της GnRH ή της ευαισθησίας της υπόφυσης σε αυτή (50).

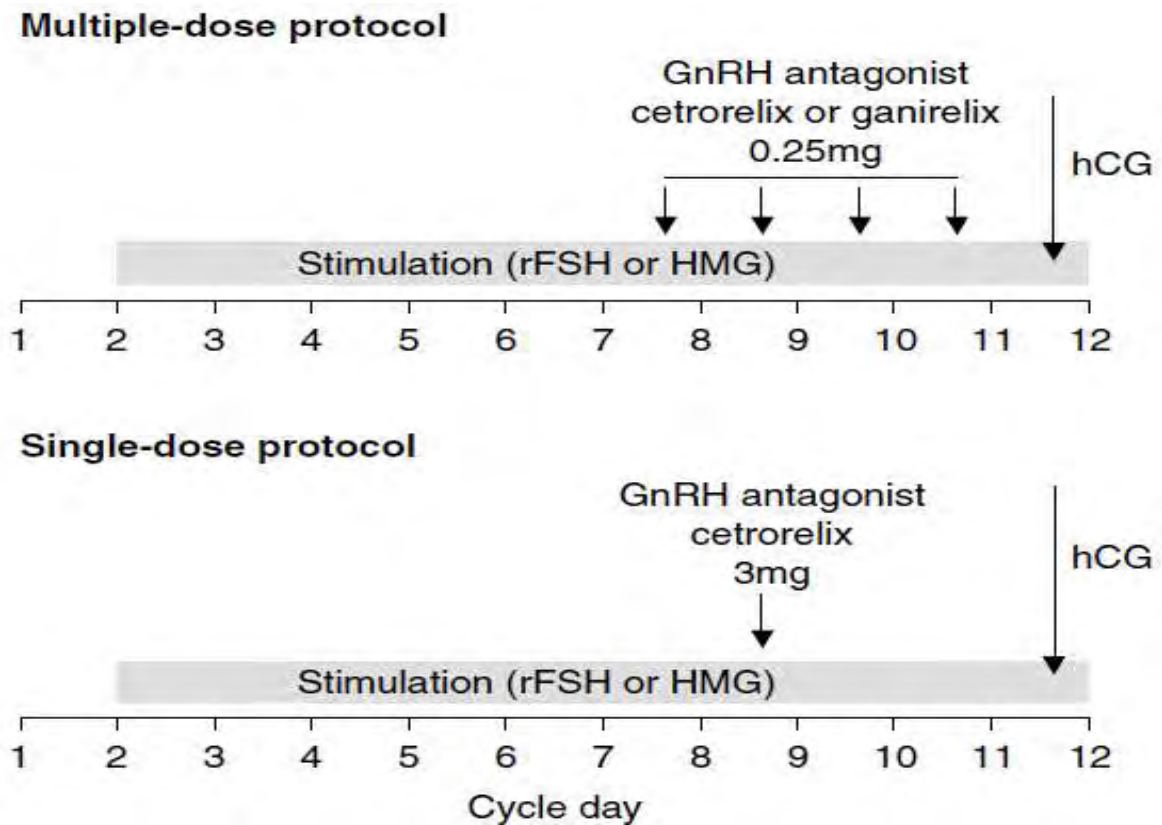
Επιπλέον, σε μεταγενέστερη μελέτη, σε δύο ομάδες γυναικών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε διέγερση ωοθηκών με rFSH, χορηγήθηκε υποδορίως Ganirelix, στη δοσολογία των 0,25 mg, με έναρξη από την 6<sup>η</sup> ημέρα της διέγερσης και, ειδικότερα, στην ομάδα 1 (37 γυναίκες) ημερησίως έως την ημέρα χορήγησης της HCG, ενώ στην ομάδα 2 (36 γυναίκες) ανά 48ωρο (51). Τα ποσοστά εκδήλωσης των πρώιμων αιχμών της LH ήταν παρόμοια και ιδιαίτερα υψηλά σε αμφότερες τις ομάδες (35% για την ομάδα 1 και 39% για την ομάδα 2), υποδεικνύοντας ότι η αποτελεσματικότητα του ανταγωνιστή είναι η ίδια τόσο στην καθημερινή όσο και στην ανά 48ωρο χορήγησή του (51).

Τα ανωτέρω ευρήματα συνηγορούν υπέρ του ότι οι GnRH ανταγωνιστές, στην καθημερινή δοσολογία των 0,25 mg, πιθανώς, δεν δρούν αποτελεσματικά στην αναστολή της πρώιμης ευαισθητοποίησης της υπόφυσης στα οιστρογόνα σε κύκλους IVF (50, 51).

Επιπροσθέτως, σύμφωνα με κλινική έρευνα, η καθημερινή χορήγηση Ganirelix, στη δοσολογία των 0,25 mg, για 5 ημέρες, απέτυχε να αναστείλει το μηχανισμό θετικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των εξωγενώς χορηγηθέντων οιστρογόνων. Η αποτυχία αυτή μπορεί να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων του Ganirelix προς τα τέλη του 24ωρου μετά τη χορήγησή του, αποτελώντας ένα «παράθυρο» για τη δράση των οιστρογόνων στην υπόφυση, με αποτέλεσμα την εκδήλωση πρώιμου κύματος της LH. Δεν αποκλείεται, πάντως, η χορήγηση ανταγωνιστή σε δόσεις άνω των 0,25 mg να έχει αποτελεσματική δράση (52). Περαιτέρω, βάσει των αποτελεσμάτων της τελευταίας μελέτης και λαμβανομένου υπόψη του ότι σε κύκλους θεραπείας IVF δεν παρατηρούνται οι ανωτέρω εκκριτικές αιχμές της LH, έχει προταθεί ότι, κατά τη διέγερση των ωοθηκών, στην πρόληψη της πρώιμης αιχμής της LH συμμετέχει, πιθανότατα, πέραν του ανταγωνιστή και ο παράγοντας GnSAF, του οποίου η συγκέντρωση αυξάνεται λόγω της πολλαπλής ανάπτυξης ωοθυλακίων (52).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση των συγκεντρώσεων της LH μετά τη χορήγηση

του ανταγωνιστή (53). Το ίδιο, δε, υποδεικνύει και η προαναφερθείσα μελέτη, στην οποία δεν διαπιστώθηκε μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων της LH, κατόπιν χορήγησης του ανταγωνιστή, από αυτή που σημειώθηκε με την εξωγενή χορήγηση των οιστρογόνων. Από τα ανωτέρω μπορεί να συναχθεί ότι οι εν λόγω ανταγωνιστές ενδέχεται να συμμετέχουν μόνο μερικώς στην αναστολή της έκκρισης της LH (52).



**Εικόνα 5.** Σχηματική απεικόνιση των πρωτοκόλλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στα οποία χρησιμοποιούνται οι GnRH ανταγωνιστές (9).

### 3. ΚΙΣΠΕΠΤΙΝΗ

#### 3.1 Εισαγωγή

Η έναρξη της ήβης σηματοδοτείται από την εκκίνηση των κατά ώσεων έκκρισης της GnRH, η οποία οδηγεί στην έκκριση των γοναδοτροφινών και των ωοθηκικών στεροειδών, ένα φαινόμενο, το οποίο δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό. Μετά από την ανακάλυψη και ταυτοποίηση των GnRH νευρώνων, ακολούθησαν πολυάριθμες εργασίες για την εύρεση του τρόπου με τον οποίο τα οιστρογόνα επηρεάζουν, μέσω μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, την έκκριση της GnRH, διότι σε αυτούς τους νευρώνες δεν εκφράζονται οιστρογονικοί υποδοχείς και, συγκεκριμένα, οι ER-α υποδοχείς (54, 55).

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν, ενδεχομένως, την έκκριση της GnRH, από τους GnRH νευρώνες, δρώντας στον υποθάλαμο και συγκεκριμένα στον υπερχιασματικό και περικοιλιακό προοπτικό πυρήνα (4). Ειδικότερα, η ανωτέρω επιρροή επιτυγχάνεται, πιθανότατα, αφενός, μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (ER-α και ER-β), ή, σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, και μέσω μεμβρανικών υποδοχέων και αφετέρου, μέσω των νευροδιαβιβαστών, στους οποίους περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), τα αμινοξέα (γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ), η νορεπινεφρίνη, τα οπιοειδή και η κισπεπτίνη (54-56).

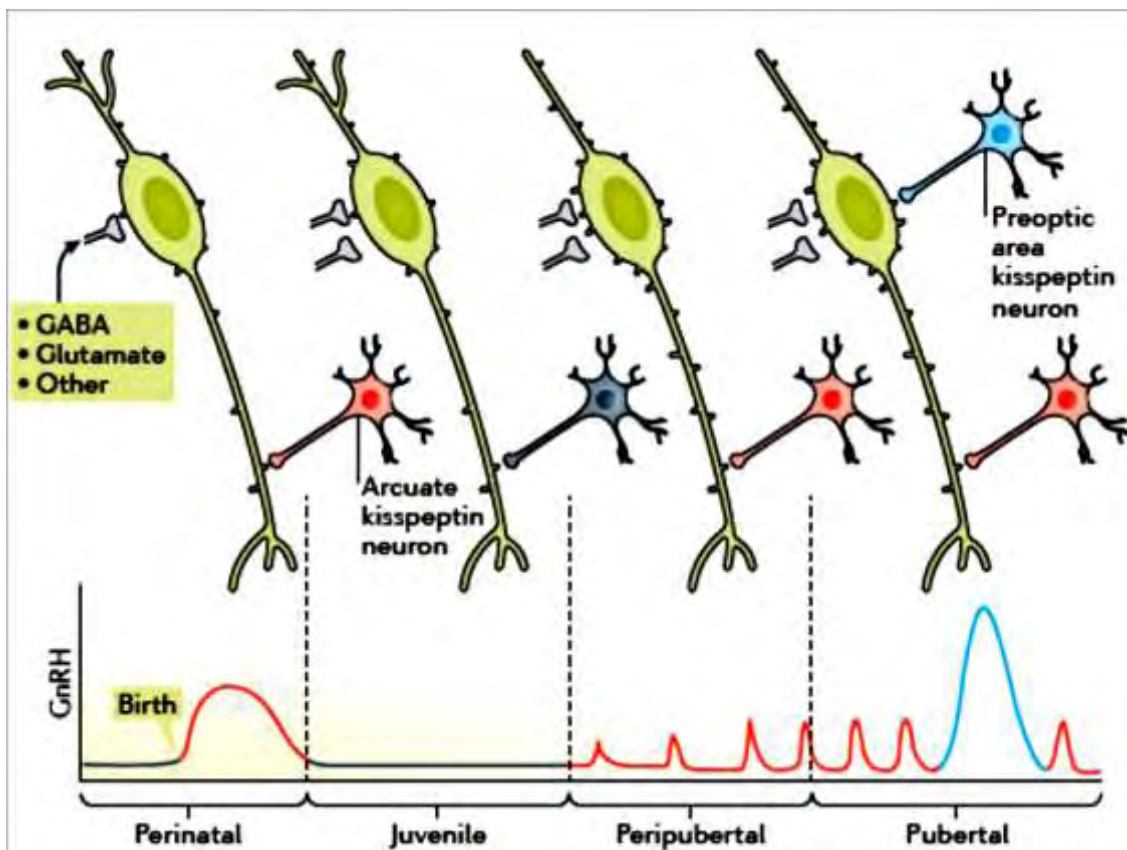
Το 2003 δύο μελέτες συσχέτισαν την κισπεπτίνη με το αναπαραγωγικό σύστημα (57, 58), καθώς σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα της κισπεπτίνης GPR54 (KISS1R) που τον καθιστούσε μη ενεργό. Σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με την ίδια μετάλλαξη στον υποδοχέα GPR54, παρατηρήθηκε παρόμοιος φαινότυπος υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού και χαμηλά επίπεδα γοναδοτροφινών και GnRH, τα οποία με εξωγενή χορήγηση GnRH επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα (58). Επιπροσθέτως, σε ασθενείς με πρόιμη ήβη κεντρικού τύπου διαπιστώθηκε αυτοσωμική επικρατής μετάλλαξη στον υποδοχέα GPR54 (59) και αυξημένα επίπεδα κισπεπτίνης (60).

Η έκφραση του γονιδίου της κισπεπτίνης KISS-1 είναι ελάχιστη πριν την έναρξη της ήβης, ενώ αυξάνεται κατά τη διάρκειά της. Χορήγηση κισπεπτίνης σε σεξουαλικά ανώριμα ζωικά μοντέλα οδήγησε σε πρόιμη ήβη κεντρικού τύπου και σεξουαλική ωρίμανση (60). Επιπλέον, σε τρωκτικά με γοναδεκτομή παρατηρήθηκαν



αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου KISS-1, τα οποία μειώθηκαν μετά από θεραπεία υποκατάστασης με στεροειδή του φύλου (61).

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κισπεπτίνη επηρεάζει την έκκριση της GnRH και των γοναδοτροφινών. Ενδέχεται, δε, να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ήβης, στο αναπαραγωγικό σύστημα των ανθρώπων και στον τρόπο με τον οποίο τα οιστρογόνα μπορούν να επηρεάζουν την έκκριση της GnRH, μέσω αρνητικού και θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. (Εικόνα 6)



**Εικόνα 6.** Σχηματική απεικόνιση του δικτύου των GnRH νευρώνων και του μοτίβου έκκρισης της GnRH ανάλογα με το στάδιο σεξουαλικής ωρίμανσης. **GABA**=Γ-αμινοβουτυρικό οξύ, **Glutamate**=Γλουταμινικό οξύ, **Preoptic area (POA)**=Προοπτική περιοχή, **Arcuate nucleus**=Τοξοειδής πυρήνας (55).

### 3.2 Δομή της Κισπεπτίνης και του υποδοχέα της KISS 1 R

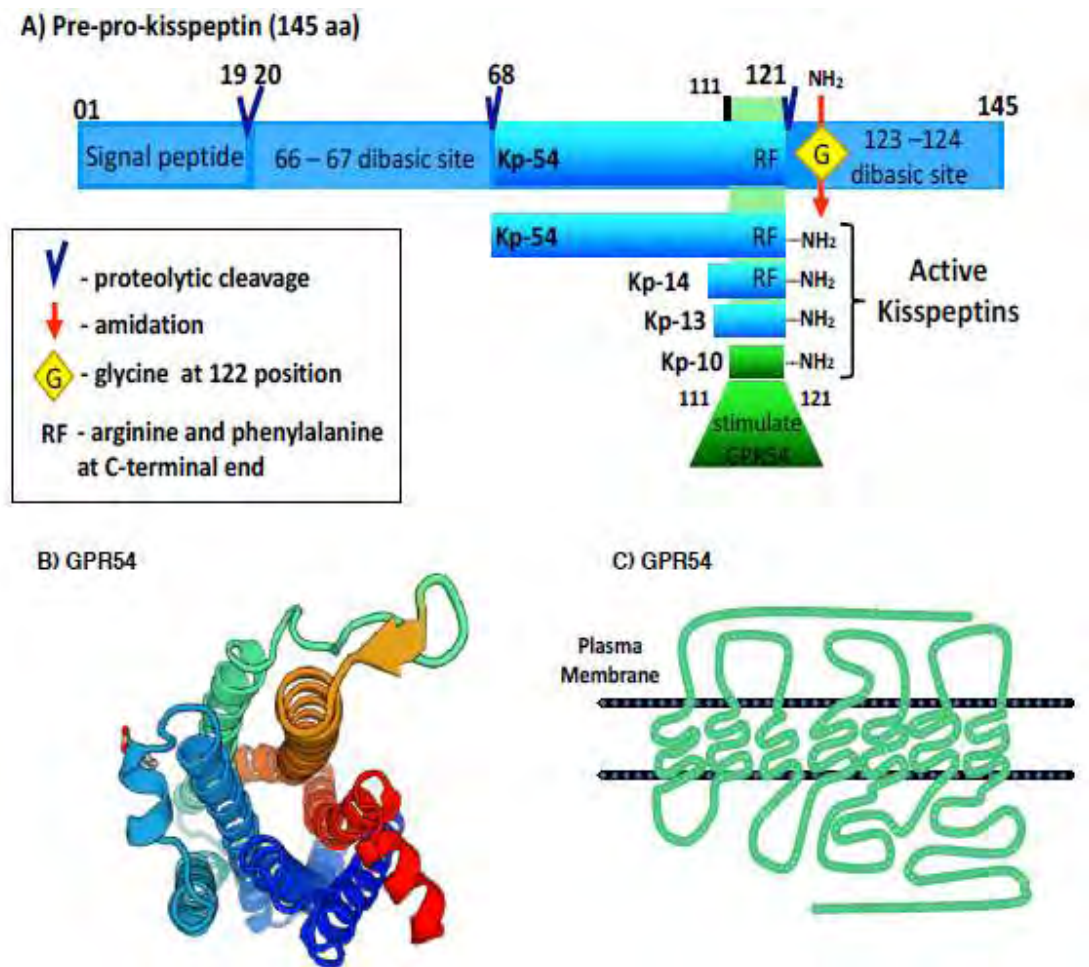
Οι κισπεπτίνες ανήκουν στην οικογένεια νευροπεπτιδίων, τα οποία προκύπτουν μετά από πρωτεολυτική εξεργασία του πρωτογενούς μετάγραφου 145 αμινοξέων του KISS-1 γονιδίου στις θέσεις 66-67 και 123-124. Ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται οι κισπεπτίνες διακρίνονται στις Kp-54 (παλαιότερα γνωστή ως metastin), Kp-14, Kp-13 και Kp-10. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα καρβοξυ-τελικά άκρα όλων των ενεργών πεπτιδίων της κισπεπτίνης αποτελούνται από ακολουθία LRF-αμίδιο, ενόψει του ότι πεπτίδια με RF-αμίδιο ακολουθία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή και λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές (60-62).

Τα καρβοξυ-τελικά άκρα των κισπεπτινών συνδέονται στον, μέχρι πρότινος ορφανό, υποδοχέα Kiss 1 r (παλαιότερα γνωστό με διάφορους όρους, όπως GPR54, AXOR 12, hOT7T175 και HH8), ο οποίος ανήκει στην ομάδα των Gq υποδοχέων, των οποίων η G πρωτεΐνη της α-υπομονάδας τους οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (60, 62, 63). Αποτελείται από 398 αμινοξέα, από ένα εξωκυττάριο αμινο-τελικό άκρο ακολοθούμενο από 7 διαμεμβρανικές έλικες και εν συνεχεία από ένα ενδοκυττάριο καρβοξυ-τελικό τμήμα (60). Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C είναι η αύξηση της διακυλ-γλυκερόλης (DAG) και της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>). Η διακυλ-γλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση MAPK κινασών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες. Συνέπεια, δε, των ανωτέρω αποτελούν η εκπόλωση των GnRH νευρώνων και η έκκριση της GnRH (63). (Εικόνα 7)

Η κισπεπτίνη εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στον πλακούντα, στις γονάδες, στο πάγκρεας και στο ήπαρ. Όσον αφορά στο κεντρικό νευρικό σύστημα, νευρώνες της κισπεπτίνης έχουν ανευρεθεί κυρίως στον υποθάλαμο και, συγκεκριμένα, στην προοπτική περιοχή (POA) στους ανθρώπους, η οποία είναι αντίστοιχη της περικοιλιακής περιοχής της τρίτης κοιλίας (RP3V) στα τρωκτικά, και στον τοξοειδή πυρήνα (ARC), και στα βασικά γάγγλια (62, 63).

Ο Kiss 1 r υποδοχέας εκφράζεται στον υποθάλαμο, κυρίως στην προοπτική περιοχή, στην πλειονότητα των GnRH νευρώνων, καθώς και στον τοξοειδή πυρήνα (ARC). Εκτός του υποθαλάμου, ο υποδοχέας έχει βρεθεί, επίσης, στον ιππόκαμπο,

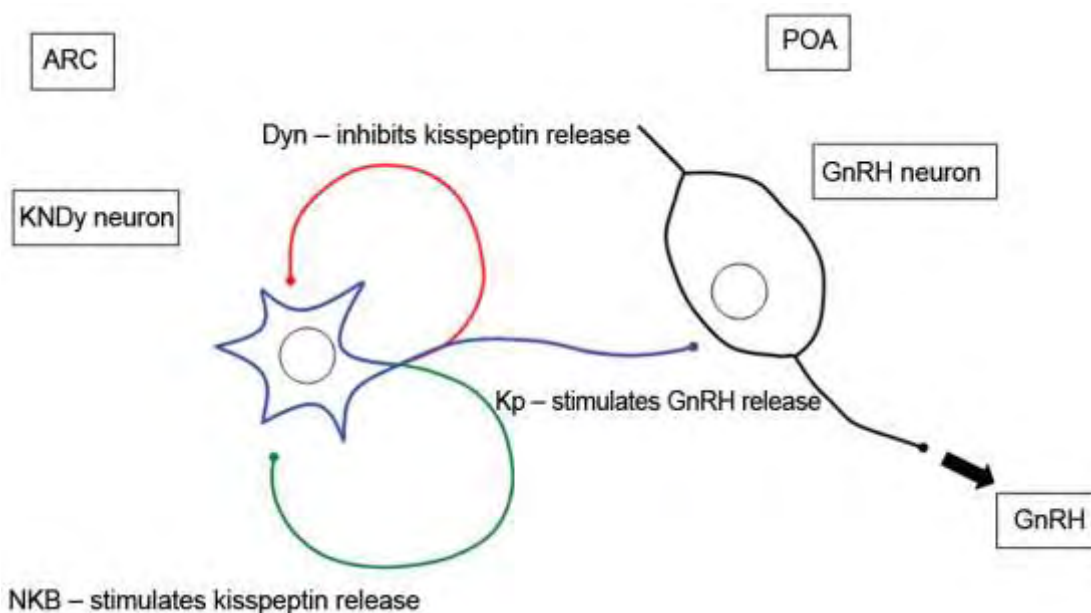
στην αμυγδαλή, στην πρόσθια υπόφυση (στα γοναδοτρόφα κύτταρα), στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στις γονάδες και στον πλακούντα (60, 62, 63).



**Εικόνα 7. Α)** Πολυπεπίδιο κισπεπτίνης και μονοπάτια πρωτεολυτικών εξεργασιών αυτής προς δημιουργία ενεργών μορφών κισπεπτίνης ( Kp-54, Kp-14, Kp-13 και Kp-10). **Β)** Στερεοδιάταξη του GPR54 υποδοχέα. **Γ)** Απεικόνιση του GPR54 υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη (60).

### 3.3 Δράση της Κισπεπτίνης

Δεδομένα από μελέτες σε θηλαστικά και στον άνθρωπο υποδεικνύουν ότι η κισπεπτίνη λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της GnRH, της σεξουαλικής ωρίμανσης και της φυλετικής διαφοροποίησης του εγκεφάλου (64). Οι νευρώνες της κισπεπτίνης, στον τοξοειδή πυρήνα κυρίως, λειτουργούν ως ένα δίκτυο νευρώνων, το οποίο αλληλεπιδρά με τους GnRH νευρώνες. Εκτός της κισπεπτίνης, εκκρίνουν και άλλα δύο νευροπεπτίδια, την νευροκινίνη Β (NKB) και την δυνορφίνη (Dyn), με τους υποδοχείς αυτών να ανευρίσκονται αφενός στο, επονομαζόμενο πλέον, KNDy δίκτυο νευρώνων (Kisspeptin-Neurokinin B-Dynorphin) και αφετέρου στους GnRH νευρώνες. Η NKB στους ανθρώπους ονομάζεται ταχυκινίνη (TAC3) και δεσμεύεται στον υποδοχέα της TACR3, διεγείροντας την δράση της κισπεπτίνης, ενώ η Dyn την αναστέλλει (63, 64). Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις στην TAC3 ή του υποδοχέα της TACR3 σχετίζονται στους ανθρώπους με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (64, 65). (Εικόνα 8)



**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση αλληλοεπίδρασης των νευροπεπτιδίων του KNDy δικτύου νευρώνων στον υποθάλαμο **Preoptic area (POA)**=Προοπτική περιοχή, **Arcuate nucleus (ARC)**=Τοξοειδής πυρήνας (63).

Έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι η κισπεπτίνη διεγείρει την έκκριση της LH in vivo, ανεξαρτήτως της οδού χορήγησής της και του σταδίου σεξουαλικής ωρίμανσης (61). Αύξηση των επιπέδων της LH, σε ζωικά μοντέλα, παρατηρήθηκε ακόμη και σε πολύ χαμηλές δοσολογίες, όπως του 1 fmol, υποδεικνύοντας έτσι την έκδηλη επίδραση της κισπεπτίνης στην έκκριση της LH. Διαπιστώθηκε, επίσης, παρόμοια αύξηση των επιπέδων της FSH, όχι όμως τόσο άμεση όσο της LH. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι όταν χορηγήθηκε GnRH ανταγωνιστής (acyline), αναστάλθηκε η διεγερτική επίδραση της κισπεπτίνης στις γοναδοτροφίνες (66). Επιπροσθέτως, συνεχής χορήγηση κισπεπτίνης σε γυναίκες, με υποθαλαμικής αιτιολογίας αμηνόρροια, οδήγησε, μετά από την αρχική αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροφινών, σε μείωση αυτών, πιθανότατα λόγω απευαισθητοποίησης του υποθαλάμου στην δράση της κισπεπτίνης (67).

Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η κισπεπτίνη εκκρίνεται κατά ώσεις και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροφινών μέσω της GnRH ορμόνης και του υποδοχέα της και υποστηρίζουν το μοντέλο της δράσης της κισπεπτίνης στους GnRH νευρώνες με τον Kiss 1 r υποδοχέα της. Επιπλέον, η κισπεπτίνη διεγείρει όχι μόνο την έκκριση, αλλά και την έκφραση της GnRH ορμόνης (60-62).

Η κισπεπτίνη απομονώθηκε αρχικώς από κύτταρα του μελανώματος, στα οποία η κύρια λειτουργία της ήταν ο περιορισμός της μετάστασης του καρκίνου (68). Έκτοτε ακολούθησαν και άλλες μελέτες, όπου υπέδειξαν τον κατασταλτικό ρόλο του γονιδίου KISS-1 και σε άλλους καρκίνους, όπως του θυρεοειδούς, του παγκρέατος, του μαστού, του οισοφάγου και της ουροδόχου κύστεως (63, 69).

Νεότερα δεδομένα συσχετίζουν την κισπεπτίνη με το συναίσθημα, την ερωτική επιθυμία και τον μεταβολισμό. Ορμόνες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό, όπως η λεπτίνη, η ινσουλίνη και η γρελίνη, φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τους νευρώνες της κισπεπτίνης επηρεάζοντας πιθανότατα την έκκρισή της (61-63). Τέλος, έχει αναπτυχθεί η θεωρία ότι η κισπεπτίνη συμμετέχει στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), διότι στις γυναίκες αυτές τα επίπεδα της κισπεπτίνης είναι αυξημένα και έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων κισπεπτίνης και LH (70).

### 3.4 Επίδραση των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης στους νευρώνες της κισπεπτίνης

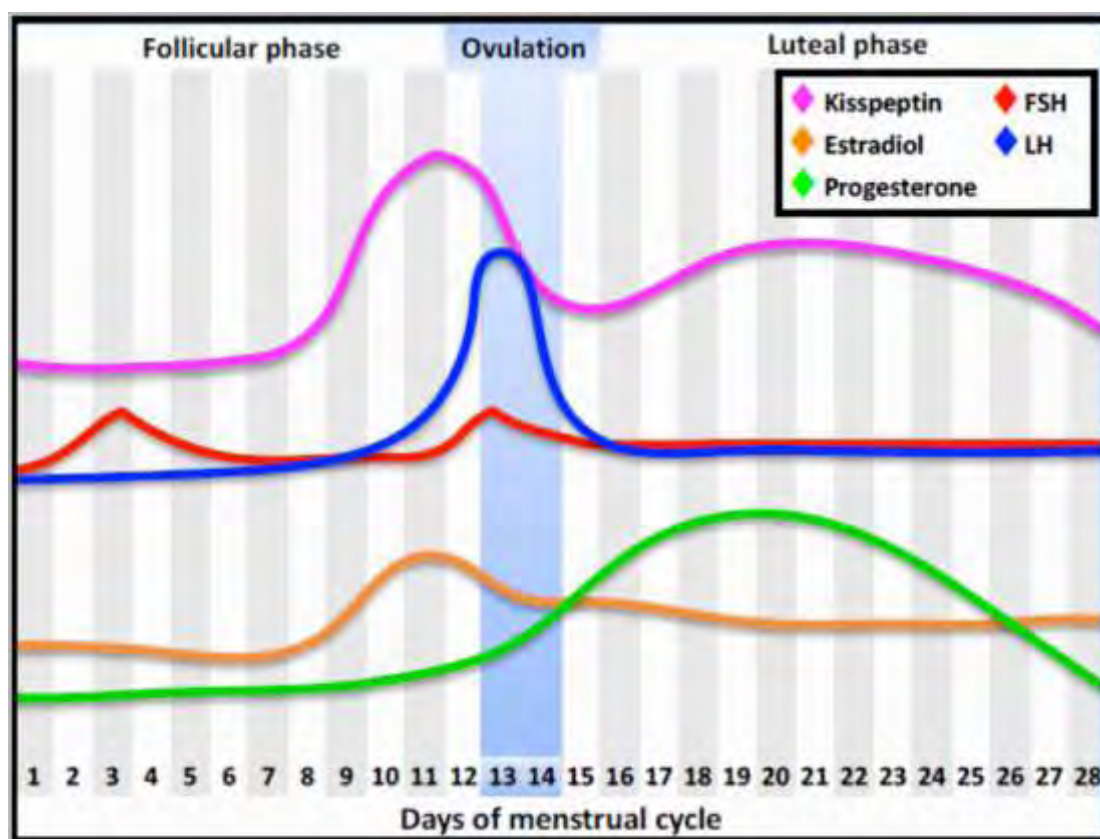
Η επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης κισπεπτίνης στην έκκριση της LH μεταβάλλεται ανάλογα με την φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου των γυναικών. Ειδικότερα, είναι πιο έκδηλη στην προωοθυλακιορρηκτική περίοδο και την ωχρινική φάση του κύκλου, σε αντίθεση με την ωοθυλακική φάση (71, 72), ενώ είναι σχεδόν μηδενική σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά δισκία (64, 73).

Επιπλέον, τα επίπεδα της κισπεπτίνης στον εμμηνορρυσιακό κύκλο αυξάνονται από την πρόιμη ωοθυλακική φάση μέχρι την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο και από την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο μέχρι την ωχρινική φάση και, πιθανότατα, λειτουργεί ως διεγερτικός παράγοντας στην εκδήλωση του κύματος της LH (60). Τέλος, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων επιπέδων της κισπεπτίνης και της ωοθυλακικής ωρίμανσης και, συγκεκριμένα, με την επιλογή του κυριαρχούντος ωοθυλακίου και την ωοθυλακιορρηξία (74). (Εικόνα 9)

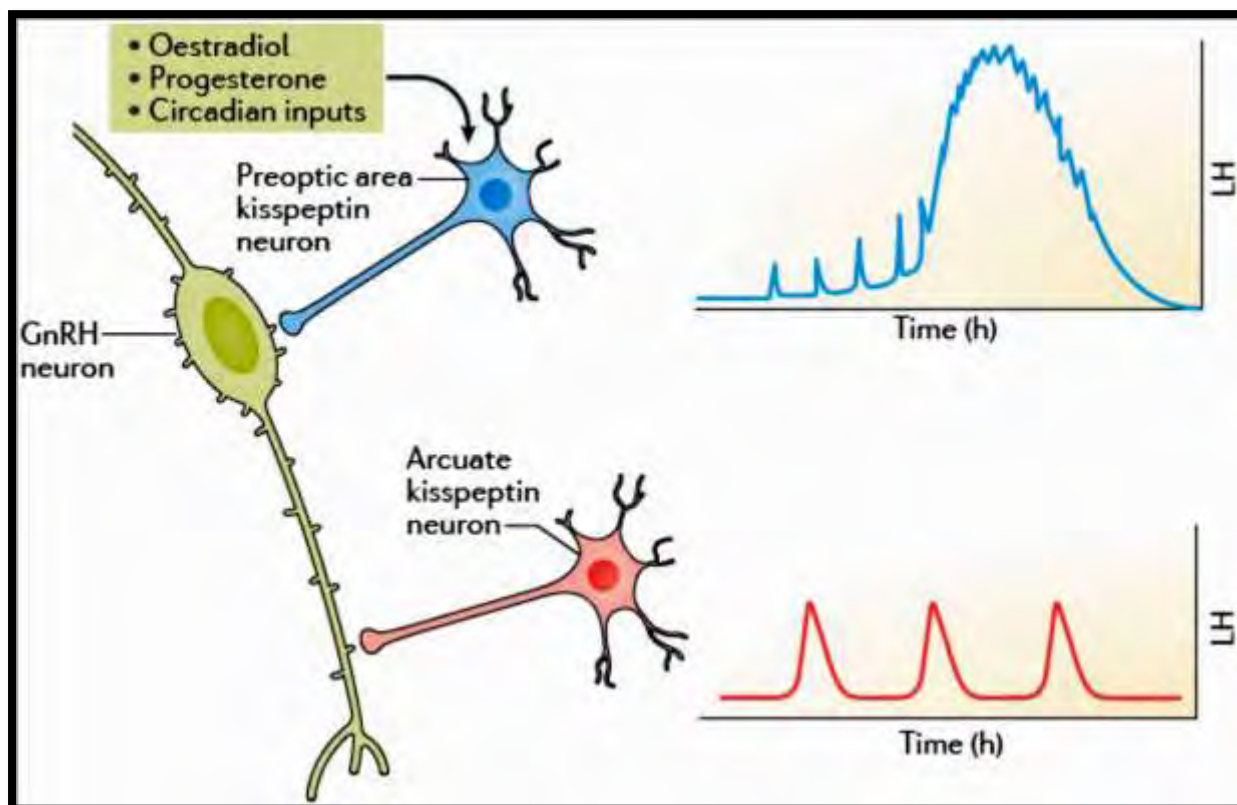
Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκκριση της GnRH, μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων ER-α, με μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Το παράδοξο της μη έκφρασης των ER-α υποδοχέων στους GnRH νευρώνες οδήγησε στη μελέτη άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως της κισπεπτίνης της οποίας οι νευρώνες τους εκφράζουν (63). Δεδομένα από εργασίες υποδεικνύουν ότι σύνδεση των οιστρογόνων στους νευρώνες της κισπεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης της κισπεπτίνης και, συνεπακόλουθα, τη μείωση της έκκρισης της GnRH (62-64).

Κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο, τα οιστρογόνα διεγείρουν την έκφραση της κισπεπτίνης στους νευρώνες στον προσθιοπλάγιο περικοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ενώ ταυτόχρονα την αναστέλλουν στον τοξοειδή πυρήνα (ARC) (62-64). Ο αποκλεισμός των ER-α υποδοχέων σε θηλυκά ποντίκια μειώνει την άμεση απόκριση των γοναδοτροφινών στην κισπεπτίνη και εμποδίζει την εκδήλωση του κύματος της LH (63, 64). Επιπροσθέτως, η προγεστερόνη μέσω του υποδοχέα της, κυρίως στους νευρώνες της κισπεπτίνης, δρα συνεργατικά με την οιστραδιόλη για την εκδήλωση του κύματος της LH (62, 65). Τέλος, οι στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την ανταπόκριση των GnRH νευρώνων στην κισπεπτίνη (64).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, αναπτύχθηκε η υπόθεση ότι οι νευρώνες της κισπεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα σχετίζονται με την αρνητική επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση της GnRH, ενώ στον προσθιοπλάγιο περικοιλιακό πυρήνα, που αντιστοιχεί στην προοπτική περιοχή (POA) στους ανθρώπους, προάγουν την θετική επίδραση αυτών. Η σημαντικότητα του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων, στα θηλυκά ποντίκια, για την εκδήλωση του κύματος της LH, το οποίο δεν συμβαίνει στα άρρενα, αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι οι νευρώνες της κισπεπτίνης στον προσθιοπλάγιο περικοιλιακό πυρήνα είναι πολύ περισσότεροι στα θηλυκά από ότι στα άρρενα ποντίκια (62). (Εικόνα 10)



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών των επιπέδων της κισπεπτίνης στον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο σε συνάρτηση με τις μεταβολές των FSH, LH, Οιστραδιόλης και Προγεστερόνης (60).



**Εικόνα 10.** Μοντέλο αλληλεπίδρασης των νευρώνων της κισπεπτίνης στην προοπτική περιοχή και στον τοξοειδή πυρήνα (Arcuate Nucleus), του υποθαλάμου με τους GnRH νευρώνες. Οι νευράξονες των νευρώνων της κισπεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα προεκβάλλουν στους νευράξονες των GnRH νευρώνων και συμμετέχουν στην κατά ώσεις έκκριση της LH. Οι νευράξονες των νευρώνων της κισπεπτίνης στην προοπτική περιοχή (POA) προεκβάλλουν στο κυτταρικό σώμα και στους εγγύς δενδρίτες των GnRH νευρώνων και, υπό την επίδραση των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης, προάγουν την εκκριτική αιχμή της LH (55).



### 3.5 Κλινική εφαρμογή της Κισπεπτίνης στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Όπως προαναφέρθηκε, η κισπεπτίνη διεγείρει την έκκριση της GnRH και ακολούθως των γοναδοτροφινών και, ιδίως, της LH, από δεδομένα, δε, προκύπτει ότι θα μπορούσε να προκαλέσει κύμα της LH με σκοπό την ωοθυλακιορρηξία (72). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση εάν η κισπεπτίνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την τελική ωρίμανση των ωαρίων σε πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης (75).

Δύο μόρια κισπεπτίνης έχουν μελετηθεί στους ανθρώπους, η Kr-10 και η Kr-54. Η μέγιστη συγκέντρωση της Kr-10 στον ορό μετά από άπαξ ενδοφλέβια ή υποδόρια έγχυση παρατηρείται στα 15 λεπτά, ανεξαρτήτως της οδού χορήγησης, ενώ της Kr-54 στα 15 λεπτά μετά από υποδόρια έγχυση και στα 40 λεπτά μετά από ενδοφλέβια έγχυση (60). Μετά από άπαξ ενδοφλέβια έγχυση ο χρόνος ημίσειας ζωής της Kr-10 είναι 4 λεπτά, ενώ της Kr-54 28 λεπτά (75), και είναι μη ανιχνεύσιμες μετά από 30 λεπτά και 3 ώρες, αντιστοίχως (60).

Το 2014 διεξήχθη η πρώτη εργασία, στην οποία δοκιμάστηκε η Kr-54 σε 53 γυναίκες για την τελική ωρίμανση των ωαρίων. Η Kr-54 χορηγήθηκε υποδορίως σε άπαξ δόσεις των 1,6 nmol/kg σε 2 γυναίκες, 3,2 nmol/kg σε 3 γυναίκες, 6,4 nmol/kg σε 24 γυναίκες και 12,8 nmol/kg σε 24 γυναίκες, 36 ώρες πριν την ωοληψία σε κύκλους θεραπείας IVF με rFSH/GnRH ανταγωνιστή (Ganirelix). Η μέγιστη συγκέντρωση της κισπεπτίνης παρατηρήθηκε 1 ώρα μετά την χορήγησή της, ενώ της LH μετά από 4 έως 6 ώρες. Από τις 53 γυναίκες, το 96% είχαν τουλάχιστον ένα ώριμο ωάριο και το 92% τουλάχιστον ένα έμβρυο για εμβρυομεταφορά. Ο αριθμός των ώριμων ωαρίων αυξανόταν με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, αν και το ποσοστό της τελικής ωρίμανσης ήταν ίδιο σε όλες τις δόσεις. Το ποσοστό γεννήσεων ανά πρωτόκολλο ήταν, σε όλες τις δόσεις, 19%, ενώ το ποσοστό βιοχημικών και κλινικών κηύσεων ήταν 40% και 23%, αντιστοίχως (76).

Το 2015 ακολούθησε μελέτη για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της Kr-54, σε κύκλους IVF, σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών (OHSS). Σε 60 γυναίκες, με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης OHSS (κριτήρια αποτελούσαν  $AMH \geq 40$  pmol/L και  $AFC \geq 23$ ), χορηγήθηκε Kr-54 υποδορίως, σε άπαξ δόσεις των 3,2 nmol/kg σε

5γυναίκες, 6,4 nmol/kg σε 20 γυναίκες, 9,6 nmol/kg σε 15γυναίκες και 12,8 nmol/kg σε 20 γυναίκες, για τελική ωρίμανση των ωαρίων, σε κύκλους IVF με rFSH/GnRH ανταγωνιστή. Ο αριθμός των ώριμων ωαρίων αυξανόταν και πάλι με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και ωρίμανση ωαρίων παρατηρήθηκε στο 95% των γυναικών. Τα υψηλότερα ποσοστά βιοχημικών και κλινικών κυήσεων και γεννήσεων παρατηρήθηκαν στην ομάδα των γυναικών που έλαβαν 9,6 nmol/kg Kr-54 (84,6%, 76,9% και 61,5%, αντιστοίχως). Μόνο τρεις γυναίκες (5%) εκδήλωσαν ήπιο OHSS και καμία μέτριο, σοβαρό ή κρίσιμο OHSS (77).

Τέλος, το 2017 εξετάστηκε το ενδεχόμενο, εάν παρατείνοντας το κύμα της LH με δεύτερη δόση κισπεπτίνης 10 ώρες μετά της πρώτης, θα μπορούσε να εξασφαλισθεί αποτελεσματική τελική ωρίμανση των ωαρίων. Σε 62 γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο OHSS (κριτήρια αποτελούσαν AMH  $\geq$  40 pmol/L και AFC  $\geq$  23), χορηγήθηκε Kr-54 στη δόση των 9,6 nmol/kg 36 ώρες πριν την ωοληψία. Σε 31 γυναίκες χορηγήθηκε δεύτερη δόση Kr-54, στη δοσολογία των 9,6 nmol/kg, 10 ώρες μετά την πρώτη, ενώ σε 31 γυναίκες χορηγήθηκε αλατούχο διάλυμα placebo (78).

Παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της αναλογίας ώριμων ωαρίων  $\geq$  60% (αναλογία ώριμων ωαρίων σε συνάρτηση με ωοθυλάκια με διάμετρο  $\geq$  14 mm στον τελευταίο υπέρηχο πριν την χορήγηση κισπεπτίνης), από ποσοστό 45% στις γυναίκες της ομάδας με τη μονή χορήγηση της Kr-54 σε ποσοστό 71% στις γυναίκες με τη διπλή χορήγηση της Kr-54. Επίσης, μια διττή απόκριση της LH παρατηρήθηκε στην δεύτερη δόση της κισπεπτίνης. Στις γυναίκες, στις οποίες παρατηρήθηκε μικρότερη απόκριση της LH στην πρώτη δόση της κισπεπτίνης, μετά την χορήγηση της δεύτερης δόσης η απόκριση της LH ήταν μεγαλύτερη, και αντιστρόφως. Το ποσοστό γεννήσεων στην ομάδα με την διπλή δόση της Kr-54 ήταν 39% και στην ομάδα με την μονή δόση 19,4%, ενώ μόνο μία ασθενής εκδήλωσε OHSS, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως μέτριο (78).

#### 4. ΣΥΝΟΨΗ ΤΩΝ ΥΦΙΣΤΑΜΕΝΩΝ ΓΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΗΣ GnRH

Η GnRH νευροορμόνη είναι ένα δεκαπεπτίδιο το οποίο εκκρίνεται από τον υποθάλαμο και συνδέεται στον GnRH υποδοχέα στην υπόφυση (79). Η σύνθεση και η έκκριση των γοναδοτροφινών, LH και FSH, από την υπόφυση, ρυθμίζεται από την GnRH και εξαρτάται από την φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου (80). Τροποποιώντας την αλληλουχία των αμινοξέων της GnRH στις θέσεις 6 και 10, δημιουργήθηκαν οι GnRH αγωνιστές, των οποίων η δράση είναι 50-200 φορές πιο ισχυρή από αυτή της GnRH στη διέγερση της έκκρισης των γοναδοτροφινών (79). Ωστόσο, συνεχής χορήγηση των αγωνιστών προκαλεί απευαισθητοποίηση της υπόφυσης και μείωση της έκκρισης της LH και της FSH, της οποίας προηγείται μια αρχική περίοδος διέγερσης αυτών (flare-up effect) (80). Εν συνεχεία, τροποποιήσεις στις θέσεις 1, 2, 3, 6, 8 και 10 της δομής της GnRH οδήγησε στη σύνθεση των GnRH ανταγωνιστών. Οι ανταγωνιστές δεσμεύονται στους υποδοχείς και προκαλούν άμεση καταστολή των γοναδοτροφινών με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, χωρίς να παρατηρείται το αρχικό 'flare-up' φαινόμενο (81).

Από το 2001 δύο GnRH ανταγωνιστές, ο Ganirelix και ο Cetrorelix, χρησιμοποιούνται στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, με σκοπό την αναστολή του πρώιμου κύματος της LH κατά τη διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών (82). Για τον στόχο αυτό, φαίνεται ότι η δοσολογία των 0,25mg του Ganirelix σε κύκλους IVF είναι επαρκής με ιδανικά κλινικά αποτελέσματα (43). Σε αρκετές μελέτες, όμως, πρώιμες αιχμές της LH έχουν παρατηρηθεί σε κύκλους με GnRH ανταγωνιστές (50, 51, 83), γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την αποτυχία του Ganirelix να αναστείλει τη θετική επίδραση των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων σε φυσιολογικές γυναίκες (52).

Επιπροσθέτως, αν και οι συγκεντρώσεις των LH, FSH και οιστραδιόλης μειώθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη χορήγηση 0,25mg Ganirelix, επανήλθαν στα προ-χορήγησης επίπεδα στις 24 ώρες (41, 42). Επομένως, είναι πιθανόν, η καθημερινή δόση των 0,25mg να μην είναι κατάλληλη ώστε να αναστείλει την πρώιμη ευαισθητοποίηση της υπόφυσης στα οιστρογόνα σε κύκλους IVF. Ωστόσο, παρά τις παρατηρήσεις αυτές, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα κλινικά αποτελέσματα μεταξύ των κύκλων IVF με

αγωνιστές και ανταγωνιστές (49, 84), γεγονός το οποίο αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των πρώιμων αιχμών της LH.

Αν και αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη δράση των GnRH ανταγωνιστών στην έκκριση των γοναδοτροφινών, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα για την επίδραση του Ganirelix στην ωοθυλακική ωρίμανση, ενώ και για τον Cetorelix τα δεδομένα είναι ελάχιστα. Συγκεκριμένα, όταν η μία δόση των 3mg ή 5mg του Cetorelix χορηγήθηκε σε γυναίκες την ημέρα, κατά την οποία το ωοθυλάκιο είχε διάμετρο 16 mm, δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω ωοθυλακική ανάπτυξη τις επόμενες 48 ώρες (43). Επίσης, καθημερινή χορήγηση του Cetorelix στη δόση των 3mg, από την 8η ημέρα του κύκλου για 7 ημέρες, οδήγησε σε καθυστέρηση της ωοθυλακιορρηξίας (37), ενώ όταν χορηγήθηκε, στη δόση των 0,25mg, καθημερινώς από την 3η μέχρι της 16η ημέρα του κύκλου, ανέστειλε την ωοθυλακιορρηξία για 5 ημέρες (41). Ωστόσο, σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν παρουσιάζονται υπερηχογραφικά δεδομένα για την ωοθυλακική ωρίμανση και δεν συμπεριλήφθηκαν για σύγκριση οι ομάδες που δεν έλαβαν τον ανταγωνιστή.

Παρόλο που η διερεύνηση της δράσης του ανταγωνιστή στην ωοθυλακική ωρίμανση είναι πιθανόν δύσκολη σε κύκλους διέγερσης των ωοθηκών, λόγω της εξωγενώς χορηγούμενης FSH, αυτή μπορεί να είναι εφικτή σε φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους, γεγονός που μπορεί να προσφέρει νέες πληροφορίες αναφορικά με τη δράση των GnRH ανταγωνιστών στον άξονα υπόφυση-ωοθήκη και στην ωοθυλακική ωρίμανση.

Είναι γνωστό ότι η έκκριση της GnRH και των γοναδοτροφινών επηρεάζεται κεντρικά από διάφορες τοπικά παραγόμενες ουσίες. Μια τέτοια ουσία είναι η κισπεπτίνη (62, 63), η οποία απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1996 από τα κύτταρα του μελανώματος. Ο κύριος ρόλος της ήταν η καταστολή της μετάστασης του καρκίνου (68). Το 2003 δύο μελέτες συσχέτισαν την κισπεπτίνη με το αναπαραγωγικό σύστημα (57, 58, 60), καθώς σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα της κισπεπτίνης GPR54 (KISS 1 R), που τον καθιστούσε μη ενεργό.

Η κισπεπτίνη δρα μέσω διέγερσης της έκκρισης της GnRH (66). Από δεδομένα, δε, προκύπτει ότι θα μπορούσε να προκαλέσει κύμα της LH με σκοπό την ωοθυλακιορρηξία (72). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης, με rFSH/GnRH ανταγωνιστή (Ganirelix)

πρωτόκολλα, για την τελική ωρίμανση των ωαρίων, με αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα (75-78).

Κατά την προωθυλακιωρηκτική περίοδο, τα οιστρογόνα διεγείρουν την έκφραση της κισπεπτίνης στους νευρώνες στον προσθιοπλάγιο περικοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ενώ ταυτόχρονα την αναστέλλουν στον τοξοειδή πυρήνα (62-64). Επιπροσθέτως, η προγεστερόνη μέσω του υποδοχέα της, κυρίως στους νευρώνες της κισπεπτίνης, δρα συνεργατικά με την οιστραδιόλη για την εκδήλωση του κύματος της LH (62, 65). Τέλος, οι στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την ανταπόκριση των GnRH νευρώνων στην κισπεπτίνη (64). Με βάση τα παραπάνω, αναπτύχθηκε η υπόθεση ότι οι νευρώνες της κισπεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα προάγουν την αρνητική επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση της GnRH, ενώ, στην προοπτική περιοχή, προάγουν τη θετική επίδραση (55, 62). Εάν η δράση ενός GnRH ανταγωνιστή στην έκκριση των γοναδοτροφινών επηρεάζεται από την κισπεπτίνη δεν είναι γνωστό.

## **5. ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΖΟΥΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ**

**5.1.** Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση ενός GnRH ανταγωνιστή στην έκκριση των γοναδοτροφινών ορμονών στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου είναι περιορισμένα. Συνεπώς, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

**5.2.** Δεν είναι γνωστό κατά πόσον οι GnRH ανταγωνιστές μπορούν να επηρεάσουν την ωοθυλακική ωρίμανση στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο.

**5.3.** Δεν είναι γνωστό εάν στη δράση του GnRH ανταγωνιστή στην έκκριση των γοναδοτροφινών υπεισέρχονται υποθαλαμικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να μετρηθούν στην περιφερική κυκλοφορία, όπως η κισπεπτίνη.

### **III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετήσει την επίδραση του GnRH ανταγωνιστή, Ganirelix, αφενός στην έκκριση των υποφυσιακών γοναδοτροφινών και αφετέρου στην ωοθυλακική ωρίμανση σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Επιπλέον, στην προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης του ανταγωνιστή, να συσχετίσει τις συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο με εκείνες των γοναδοτροφινών και των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης.

Συγκεκριμένα, η εργασία αυτή είχε ως σκοπό να εξετάσει για πρώτη φορά τα εξής:

**1.** Πώς μεταβάλλεται η στάθμη της FSH, της LH, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης σε φυσιολογικές γυναίκες, στις οποίες ο Ganirelix χορηγήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης.

**2.** Πώς μεταβάλλεται το μέγεθος του ωοθυλακίου και ο ρυθμός αύξησης του σε φυσιολογικές γυναίκες, στις οποίες ο Ganirelix χορηγήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης.

**3.** Πώς μεταβάλλεται η στάθμη της κισπεπτίνης στο αίμα στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου σε φυσιολογικές γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε ο Ganirelix.



## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία περιλήφθηκαν 10 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, 20 – 35 ετών, με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο διάρκειας 24 - 35 ημερών, οι οποίες δεν επιθυμούσαν εγκυμοσύνη. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από το Επιστημονική Συμβούλιο του Νοσοκομείου και όλες οι γυναίκες συμμετείχαν εθελοντικά και κατόπιν έγγραφης συναίνεσης. Οι γυναίκες ήταν υγιείς, δεν είχαν λάβει καμία φαρμακευτική ορμονική θεραπεία τουλάχιστον 6 μήνες πριν από την είσοδό τους στη μελέτη και είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος. Όλες οι γυναίκες μελετήθηκαν σε δύο γεννητικούς κύκλους, ειδικότερα κύκλος 1 (φυσιολογικός γεννητικός κύκλος) και κύκλος 2 (χορήγηση Ganirelix). Τα χαρακτηριστικά των γυναικών απεικονίζονται στον Πίνακα 3.

<b>Πίνακας 3.</b> Κλινικά χαρακτηριστικά και ορμονολογικό προφίλ των γυναικών την 2 <sup>η</sup> ημέρα του κύκλου 1 (μέση τιμή $\pm$ SEM).	
Αριθμός γυναικών	10
Ηλικία (έτη)	26,2 $\pm$ 4,0
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m <sup>2</sup> )	19,8 $\pm$ 2,0
Διάρκεια γεννητικού κύκλου (ημέρες)	29,3 $\pm$ 0,58
FSH (mIU/ml)	6,08 $\pm$ 0,67
LH (mIU/ml)	6,04 $\pm$ 0,62
Οιστραδιόλη (pg/ml)	70,5 $\pm$ 11,51
Προγεστερόνη (ng/ml)	0,72 $\pm$ 0,11

### **Κύκλος 1 (Φυσιολογικός γεννητικός κύκλος)**

Κατά την διάρκεια του κύκλου 1 ελήφθησαν δείγματα αίματος από όλες τις γυναίκες καθημερινά (9:00 πμ), από την 2<sup>η</sup> ημέρα έως την ημέρα που διαπιστώθηκε υπερηχογραφικά ωοθυλακιορρηξία. Διακολπικός υπερηχογραφικός έλεγχος διενεργήθηκε για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων την 8<sup>η</sup> και την 10<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου των γυναικών και, εν συνέχεια, καθημερινώς μέχρι την διαπίστωση της ωοθυλακιορρηξίας. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν δύο διάμετροι του ωοθυλακίου και υπολογίστηκε η μέση τιμή σε mm. Ένα επιπλέον δείγμα αίματος ελήφθη μία εβδομάδα μετά την έναρξη του ενδογενούς κύματος της LH. Ως έναρξη του κύματος της LH ορίστηκε η πρώτη τιμή της LH, η οποία είναι μεγαλύτερη από το 180% της μέσης τιμής των τεσσάρων προηγούμενων μετρήσεων (Messinis et al 1985).

### **Κύκλος 2 (Χορήγηση Ganirelix)**

Κατά την διάρκεια του κύκλου 2, χορηγήθηκε σε όλες τις γυναίκες υποδορίως ο GnRH ανταγωνιστής Ganirelix (Orgalutran προγεμισμένες σύριγγες 0,25mg/0,5ml, ενέσιμο διάλυμα, MSD, Αθήνα, Ελλάδα), στη δόση των 0,25 mg/ημέρα καθημερινά, από την 2<sup>η</sup> μέχρι την ημέρα της έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1. Δείγματα αίματος στον κύκλο 2 ελήφθησαν καθημερινά (9:00 πμ), από τη 2<sup>η</sup> ημέρα μέχρι την ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. Εάν εκείνη την ημέρα, κατά το διακολπικό υπερηχογραφικό έλεγχο, υπήρχε ανάπτυξη ωοθυλακίων με μέση διάμετρο τουλάχιστον 14 mm, η καθημερινή λήψη των δειγμάτων αίματος συνεχιζόταν, όπως στον κύκλο 1, μέχρι την ωοθυλακιορρηξία. Σε διαφορετική περίπτωση οι αιμοληψίες συνεχιζόνταν εβδομαδιαίως μέχρι την επόμενη έμμηνο ρύση. Επιπροσθέτως, διενεργήθηκε διακολπικός υπερηχογραφικός έλεγχος για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των ωοθυλακίων την 8<sup>η</sup> και την 10<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου των γυναικών και, εν συνέχεια, καθημερινώς μέχρι την ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή.

Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν και φυλάχθηκαν ο ορός και το πλάσμα χωριστά στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , έως ότου γίνει η μέτρηση των ορμονών FSH, LH, οιστραδιόλης, προγεστερόνης και κισπεπτίνης σε αυτά. Μία μικρή ποσότητα του ορού χρησιμοποιήθηκε για την καθημερινή μέτρηση της LH, από την ημέρα που το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είχε διάμετρο 15-16 mm, προκειμένου να ανιχνευτεί η έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1.

### **Μέτρηση ορμονών και ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου**

Συνολικά, από τις γυναίκες ελήφθησαν 361 δείγματα αίματος. Οι ορμόνες FSH και LH μετρήθηκαν στον ορό του αίματος. Η μέτρηση έγινε με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (IRMA, διαγνωστικά kits IM2125 και IM1381, αντίστοιχα, Immunotech as a Beckman Coulter Company, Prague, Czech Republic). Τα αποτελέσματά τους εκφράζονται ως mIU/ml. Η μέτρηση των ορμονών οιστραδιόλη και η προγεστερόνη στον ορό του αίματος πραγματοποιήθηκε με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA διαγνωστικά kits A21854 και IM1188, αντίστοιχα, Immunotech as a Beckman Coulter Company, Prague, Czech Republic). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg/ml για την οιστραδιόλη και ως ng/ml για την προγεστερόνη. Η κισπεπτίνη μετρήθηκε στο πλάσμα του αίματος με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA, διαγνωστικό kit για Kisspeptin 1, KISS1, SEC559Hu, Cloud-Clone Corp. Wuhan, China). Τα αποτελέσματά της εκφράζονται ως pg/ml. Τα κατώτερα όρια μέτρησης για τις FSH, LH, οιστραδιόλη, προγεστερόνη και κισπεπτίνη ήταν 0,17 mIU/ml, 0,16 mIU/ml, 9,58 pg/ml, 0,03 ng/ml και 13,1 pg/ml, αντίστοιχα. Η διακύμανση μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων και μέσα στην ίδια μέτρηση ήταν 8,2% και 4,05%, 8,42% και 7,33%, 14,5% και 14,4%, 8,66% and 8,15% και 12% και 10%, αντίστοιχα. Το μέγεθος των ωοθυλακίων μετρήθηκε μέσω διακολλικού υπερηχογραφήματος και υπολογίστηκε ως η μέση τιμή δύο διαμέτρων σε mm.

### 3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές (mean) και το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών (Standard Error of the Mean=SEM), ενώ για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες. Για τη σύγκριση των ορμονών μεταξύ των δύο κύκλων σε συγκεκριμένες ημέρες χρησιμοποιήθηκε το paired t-test. Μέσω της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (ANOVA) ελέγχθηκαν οι διαφορές στη χρονική μεταβολή των ορμονών. Επίσης, με την ανωτέρω μέθοδο εκτιμήθηκε εάν ο βαθμός μεταβολής στο χρόνο των υπό μελέτη παραμέτρων ήταν διαφορετικός μεταξύ των δύο κύκλων. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (r) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η συσχέτιση της κισπεπτίνης με τις άλλες ορμόνες. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ημέρα έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1 ορίστηκε ως σημείο αναφοράς (ημέρα 0). Η ημέρα αυτή είναι η αντίστοιχη ημέρα της τελευταίας δόσης του Ganirelix στον κύκλο 2. Δύο από τις 10 γυναίκες εξαιρέθηκαν από την στατιστική ανάλυση για διαφορετικούς λόγους. Στην πρώτη γυναίκα δεν παρατηρήθηκε ωοθυλακική ανάπτυξη σε κανέναν από τους δύο κύκλους, ενώ στη δεύτερη γυναίκα διαπιστώθηκε ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου και ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους.

#### **Μελέτη της επίδρασης του ανταγωνιστή στις FSH, LH, οιστραδιόλη προγεστερόνη και στην ωοθυλακική ανάπτυξη**

Για τη μελέτη της επίδρασης του GnRH ανταγωνιστή στις γοναδοτροφίνες, FSH και LH, στις στεροειδείς ορμόνες, οιστραδιόλη και προγεστερόνη, και στην ωοθυλακική ωρίμανση χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των παραπάνω ορμονών και τα υπερηχογραφικά δεδομένα των γυναικών και στους δύο κύκλους, δηλαδή κύκλος 1 (φυσιολογικός γεννητικός κύκλος) και κύκλος 2 (χορήγηση Ganirelix). Το ορμονικό προφίλ των γυναικών και στους δύο κύκλους απεικονίζεται στους Πίνακες 4 και 5.

**Πίνακας 4.** Ορμονικό προφίλ των γυναικών (FSH και LH) και στους δύο κύκλους (μέση τιμή  $\pm$  SEM) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή.

FSH (mIU/ml)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
2	5,60	0,76	5,30	0,48
3	5,79	0,61	4,63	0,45
4	5,63	0,44	5,80	0,61
5	5,44	0,48	6,28	0,74
6	5,39	0,34	6,16	0,76
7	6,05	0,5	6,14	0,86
8	5,21	0,43	6,35	0,73
9	5,59	0,39	5,81	0,7
10	5,41	0,62	5,45	0,69
-4	4,43	0,4	6,09	0,58
-3	4,26	0,45	7,09	0,99
-2	3,98	0,48	6,65	0,62
-1	3,79	0,59	6,04	0,54
0	6,60	1,08	6,25	0,6
+1	10,00	1,88	8,20	2,1
+2	7,20	2,57	8,00	-

LH (mIU/ml)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
2	6,23	0,72	5,38	0,69
3	6,09	0,91	3,84	0,55
4	5,58	0,72	3,70	0,6
5	6,10	1,03	3,84	0,85
6	5,91	1,32	5,35	1,08
7	7,25	0,95	3,49	0,65
8	8,39	1,42	5,09	0,92
9	8,31	1,26	4,65	0,83
10	8,16	1,24	5,01	0,82
-4	8,33	1,34	5,35	0,98
-3	7,94	0,83	6,60	0,91
-2	9,36	1,13	6,50	0,7
-1	10,56	0,76	6,05	1,01
0	45,54	10,82	6,70	1,11
+1	55,81	8,08	7,85	1,04
+2	29,42	9,45	5,70	-

**Πίνακας 5.** Ορμονικό προφίλ των γυναικών (E2 και P4) και στους δύο κύκλους (μέση τιμή ± SEM) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. E2=Οιστραδιόλη, P4=Προγεστερόνη.

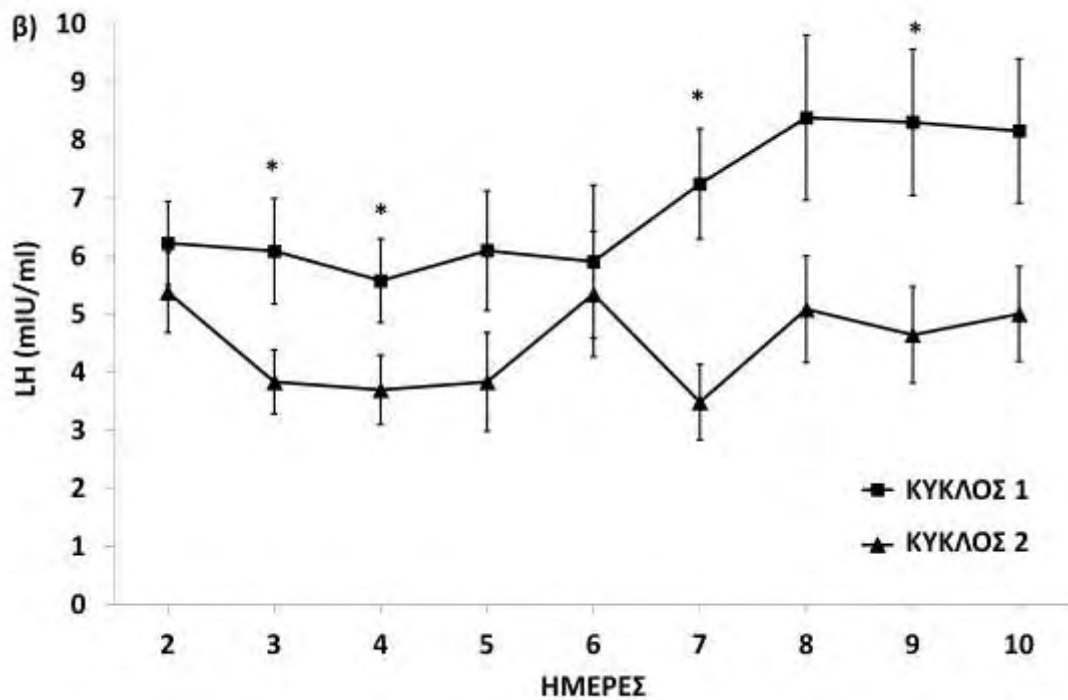
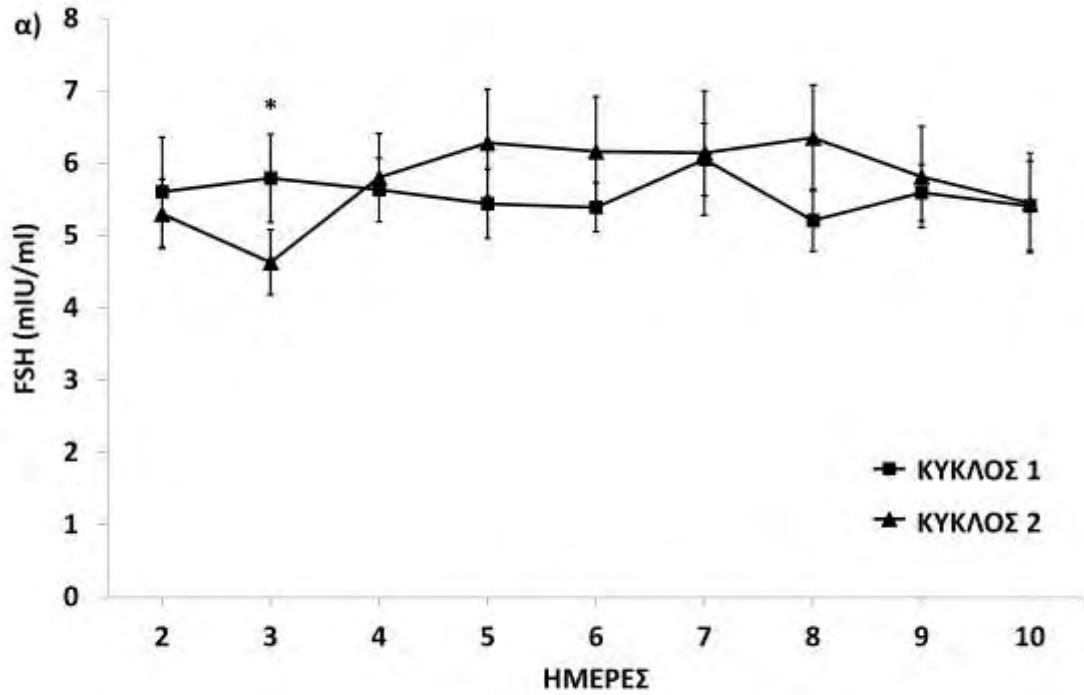
E2 (pg/ml)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
2	72,99	14,08	76,68	18,49
3	71,70	14,62	65,71	13,09
4	73,55	14,57	69,45	14
5	73,23	15,86	68,56	18,14
6	74,40	17,26	59,38	12,4
7	85,88	18,15	69,10	16,5
8	75,15	13,08	79,70	13,73
9	99,01	16	78,24	12,22
10	118,98	22,44	73,30	13,55
-4	99,20	17,3	86,53	14,55
-3	137,09	25,08	78,13	16,53
-2	174,33	25,57	81,30	13,05
-1	234,06	29,35	75,96	12,55
0	332,91	63,4	62,48	12,93
+1	252,43	46,82	75,15	0,04
+2	145,50	34,01	76,00	-

P4 (ng/ml)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
2	0,73	0,13	0,69	0,1
3	1,15	0,48	0,68	0,11
4	1,03	0,47	0,50	0,07
5	0,98	0,43	0,61	0,12
6	0,80	0,39	0,46	0,08
7	0,93	0,48	0,46	0,07
8	0,89	0,38	0,49	0,08
9	0,86	0,39	0,49	0,05
10	0,53	0,07	0,50	0,11
-4	0,98	0,47	0,58	0,06
-3	0,89	0,38	0,59	0,11
-2	0,91	0,38	0,50	0,06
-1	0,53	0,06	0,49	0,1
0	0,66	0,06	0,46	0,02
+1	1,14	0,12	0,50	0,09
+2	1,46	0,21	0,30	-

Στο Σχήμα 1 φαίνονται τα επίπεδα των FSH και LH από τη 2<sup>η</sup> έως και τη 10<sup>η</sup> ημέρα των κύκλων. Η συγκέντρωση της FSH τη 2<sup>η</sup> ημέρα (πριν την έναρξη των παρεμβάσεων) ήταν παρόμοια και στους δύο κύκλους. Εν συνεχεία, από τη 2<sup>η</sup> ημέρα έως και την 10<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδά της δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων, εκτός από την 3<sup>η</sup> ημέρα (χαμηλότερη στον κύκλο 2,  $P=0,025$ ). Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της FSH από την 2<sup>η</sup> ημέρα έως και την 10<sup>η</sup> ημέρα ήταν παρόμοιος μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,491$ ), δηλαδή δεν βρέθηκαν σημαντικές μεταβολές των επιπέδων της FSH ούτε στον κύκλο 1 ( $P=0,981$ ) ούτε στον κύκλο 2 ( $P=0,346$ ). Τα επίπεδα της LH στον κύκλο 2 ήταν σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τον κύκλο 1 στις ημέρες 3 και 4 ( $P<0,05$ ) και στις ημέρες 7 και 9 ( $P<0,01$ ). Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της LH από την 2<sup>η</sup> έως και την 10<sup>η</sup> ημέρα δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,096$ ). Ωστόσο, ενώ στον κύκλο 1 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της LH από την 2<sup>η</sup> έως και την 9<sup>η</sup> ημέρα ( $P=0,05$ ), στον κύκλο 2 δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή αυτών ( $P=0,697$ ).

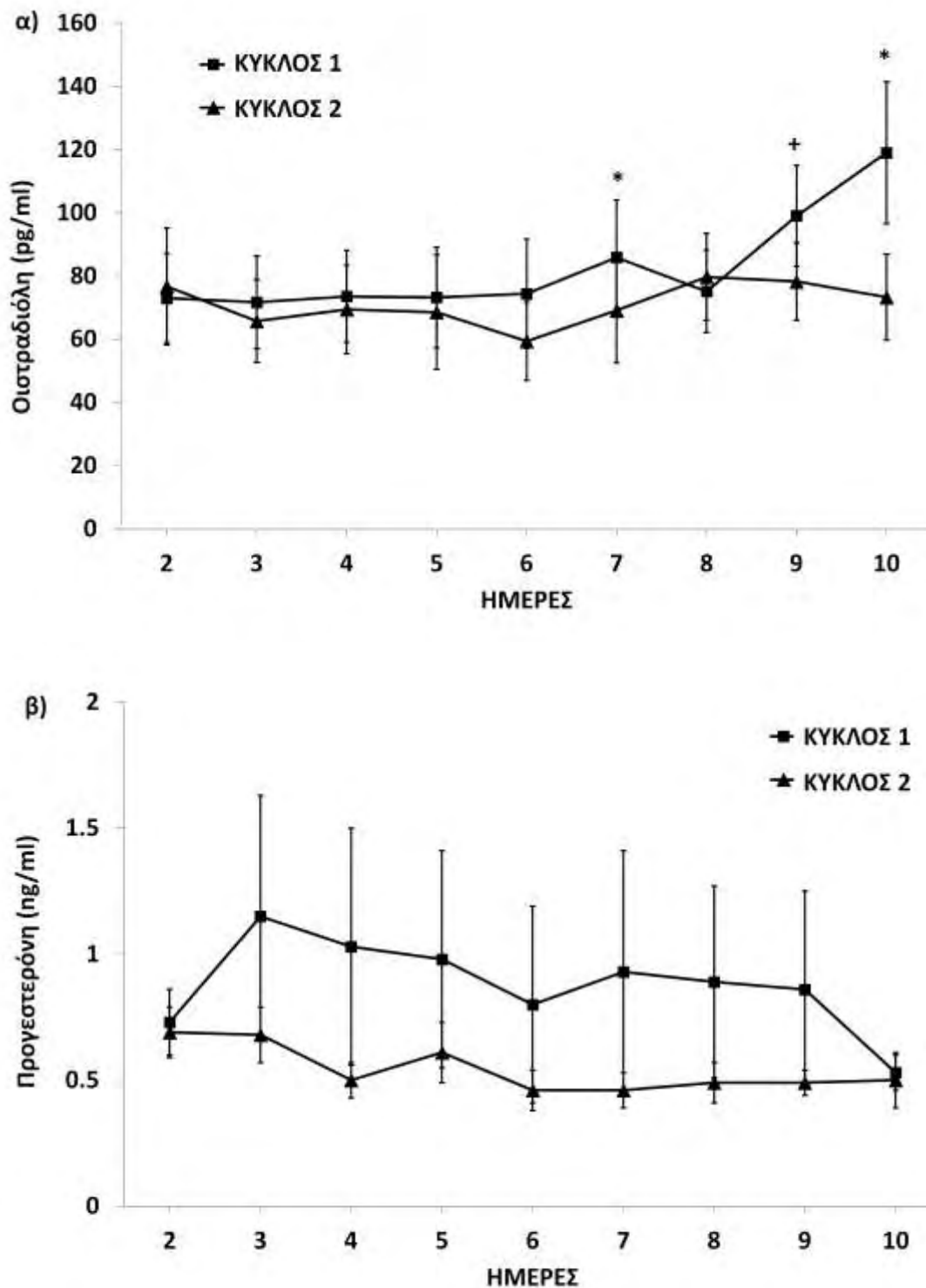


**Σχήμα 1.** Σχηματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων των (α) FSH και (β) LH (μέση τιμή ± SEM) των γυναικών στον κύκλο 1 (■) και στον κύκλο 2 (▲), από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10. \*P<0,05, σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2. +P<0,05, σημαντική διαφορά στη μεταβολή της τιμής, από την αμέσως προηγούμενη, στον κύκλο 1.



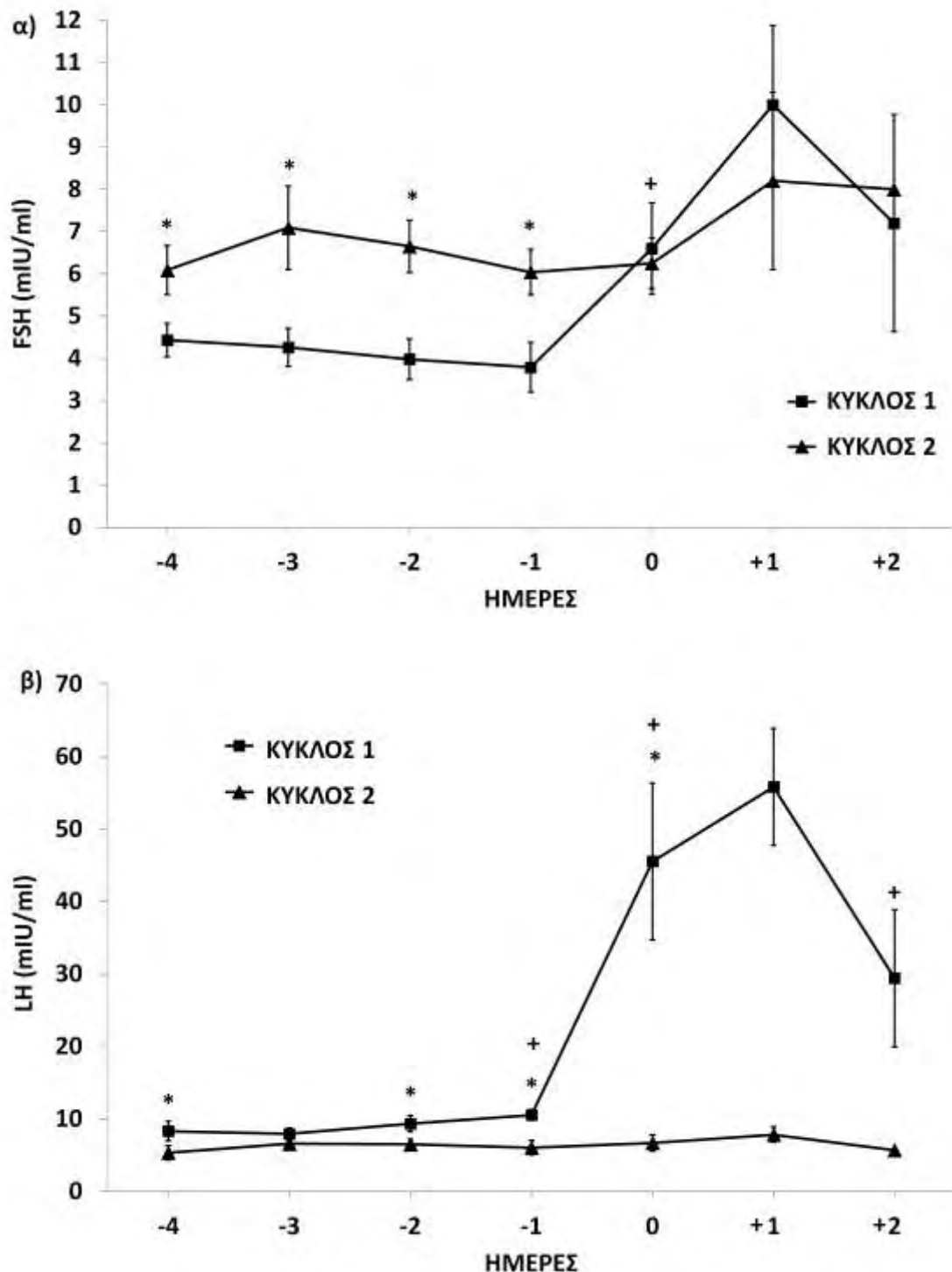
Στο Σχήμα 2 φαίνονται τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης από τη 2<sup>η</sup> έως και τη 10<sup>η</sup> ημέρα των κύκλων. Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους εκτός των ημερών 7 (P=0,027) και 10 (P=0,043), στις οποίες ήταν σημαντικά χαμηλότερες στον κύκλο 2. Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της οιστραδιόλης διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων (P=0,041). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά στον κύκλο 1 (P=0,010), αλλά δεν παρατηρήθηκε μεταβολή αυτών στον κύκλο 2 (P=0,831). Οι τιμές της προγεστερόνης δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά και ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους τις ημέρες 2 έως 10, Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της ήταν παρόμοιος και στους δύο κύκλους (P=0,134 και P=0,158, αντίστοιχα).

**Σχήμα 2.** Σχηματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων των (α) οιστραδιόλης και (β) προγεστερόνης (μέση τιμή ± SEM) των γυναικών στον κύκλο 1 (■) και στον κύκλο 2 (▲), από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10. \*P<0,05, σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2. +P<0,05, σημαντική διαφορά στη μεταβολή της τιμής, από την αμέσως προηγούμενη, στον κύκλο 1.



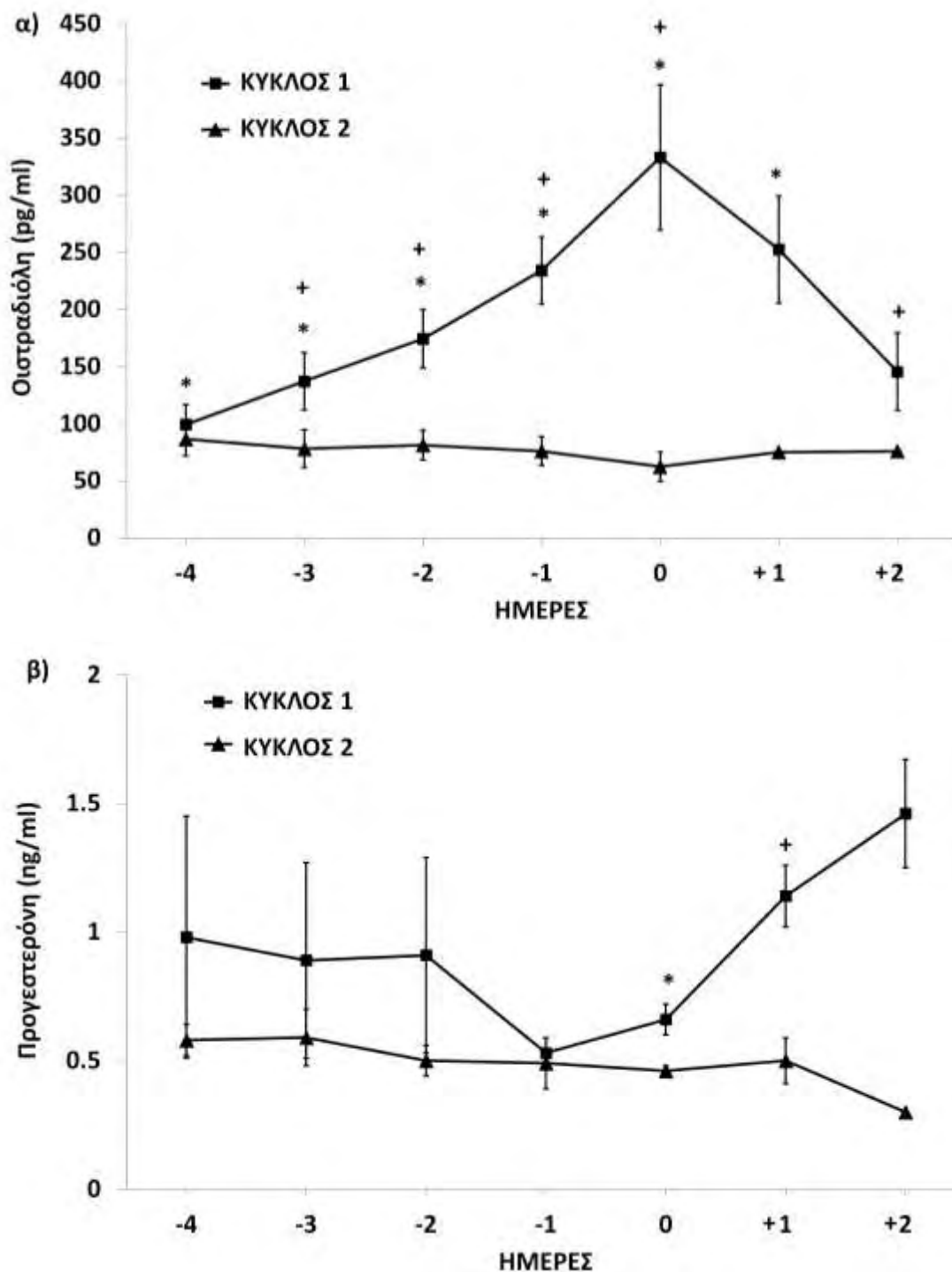
Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των FSH και LH με σημείο αναφοράς την ημέρα της έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1 (ημέρα 0). Η αντίστοιχη ημέρα στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. Οι συγκεντρώσεις της FSH ήταν σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο 2 τις ημέρες -4, -3, -2 και -1 συγκριτικά με τις αντίστοιχες ημέρες στον κύκλο 1. Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της FSH από την ημέρα -4 μέχρι την ημέρα αναφοράς 0 δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,60$ ). Ειδικότερα, βρέθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της FSH στον κύκλο 1 ( $P=0,008$ ), ενώ στον 2<sup>ο</sup> κύκλο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές ( $P=0,819$ ). Οι συγκεντρώσεις της LH τις ημέρες -4, -2, -1 και 0 ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες στον κύκλο 2 συγκριτικά με τις αντίστοιχες μέρες στον κύκλο 1. Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της LH από την ημέρα -4 έως την ημέρα αναφοράς 0 διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,006$ ). Συγκεκριμένα, υπήρξε αύξηση των επιπέδων της LH στον κύκλο 1 ( $P<0,001$ ) και καμία μεταβολή αυτών στον κύκλο 2 ( $P=0,865$ ).

**Σχήμα 3.** Σχηματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων (α) FSH και (β) LH (μέση τιμή  $\pm$  SEM) των γυναικών στον κύκλο 1 (κύκλος 1,  $\blacksquare$ ) και στον κύκλο 2 (κύκλος 2,  $\blacktriangle$ ) τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. \* $P < 0,05$ , σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2. + $P < 0,05$ , σημαντική διαφορά στη μεταβολή της τιμής, από την αμέσως προηγούμενη, στον κύκλο 1.



Στο Σχήμα 4 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης με σημείο αναφοράς την ημέρα της έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1 (ημέρα 0). Η αντίστοιχη ημέρα στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης τις ημέρες -4, -3, -2, -1 και την ημέρα 0 ήταν σημαντικά χαμηλότερες στον κύκλο 2 συγκριτικά με τις αντίστοιχες ημέρες στον κύκλο 1 ( $P < 0,05$ ). Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της οιστραδιόλης από την ημέρα -4 έως την ημέρα 0 διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P < 0,001$ ). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης στον κύκλο 1 ( $P < 0,001$ ), σε αντίθεση με τον κύκλο 2 στον οποίο δεν σημειώθηκε σημαντική μεταβολή ( $P = 0,483$ ). Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στην ημέρα 0 ήταν σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο 1 από ότι στον κύκλο 2 ( $P = 0,005$ ). Ωστόσο, στον κύκλο 1 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης από την ημέρα 0 στην ημέρα 1 και στην ημέρα 2 ( $P = 0,009$ ). Το ενδογενές κύμα της LH ξεκίνησε στον κύκλο 1 κατά μέσο όρο την ημέρα 15 ( $15,6 \pm 1,03$ ).

**Σχήμα 4.** Σχηματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων (α) οιστραδιόλης και (β) προγεστερόνης (μέση τιμή ± SEM) των γυναικών στον κύκλο 1 (κύκλος 1, ■) και στον κύκλο 2 (κύκλος 2, ▲) τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. \*P<0,05, σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2. +P<0,05, σημαντική διαφορά στη μεταβολή της τιμής, από την αμέσως προηγούμενη, στον κύκλο 1.



Στο Σχήμα 5 απεικονίζονται οι τιμές του μεγέθους του ωοθυλακίου την 8<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα και για την χρονική περίοδο από την τέταρτη ημέρα πριν την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1 έως και δύο μέρες μετά, και στους δύο κύκλους. Το μέγεθος του ωοθυλακίου την ημέρα 8 ήταν παρόμοιο και στους δύο κύκλους. Ο βαθμός μεταβολής στις τιμές του μεγέθους του ωοθυλακίου από την 8<sup>η</sup> έως την 10<sup>η</sup> ημέρα έτεινε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,057$ ). Ειδικότερα, στον κύκλο 1 σημειώθηκε σημαντική αύξηση του μεγέθους του ( $P=0,003$ ), ενώ στον κύκλο 2 δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή ( $P=0,544$ ). Επιπροσθέτως, η ανάπτυξη του ωοθυλακίου από την -4 ημέρα έως την ημέρα αναφοράς 0 διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P<0,001$ ). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου ( $P<0,001$ ), ενώ στον κύκλο 2 δεν υπήρξε καμία μεταβολή του μεγέθους του ωοθυλακίου μέχρι την ημέρα 1 ( $P=0,195$ ).

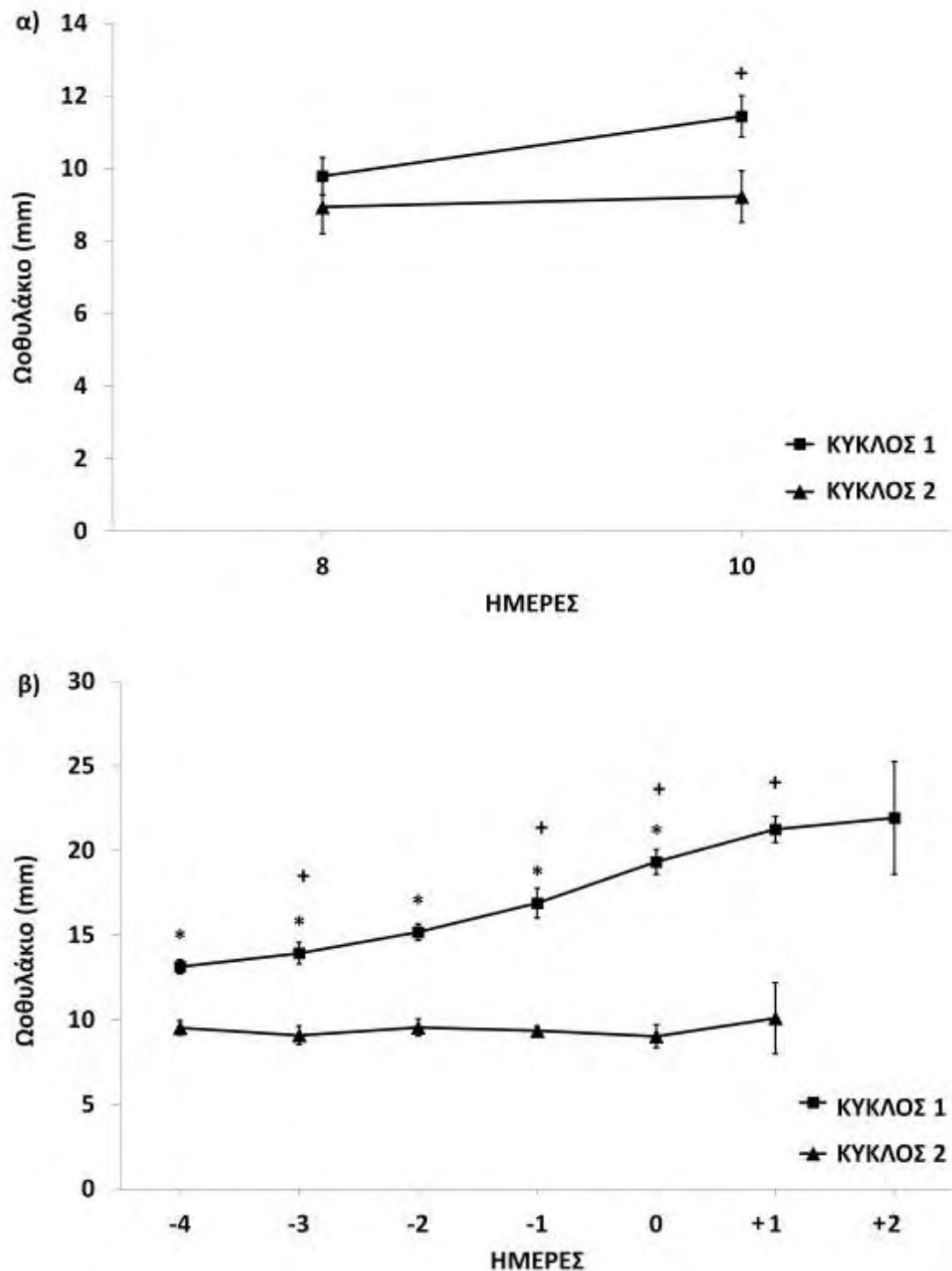
Στον κύκλο 1 η ωοθυλακιόρρηξια διαπιστώθηκε υπερηχογραφικά και επιβεβαιώθηκε από την τιμή της προγεστερόνης στον ορό αίματος, το οποίο λήφθηκε μία εβδομάδα μετά την έναρξη του κύματος της LH ( $14,2 \pm 1,33$  ng/ml). Στον κύκλο 2 το κύμα της LH διαπιστώθηκε σε 6 γυναίκες μία εβδομάδα μετά από την τελευταία δόση του Ganirelix και σε 2 γυναίκες σε δύο εβδομάδες (LH:  $18,9 \pm 2,14$  mIU/ml, οιστραδιόλη:  $184,8 \pm 29,2$  pg/ml). Μία εβδομάδα μετά την, κατά των ανωτέρω, εμφάνιση του κύματος της LH, οι τιμές της προγεστερόνης επιβεβαίωσαν την ωοθυλακιόρρηξια ( $10,9 \pm 1,3$  ng/ml). Στον Πίνακα 6 περιλαμβάνονται οι μετρήσεις των ωοθυλακίων των γυναικών και στους δύο κύκλους.



**Πίνακας 6.** Υπερηχογραφικές μετρήσεις των ωοθυλακίων των γυναικών και στους δύο κύκλους (μέση τιμή  $\pm$  SEM, έκφραση τιμών σε mm) την 8<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> ημέρα των κύκλων, καθώς και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή.

ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ (mm)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
8	9,79	0.52	8,94	0.74
10	11,44	0.57	9,23	0.71
-4	13,15	0.41	9,53	0.42
-3	13,94	0.64	9,09	0.54
-2	15,19	0.49	9,55	0.49
-1	16,90	0.88	9,36	0.26
0	19,34	0.74	9,03	0.68
+1	21,26	0.77	10,10	2.1
+2	21,94	3.33	-	-

**Σχήμα 5. (α)** Ωοθυλακική ανάπτυξη (mean  $\pm$  SEM) από την ημέρα 8 έως την ημέρα 10. **(β)** Ωοθυλακική ανάπτυξη τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1 (κύκλος 1, ■), ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 (κύκλος 2, ▲) ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. \*P<0,05, σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2. +P<0,05, σημαντική διαφορά στη μεταβολή της ωοθυλακικής ανάπτυξης, από την αμέσως προηγούμενη τιμή, στον κύκλο 1.



Το ορμονικό προφίλ και η ωοθυλακική ανάπτυξη της εθελόντριας, στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους, απεικονίζονται στα Σχήματα 6, 7 και 8. Στον κύκλο 1 το κύμα της LH εκδηλώθηκε την 17<sup>η</sup> ημέρα. Την ίδια ημέρα οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης ήταν 210 pg/ml και το μέγεθος του ωοθυλακίου ήταν 17 mm. Στον κύκλο 2, ο Ganirelix χορηγήθηκε έως την ημέρα 19, αντί της ημέρας έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1 (ημέρα 17), λόγω του ότι παρατηρήθηκε ωοθυλακική ωρίμανση με διακολλικό υπερηχογράφημα, παρά το γεγονός ότι χορηγούταν ο ανταγωνιστής.

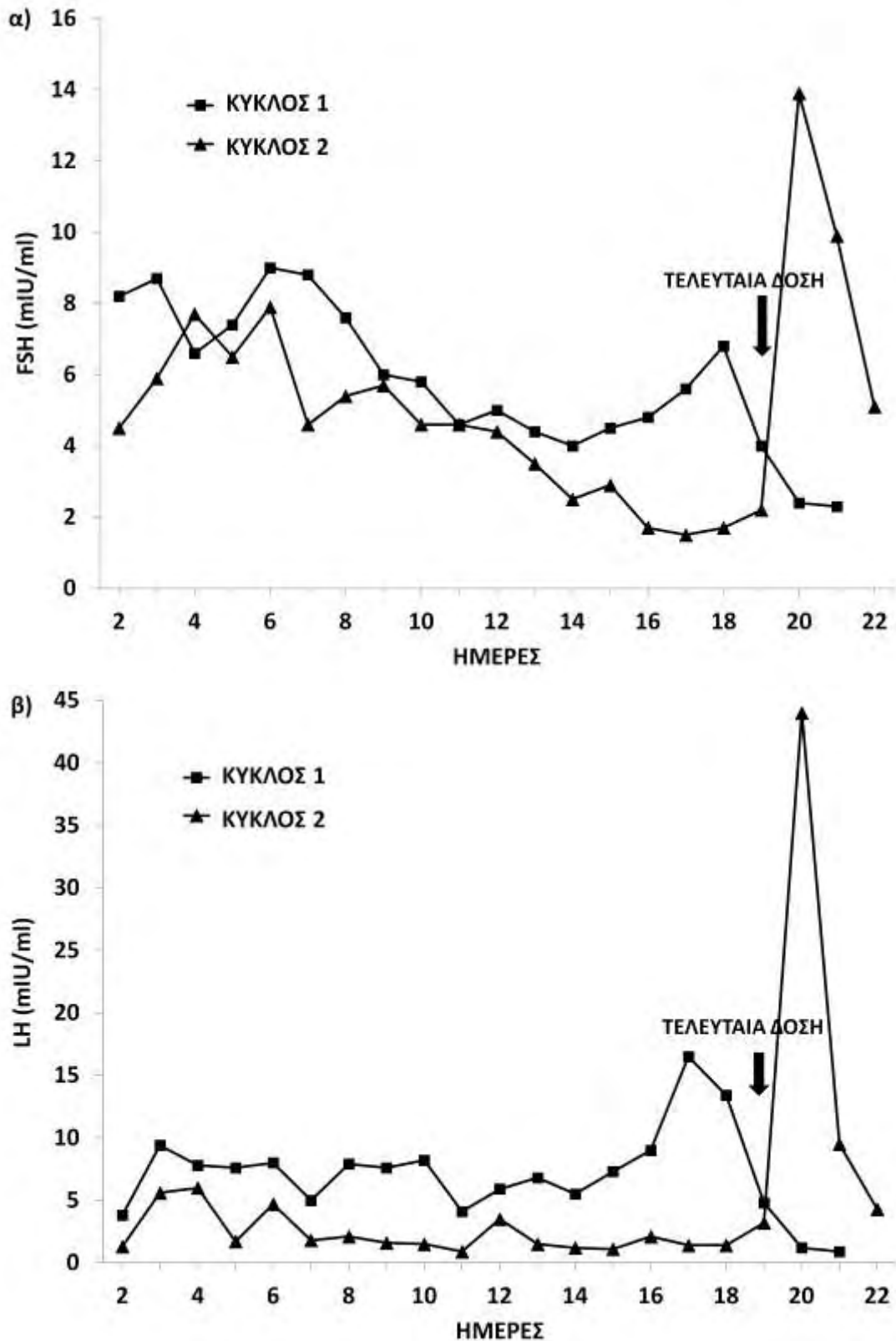
Την 19<sup>η</sup> ημέρα, στον κύκλο 2, διαπιστώθηκε ένα κυρίαρχο ωοθυλάκιο διαμέτρου 16,7 mm, ενώ, παράλληλα, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης ήταν 205 pg/ml. Το κύμα της LH ξεκίνησε την ημέρα 20 (44,0 mIU/ml), όταν το μέγεθος του ωοθυλακίου ήταν 20,7 mm. Μια εβδομάδα μετά την έναρξη του κύματος της LH η τιμή της προγεστερόνης ήταν υψηλή (21,1 ng/ml). Στον πίνακα 7 απεικονίζονται τα ορμονικά χαρακτηριστικά και οι τιμές του ωοθυλακίου της γυναίκας και στους δύο κύκλους.

Η έμμηνος ρύση στον κύκλο 2 καθυστέρησε κατά  $11,0 \pm 0,85$  ημέρες (n=8). Στην εθελόντρια, στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους, η έμμηνος ρύση καθυστέρησε μόνο κατά 3 ημέρες.

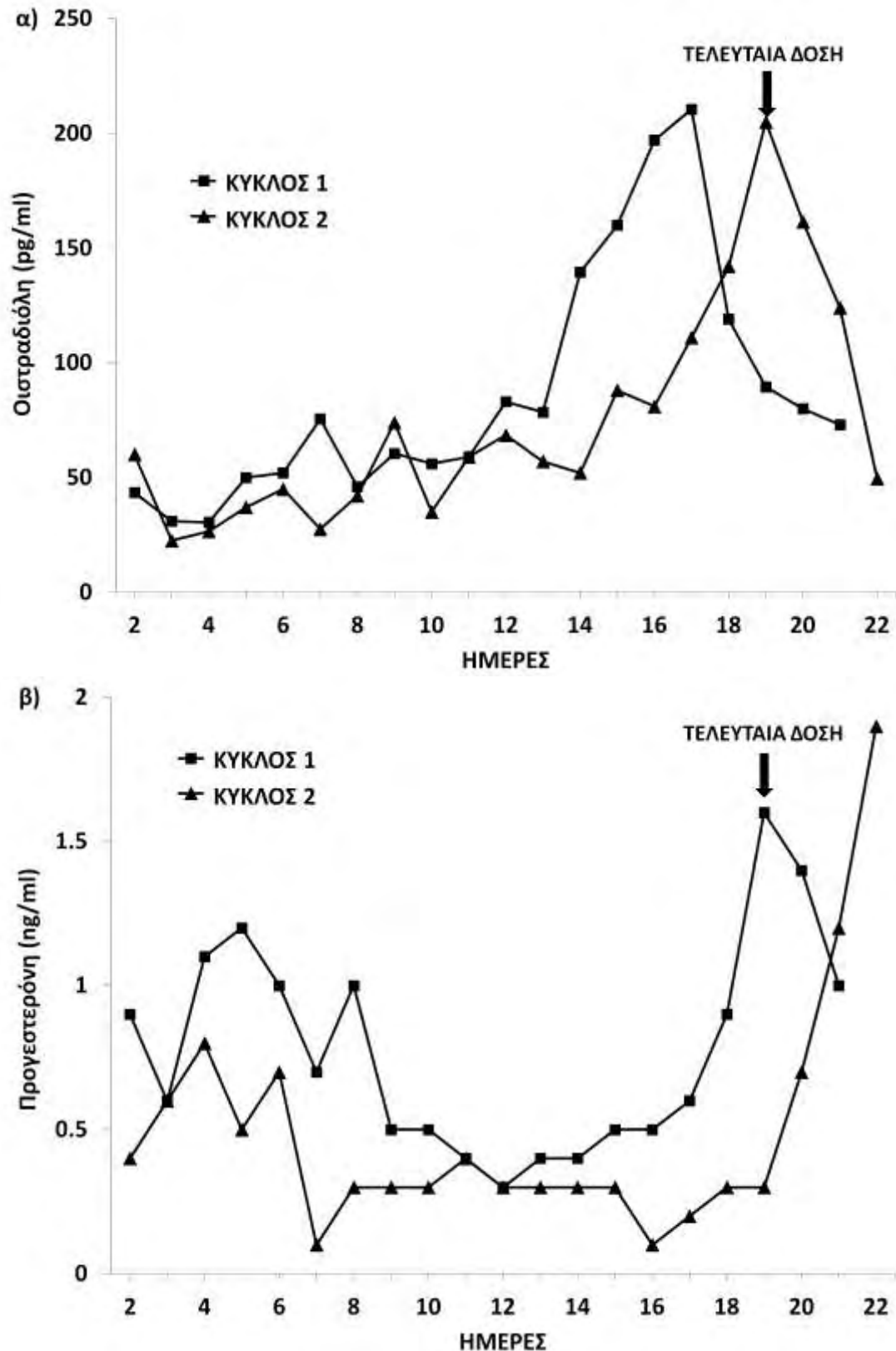
**Πίνακας 7.** Ορμονικό προφίλ και τιμές του μεγέθους του ωοθυλακίου στη γυναίκα στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους. E2= Οιστραδιόλη, P4= Προγεστερόνη. ΚΥΚΛΟΣ 1= Φυσιολογικός γεννητικός κύκλος, ΚΥΚΛΟΣ 2= Χορήγηση Ganirelix.

ΗΜΕΡΑ	FSH (mIU/ml)		LH (mIU/ml)		E2 (pg/ml)		P4 (ng/ml)		ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ (mm)	
	ΚΥΚΛΟΣ 1	ΚΥΚΛΟΣ 2	ΚΥΚΛΟΣ 1	ΚΥΚΛΟΣ 2	ΚΥΚΛΟΣ 1	ΚΥΚΛΟΣ 2	ΚΥΚΛΟΣ 1	ΚΥΚΛΟΣ 2	ΚΥΚΛΟΣ 1	ΚΥΚΛΟΣ 2
2	8.2	4.5	3.8	1.3	43.5	60	0.9	0.4		
3	8.7	5.9	9.4	5.6	31	22.5	0.6	0.6		
4	6.6	7.7	7.8	6	30.5	26.5	1.1	0.8		
5	7.4	6.5	7.6	1.7	50	37	1.2	0.5		
6	9	7.9	8	4.7	52	45	1	0.7		
7	8.8	4.6	5	1.8	75.5	27.5	0.7	0.1		
8	7.6	5.4	7.9	2.1	46	42	1	0.3	8.75	7.25
9	6	5.7	7.6	1.6	60.5	74	0.5	0.3		
10	5.8	4.6	8.2	1.5	56	35	0.5	0.3	7.9	7.35
11	4.6	4.6	4.1	0.9	59	59	0.4	0.4	11.25	6.6
12	5	4.4	5.9	3.5	83	68.5	0.3	0.3	12.55	7.75
13	4.4	3.5	6.8	1.5	78.5	57	0.4	0.3	12.9	9.65
14	4	2.5	5.5	1.2	139.5	52	0.4	0.3	12.05	10.55
15	4.5	2.9	7.3	1.1	160	88	0.5	0.3	15.35	11.6
16	4.8	1.7	9	2.1	197	81	0.5	0.1	16.55	13.2
17	5.6	1.5	16.5	1.4	210.5	111	0.6	0.2	17	15.55
18	6.8	1.7	13.4	1.4	119	142	0.9	0.3	18.25	15.7
19	4	2.2	4.8	3.2	89.5	205	1.6	0.3	20.6	16.65
20	2.4	13.9	1.2	44	80	161.5	1.4	0.7	25.7	20.7
21	2.3	9.9	0.9	9.5	73	124	1	1.2		19.75
22		5.1		4.3		49.5		1.9		

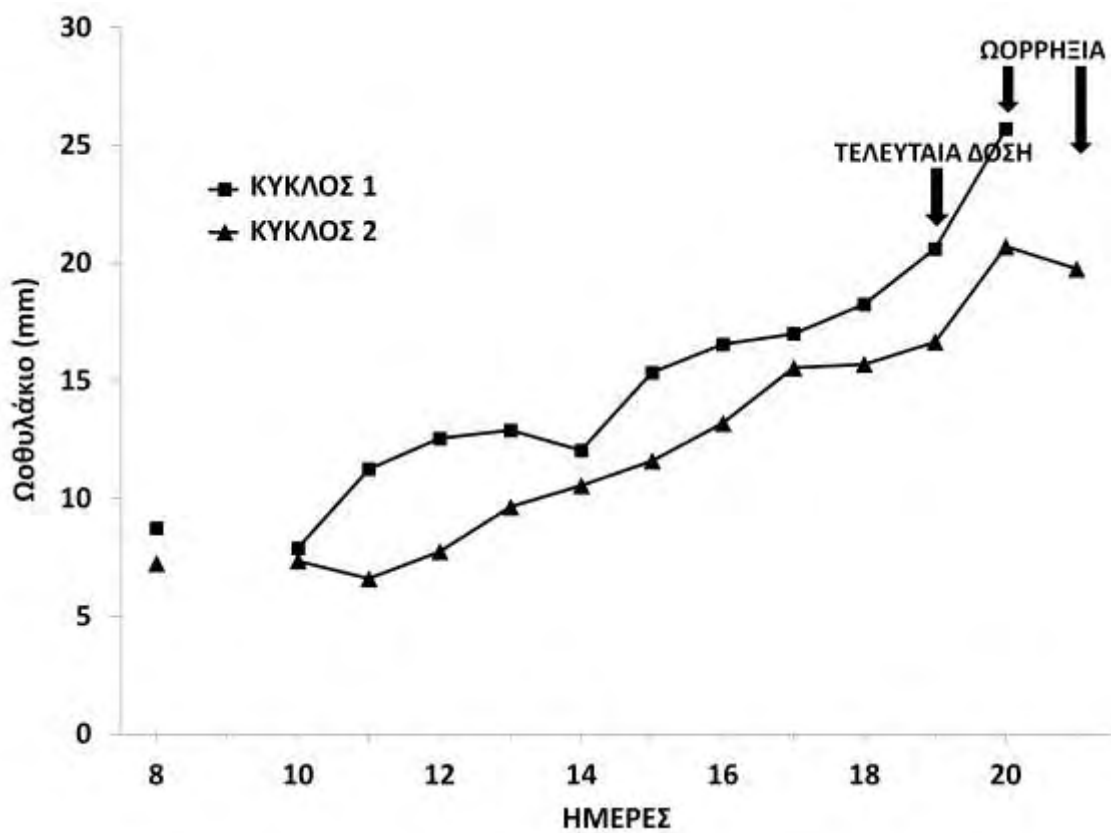
**Σχήμα 6.** Συγκεντρώσεις των (α) FSH και (β) LH στη γυναίκα στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους. Κύκλος 1 (κύκλος 1, ■), φυσιολογικός γεννητικός κύκλος. Κύκλος 2 (κύκλος 2, ▲), κύκλος στον οποίο χορηγήθηκε Ganirelix καθημερινά από την ημέρα 2 έως την ημέρα 19.



**Σχήμα 7.** Συγκεντρώσεις των (α) οιστραδιόλης και (β) προγεστερόνης στη γυναίκα στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους. Κύκλος 1 (κύκλος 1, ■), φυσιολογικός γεννητικός κύκλος. Κύκλος 2 (κύκλος 2, ▲), κύκλος στον οποίο χορηγήθηκε Ganirelix καθημερινά από την ημέρα 2 έως την ημέρα 19.



**Σχήμα 8.** Ωοθυλακική ανάπτυξη στη γυναίκα στην οποία παρατηρήθηκε ωοθυλακιορρηξία και στους δύο κύκλους. Κύκλος 1 (κύκλος 1,  $\blacksquare$ ), φυσιολογικός γεννητικός κύκλος. Κύκλος 2 (κύκλος 2,  $\blacktriangle$ ), κύκλος στον οποίο χορηγήθηκε Ganirelix καθημερινά από την ημέρα 2 έως την ημέρα 19.



**Μελέτη των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης στους δύο κύκλους και της συσχέτισης αυτών με τις FSH, LH, οιστραδιόλη και προγεστερόνη στον κύκλο 1.**

Για την μελέτη της επίδρασης του GnRH ανταγωνιστή στην κισπεπτίνη χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματά της και στους δύο κύκλους, ενώ για την μελέτη της συσχέτισης της κισπεπτίνης με τις FSH, LH, οιστραδιόλη και προγεστερόνη χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των ορμονών των γυναικών στον κύκλο 1. Το ορμονικό προφίλ των γυναικών στον κύκλο 1 και της κισπεπτίνης και στους δύο κύκλους φαίνεται στους Πίνακες 8, 9 και 10.



**Πίνακας 8.** Ορμονικό προφίλ των γυναικών στον κύκλο 1 (FSH και LH) (μέση τιμή  $\pm$  SEM) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή.

FSH (mIU/ml)	Κύκλος	
	1	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM
2	5,60	0.76
3	5,79	0.61
4	5,63	0.44
5	5,44	0.48
6	5,39	0.34
7	6,05	0.5
8	5,21	0.43
9	5,59	0.39
10	5,41	0.62
-4	4,43	0.4
-3	4,26	0.45
-2	3,98	0.48
-1	3,79	0.59
0	6,60	1.08
+1	10,00	1.88
+2	7,20	2.57

LH (mIU/ml)	Κύκλος	
	1	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM
2	6,23	0.72
3	6,09	0.91
4	5,58	0.72
5	6,10	1.03
6	5,91	1.32
7	7,25	0.95
8	8,39	1.42
9	8,31	1.26
10	8,16	1.24
-4	8,33	1.34
-3	7,94	0.83
-2	9,36	1.13
-1	10,56	0.76
0	45,54	10.82
+1	55,81	8.08
+2	29,42	9.45

**Πίνακας 9.** Ορμονικό προφίλ των γυναικών στον κύκλο 1 (E2 και P4), (μέση τιμή ± SEM) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. E2=Οιστραδιόλη, P4=Προγεστερόνη.

E2 (pg/ml)	Κύκλος	
	1	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM
2	72,99	14.08
3	71,70	14.62
4	73,55	14.57
5	73,23	15.86
6	74,40	17.26
7	85,88	18.15
8	75,15	13.08
9	99,01	16
10	118,98	22.44
-4	99,20	17.3
-3	137,09	25.08
-2	174,33	25.57
-1	234,06	29.35
0	332,91	63.4
+1	252,43	46.82
+2	145,50	34.01

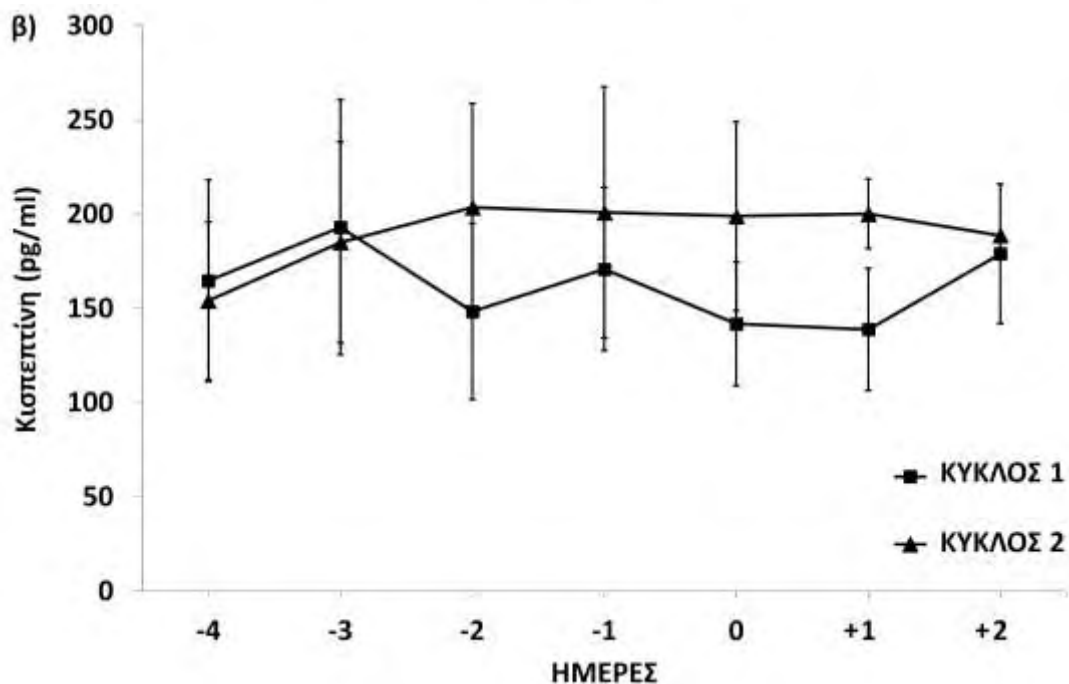
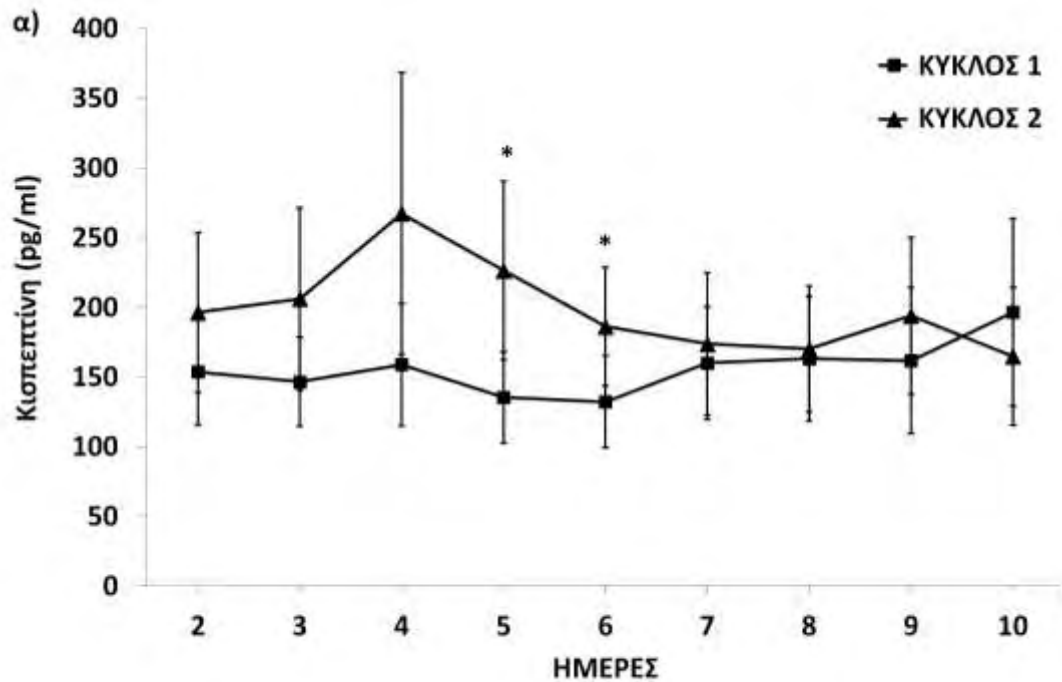
P4 (ng/ml)	Κύκλος	
	1	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM
2	0,73	0.13
3	1,15	0.48
4	1,03	0.47
5	0,98	0.43
6	0,80	0.39
7	0,93	0.48
8	0,89	0.38
9	0,86	0.39
10	0,53	0.07
-4	0,98	0.47
-3	0,89	0.38
-2	0,91	0.38
-1	0,53	0.06
0	0,66	0.06
+1	1,14	0.12
+2	1,46	0.21

**Πίνακας 10.** Τιμές της κισπεπτίνης (μέση τιμή  $\pm$  SEM) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2). Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή.

ΚΙΣΠΕΠΤΙΝΗ (pg/ml)	Κύκλος			
	1		2	
Ημέρα κύκλου	Μέση τιμή	SEM	Μέση τιμή	SEM
2	153,89	38	196,56	57,31
3	146,73	32	206,20	65,41
4	159,04	44	267,48	101,1
5	135,58	32,65	226,55	64
6	132,36	33	186,39	42,55
7	160,15	40,57	173,91	51,06
8	163,26	44,6	170,38	45,12
9	161,92	52,34	194,18	56,26
10	196,61	67,23	165,00	49,4
-4	164,76	53,4	154,19	41,83
-3	193,20	67,6	185,21	53,35
-2	148,44	46,7	203,69	55,24
-1	170,95	43,24	201,05	66,61
0	141,96	33	199,07	50,06
+1	138,98	32,46	200,30	18,57
+2	179,07	37,05	188,86	-

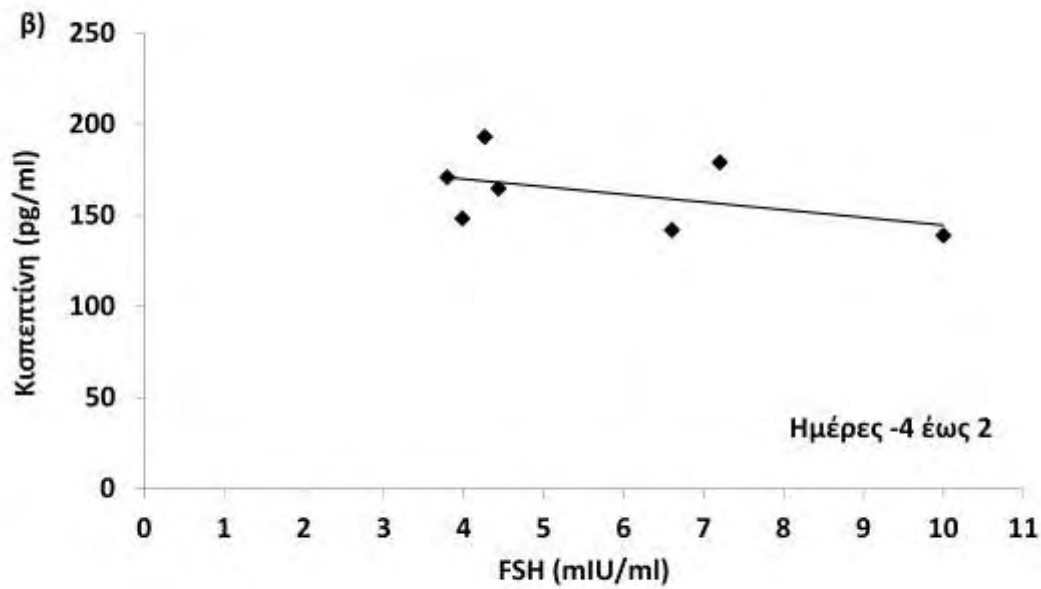
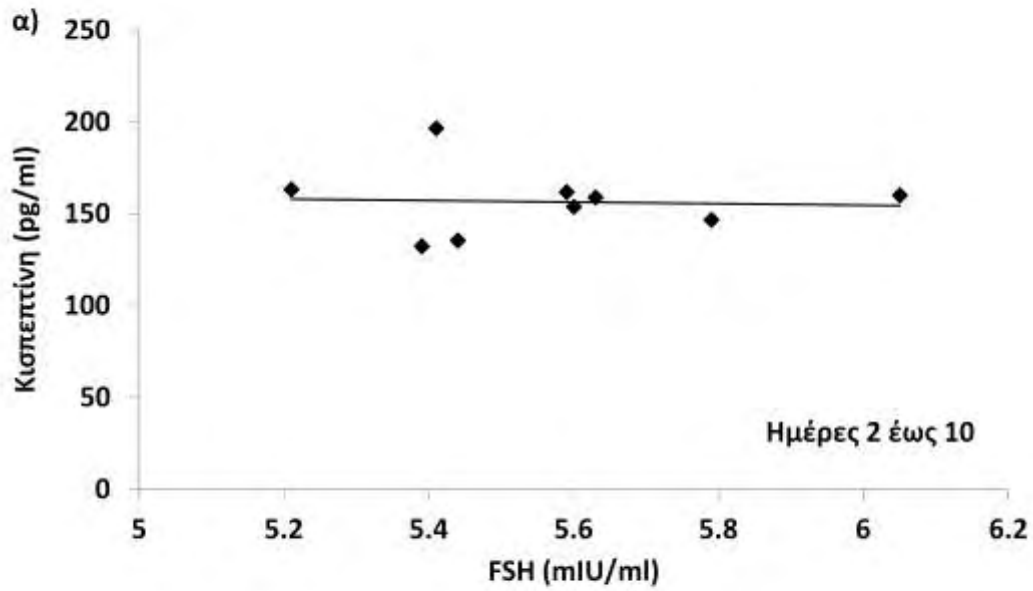
Στο Σχήμα 9 απεικονίζονται τα επίπεδα της κισπεπτίνης από τη 2<sup>η</sup> έως τη 10<sup>η</sup> ημέρα και για το χρονικό διάστημα από την τέταρτη ημέρα πριν από την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο μέρες μετά, και στους δύο κύκλους. Οι συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους, σε όλες τις ημέρες, εκτός των ημερών 5 ( $P=0,050$ ) και 6 ( $P=0,043$ ), στις οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο 2. Ο βαθμός μεταβολής των τιμών της κισπεπτίνης από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10, όπως επίσης και τις ημέρες -4 έως 0, δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων ( $P=0,253$  και  $P=0,109$ , αντίστοιχα). Ειδικότερα, δεν υπήρξε μεταβολή των επιπέδων της κισπεπτίνης και στις δύο ανωτέρω χρονικές περιόδους ούτε στον κύκλο 1 ( $P=0,349$  και  $P=0,429$ , αντίστοιχα), ούτε στον κύκλο 2 ( $P=0,486$  και  $P=0,131$ , αντίστοιχα).

**Σχήμα 9. (α)** Συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης (μέση τιμή  $\pm$  SEM) των γυναικών στον κύκλο 1 (κύκλος 1,  $\blacksquare$ ) και στον κύκλο 2 (κύκλος 2,  $\blacktriangle$ ) από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10. **(β)** Συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2) και στους δύο κύκλους. Αντίστοιχη της ημέρας αναφοράς στον κύκλο 2 ήταν η ημέρα της τελευταίας δόσης του ανταγωνιστή. \* $P < 0,05$ , σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύκλων 1 και 2.

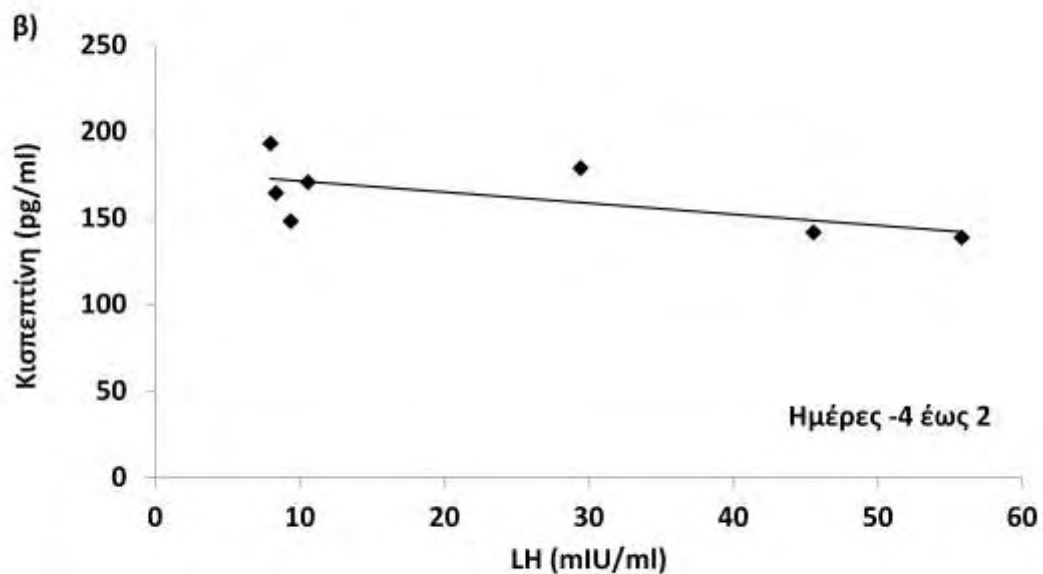
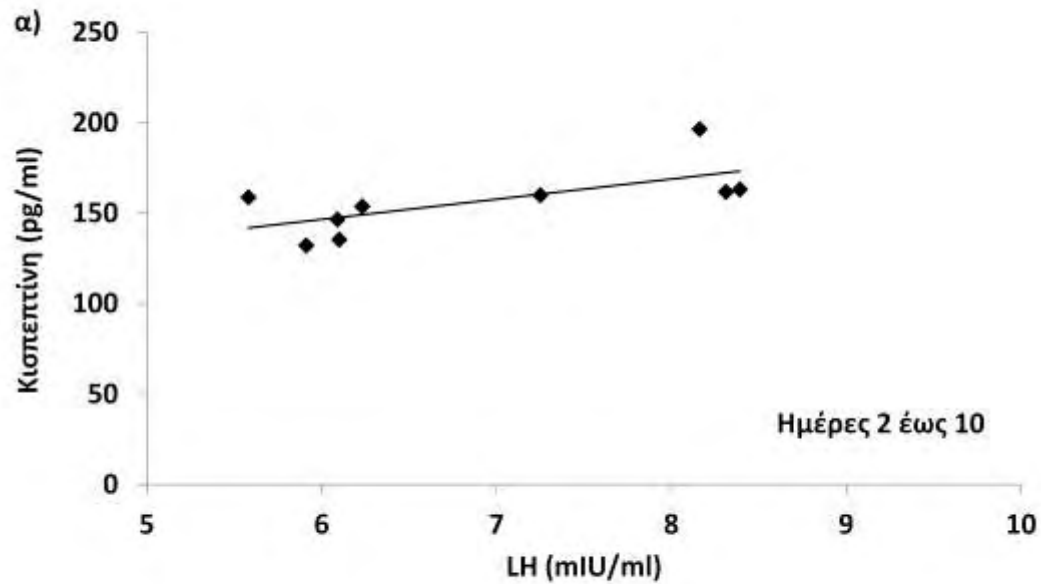


Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με τις συγκεντρώσεις των γοναδοτροφινών, δηλαδή της FSH και της LH, και των στεροειδών ορμονών, οιστραδιόλης και προγεστερόνης, στον κύκλο 1, αποτυπώνεται στα Σχήματα 10 έως και 13. Τα επίπεδα της FSH σε όλες τις ημέρες δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκκριση της κισπεπτίνης και αντιστρόφως. Υπήρξε θετική συσχέτιση των τιμών της LH την 4<sup>η</sup> ημέρα με τις τιμές της κισπεπτίνης στις ημέρες 2 ( $r=0,89$ ,  $P<0,01$ ) και 3 ( $r=0,79$ ,  $P<0,05$ ). Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκκριση της κισπεπτίνης και αντιστρόφως.

**Σχήμα 10.** Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με τις συγκεντρώσεις της FSH στον κύκλο 1: **(α)** Από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και **(β)** Τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2).

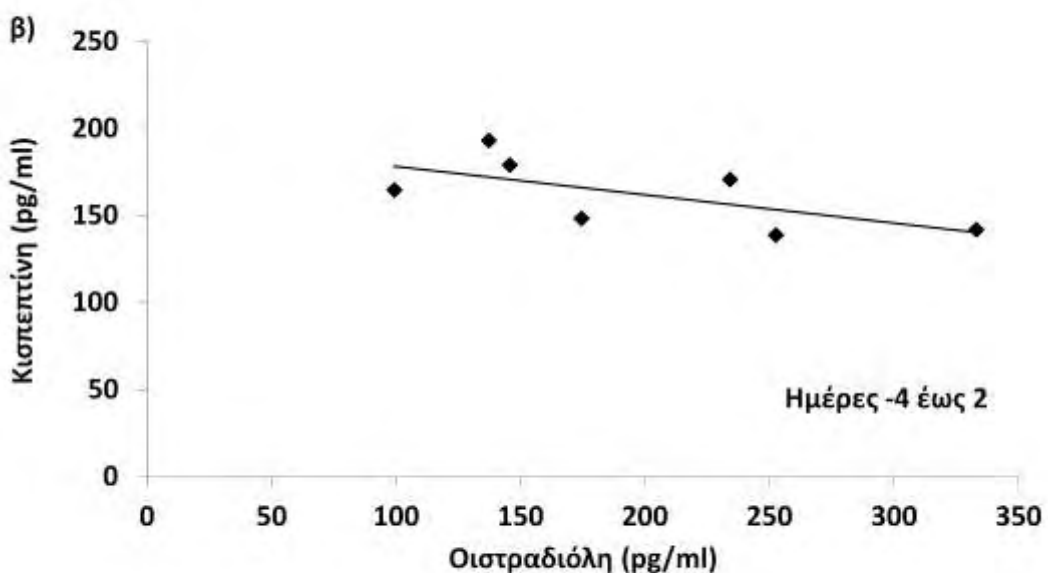
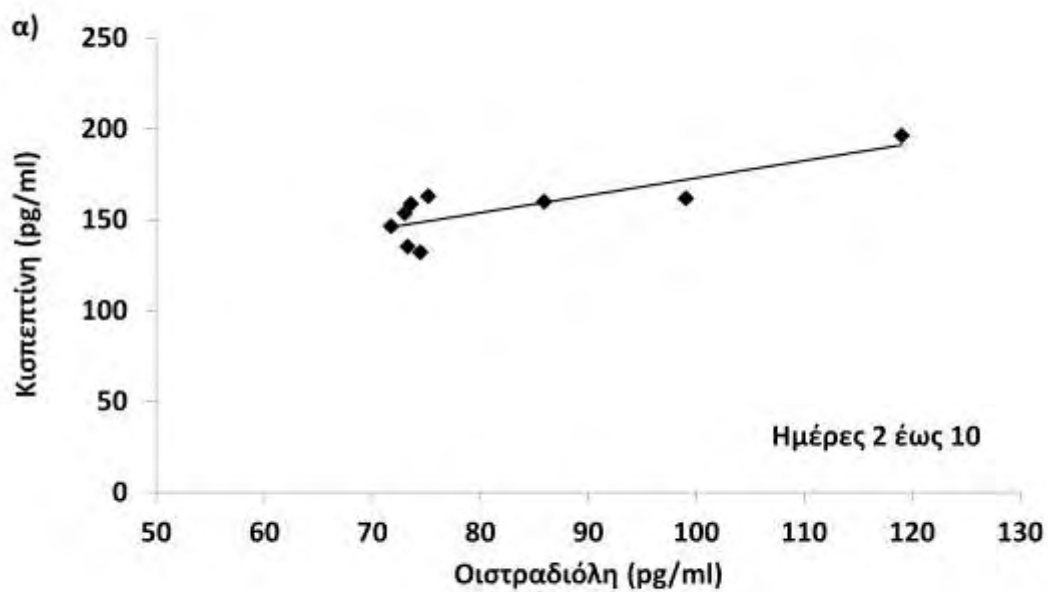


**Σχήμα 11.** Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με τις συγκεντρώσεις της LH στον κύκλο 1: **(α)** Από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και **(β)** Τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2).

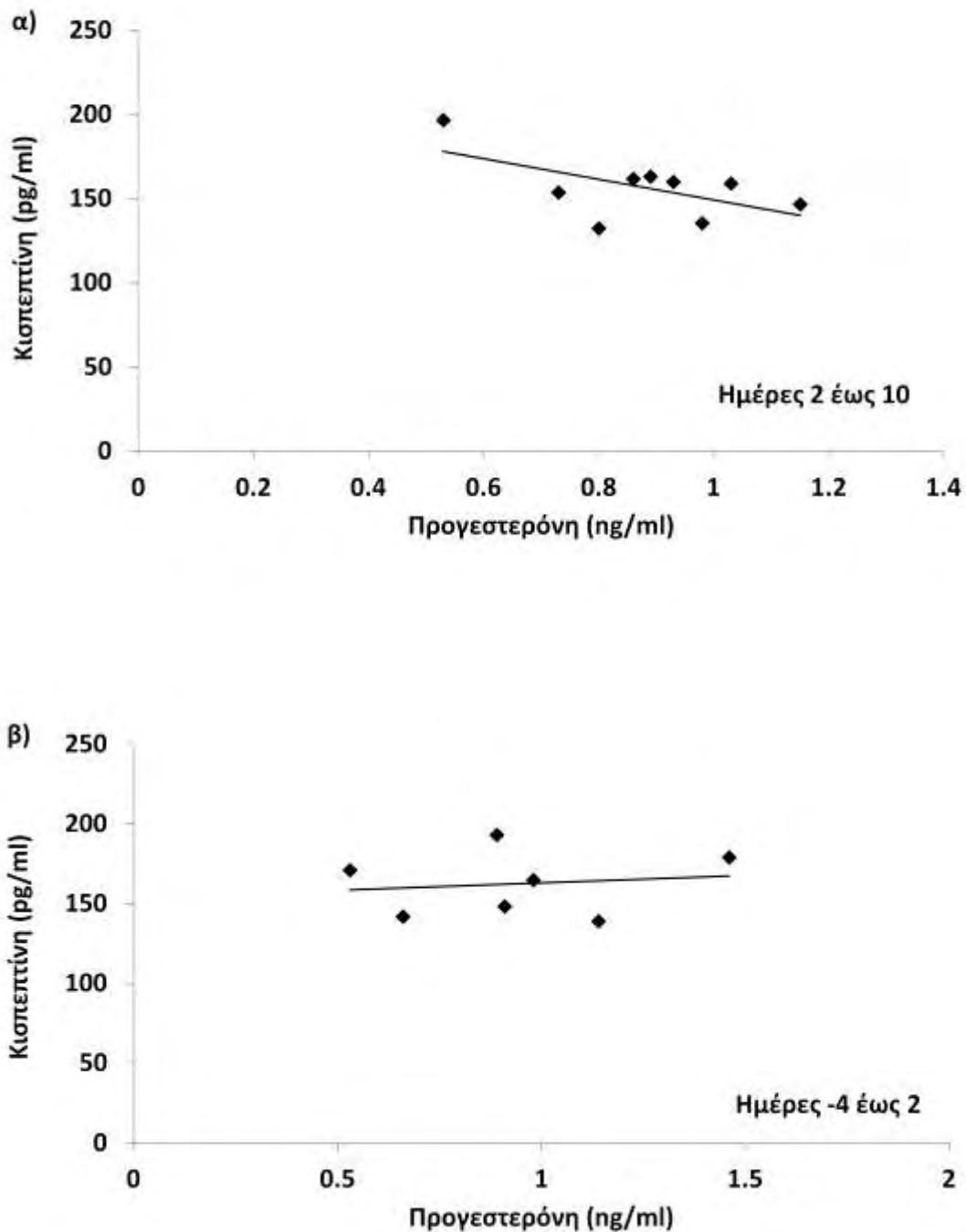




**Σχήμα 12.** Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με τις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στον κύκλο 1: **(α)** Από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και **(β)** Τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2).



**Σχήμα 13.** Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με τις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον κύκλο 1: **(α)** Από την ημέρα 2 έως την ημέρα 10 και **(β)** Τέσσερις ημέρες πριν (-4) την έναρξη του κύματος της LH, ημέρα αναφοράς (ημέρα 0), έως και δύο ημέρες μετά (+2).



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι η χορήγηση σε φυσιολογικές γυναίκες του GnRH ανταγωνιστή, Ganirelix, στην ημερήσια δόση των 0,25 mg κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου επηρεάζει την έκκριση της LH και εμποδίζει την ωοθυλακική ωρίμανση. Παρόλο που τα επίπεδα της LH μειώθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με τον κύκλο, στον οποίο δεν χορηγήθηκε ανταγωνιστής, δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στο ρυθμό μεταβολής της εντός του κύκλου, σε αντίθεση με τα δεδομένα προηγούμενων μελετών (42, 85). Η εμφανής αυτή διαφοροποίηση της παρούσας μελέτης σε σχέση με τις προηγούμενες, όσον αφορά στην έκκριση της LH, μπορεί να εξηγηθεί από τη συχνότητα των αιμοληψιών. Ειδικότερα, σε μία προγενέστερη μελέτη, η ελάχιστη τιμή της LH, της FSH και της οιστραδιόλης παρατηρήθηκε στις 4, 16 και 16 ώρες, αντιστοίχως, μετά από τη χορήγηση της τελευταίας δόσης Ganirelix, αλλά οι τιμές των ανωτέρω ορμονών επανήλθαν στα προ χορήγησης επίπεδα εντός 24 ωρών (42). Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι στην παρούσα μελέτη δεν εντοπίστηκε μία προσωρινή μείωση των επιπέδων των ορμονών. Σύμφωνα με προηγούμενα δεδομένα, ο GnRH ανταγωνιστής, Cetrorelix, εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά με τον Ganirelix (34-37, 86).

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε μόνο η δοσολογία των 0,25 mg/ανά ημέρα, καθώς πρόκειται για τη δοσολογία που χρησιμοποιείται επί του παρόντος σε πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών, για την αποτροπή του πρώιμου κύματος της LH. Η δόση, ωστόσο, αυτή αδυνατεί, μάλλον, να αποτρέψει το κύμα της LH σε κύκλους διέγερσης των ωοθηκών, καθώς έχουν παρατηρηθεί αρκετές εκκριτικές αιχμές της LH, σε συχνότητα από 8% έως 35%, ποσοστό που δεν απέχει πολύ από το ποσοστό (20%) της εμφάνισης ενός ενδογενούς κύματος της LH σε τέτοιους κύκλους χωρίς τη χορήγηση ανταγωνιστή ή αγωνιστή (50, 51, 83, 87). Επιπροσθέτως, η χορήγηση Ganirelix σε φυσιολογικές γυναίκες κατά την ωοθυλακική φάση, στην ημερήσια δόση των 0,25 mg για 5 ημέρες, απέτυχε να αναστείλει τον μηχανισμό θετικής παλίνδρομης αλληλορρυθμίσης των εξωγενώς χορηγηθέντων οιστρογόνων (52). Με την παρούσα, όμως, έρευνα, δεν μπόρεσε να ελεγχθεί αν θα μπορούσε να συμβεί το ίδιο με τα ενδογενώς εκκρινόμενα οιστρογόνα, καθώς η οιστραδιόλη δεν έφτασε ποτέ σε προωοθυλακιορρηκτικά επίπεδα, τα οποία θα μπορούσαν να

προκαλέσουν την έκκριση των γοναδοτροφινών, παρά μόνο σε μία γυναίκα στην οποία σημειώθηκε ενδογενές κύμα της LH, παρά τη χορήγηση του ανταγωνιστή. Στη βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί μόνο δύο τέτοιες περιπτώσεις με θεραπεία με Cetrorelix, γεγονός που δύναται να υποστηρίξει την υπόθεση ότι ο ανταγωνιστής ενδέχεται να μην μπορεί να εμποδίσει πάντα αποτελεσματικά το ενδογενές κύμα της LH (88). Η περιγραφόμενη στην παρούσα μελέτη (Σχήματα 6, 7 και 8) είναι η πρώτη περίπτωση με τη χρήση του Ganirelix.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα επίπεδα της οιστραδιόλης για το μεγαλύτερο μέρος εκάστου κύκλου, έως την ημέρα 8, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η στεροειδογένεση δεν επηρεάστηκε από τον ανταγωνιστή. Παρ' όλα αυτά, κατά τις ημέρες 9-10, δηλαδή στο χρονικό σημείο που θα έπρεπε να λάβει χώρα η επιλογή του ωοθυλακίου, καμία σημαντική αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης δεν παρατηρήθηκε στον κύκλο με τον ανταγωνιστή, σε σχέση με τον πρώτο κύκλο (φυσιολογικός κύκλος). Από το γεγονός αυτό μπορεί να συναχθεί ότι κατά τη διάρκεια της χορήγησης του Ganirelix απέτυχε η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Το γεγονός, ωστόσο, ότι ένα ενδογενές κύμα της LH σημειώθηκε μία εβδομάδα μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης του Ganirelix υποδεικνύει ότι, στην πλειοψηφία των γυναικών, η επιλογή του ωοθυλακίου έλαβε χώρα πολύ άμεσα μετά το τέλος της θεραπείας με τον ανταγωνιστή και η διαδικασία ολοκληρώθηκε εντός μερικών ωρών. Διαφαίνεται, επομένως, ότι τα ωοθυλάκια διέφυγαν της ατρησίας για αρκετές ημέρες κατά τη διάρκεια της αγωγής με Ganirelix.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου απέτυχε η επιλογή του ωοθυλακίου κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Ganirelix δεν είναι γνωστός. Η έλλειψη, πάντως, έκκρισης γοναδοτροφινών μπορεί να αποκλειστεί για τους παρακάτω λόγους. Οι τιμές της FSH παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της χορήγησης του ανταγωνιστή και ήταν παρόμοιες με αυτές του κύκλου 1. Αντιθέτως, δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική μεταβολή των επιπέδων της LH εντός του ίδιου κύκλου, κατά τη διάρκεια χορήγησης του ανταγωνιστή, ενώ την ημέρα 8 οι συγκεντρώσεις των FSH, LH και οιστραδιόλης ήταν παρόμοιες και στους δύο κύκλους (Σχήματα 1 και 2). Ως εκ τούτου, παρόλο που η συχνότητα των αιμοληψιών μπορεί να επηρέασε τα ευρήματα ως προς τα επίπεδα της LH, είναι εμφανές ότι, συνολικά, οι συγκεντρώσεις της στον ορό του αίματος ήταν επαρκείς για τη φυσιολογική στεροειδογένεση. Ειδικότερα, η μεταβολή των τιμών της LH μεταξύ των δύο κύκλων, πριν από την ημέρα 8, δεν επηρέασε τη

στεροειδογένεση και δεν είχε καμία επιρροή στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου, καθώς, τη συγκεκριμένη ημέρα, το μέγεθος του ωοθυλακίου δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων. Μετά την ημέρα 8, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης άρχισαν να αυξάνονται μόνο στον κύκλο 1, δείχνοντας, έτσι, ότι, παρά το παρόμοιο προφίλ των γοναδοτροφινών και στους δύο κύκλους, επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου πραγματοποιήθηκε μόνο στον κύκλο 1 και όχι στον κύκλο με ανταγωνιστή.

Μετά την ημέρα 10 και, ιδιαίτερα, κατά τη διάρκεια των τελευταίων 4 ημερών πριν από την έναρξη του κύματος της LH στον κύκλο 1, το οποίο άρχισε κατά μέσο όρο την ημέρα 15, η επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου δεν είχε ακόμη πραγματοποιηθεί στον κύκλο με Ganirelix, ενόσω η χορήγησή του συνεχιζόταν. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, οι ορμονικές διαφορές μεταξύ των δύο κύκλων (Σχήματα 3 και 4) μπορούν να αποδοθούν στην ανάπτυξη του επικρατούντος ωοθυλακίου στον κύκλο 1 (καταστολή της FSH μέσω αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης / σταδιακή αύξηση της LH στην όψιμη ωοθυλακική φάση έως την έναρξη του κύματος της LH μέσω θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης) και όχι στη δράση του Ganirelix στον κύκλο 2. Συγκεκριμένα, στους κύκλους με Ganirelix (Σχήμα 3), οι καθημερινές συγκεντρώσεις της FSH και της LH ήταν εντός φυσιολογικών ορίων για πρόωμη ωοθυλακική περίοδο (FSH μέση τιμή 6-7 mIU/ml, LH μέση τιμή 6,5 mIU/ml), το οποίο δείχνει ότι, ακόμη και μετά την πάροδο αρκετών ημερών από την αγωγή με Ganirelix, υπήρξε φυσιολογική έκκριση γοναδοτροφινών και όχι έλλειψη αυτών.

Είναι, δε, αξιοσημείωτο ότι προγενέστερες μελέτες με τη χρήση των GnRH αγωνιστών ή πιο ισχυρών ανταγωνιστών, σε άνδρες ή γυναίκες, είχαν δείξει μία σημαντική μείωση της βιοδραστικότητας της FSH και της LH, η οποία, σε ορισμένες περιπτώσεις, ήταν δυσανάλογα μεγαλύτερη σε σχέση με τη μείωση της ανοσοαντιδραστικότητας αυτών των ορμονών (89-92). Εάν αυτό ισχύει και για τα τρέχοντα σκευάσματα των αναλόγων GnRH δεν είναι γνωστό.

Είναι γνωστό ότι, στο φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο, υπεύθυνη για τη στρατολόγηση-επιλογή του ωοθυλακίου είναι η FSH και όχι η LH. Η τελευταία είναι απαραίτητη έως ότου λάβει χώρα η επιλογή του ωοθυλακίου, στο πρώτο μισό της ωοθυλακικής φάσης, μόνο για την παραγωγή των ανδρογόνων, τα οποία μετατρέπονται σε οιστρογόνα από τη δράση της αρωματάσης που επάγεται από την FSH. Στην παρούσα έρευνα, τα επίπεδα της FSH ήταν παρόμοια και στους δύο κύκλους, ενώ η μικρή μείωση στις τιμές της LH δεν επηρέασε τη στεροειδογένεση,

καθώς οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης ήταν επίσης παρόμοιες. Συνεπώς, η μη επιλογή του ωοθυλακίου κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τον ανταγωνιστή δεν οφειλόταν στη μείωση της LH, αλλά στην αδυναμία της FSH να οδηγήσει στην επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου κατά τη χορήγηση του ανταγωνιστή. Τα ανωτέρω αποτελέσματα θα μπορούσαν να ερμηνευθούν ως ένδειξη μειωμένης ευαισθησίας της ωοθήκης στην FSH, η οποία προκλήθηκε από τον Ganirelix, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί μόνο με την αποδοχή ότι ο ανταγωνιστής επιδρά στην ωοθήκη.

Έως τώρα, GnRH υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί στην ανθρώπινη ωοθήκη, αλλά η σπουδαιότητά τους στη φυσιολογία παραμένει ασαφής (93). Ειδικότερα, GnRH υποδοχείς, όπως και οι τύποι I και II της GnRH, έχουν εντοπιστεί στα κοκκώδη κύτταρα των προωθυλακιορρηκτικών ωοθυλακίων, αλλά όχι σε αυτά των ωοθυλακίων που βρίσκονται από το αρχέγονο έως το πρώιμο κοιλοτικό στάδιο (94). Από την άλλη μεριά, ούτε ο Ganirelix ούτε ο Cetrorelix φαίνεται να επηρεάζουν τη στεροειδογένεση στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα *in-vitro* (25, 26), παρόλο που ο Cetrorelix μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων (27) και περιόρισε την έκφραση της αρωματάσης (31). Εντούτοις, δεν είναι γνωστό αν η ανωτέρω δράση πραγματοποιείται μέσω των GnRH υποδοχέων.

Στην παρούσα έρευνα δεν είναι πολύ πιθανή μία μείωση στη δράση της αρωματάσης, καθώς η στεροειδογένεση ήταν παρόμοια σε αμφοτέρους τους κύκλους έως την ημέρα 8. Δεν μπορεί, ωστόσο, να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι ο ανταγωνιστής επηρέασε τον μηχανισμό αύξησης της δραστηριότητας της αρωματάσης, η οποία είναι καθοριστική για τη μεταβολή του ενδο-ωοθυλακικού περιβάλλοντος από ανδρογονικό σε οιστρογονικό τη στιγμή της επιλογής του ωοθυλακίου. Εάν ο Ganirelix επηρεάζει την επαγωγή ενός ιδανικού αριθμού λειτουργικών υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα, καθοριστικού για την επιλογή του ωοθυλακίου δεν είναι γνωστό. Προηγούμενες *in-vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι η GnRH εμποδίζει την επαγωγή των FSH και LH υποδοχέων σε κοκκώδη κύτταρα τροκτικών, μία επίδραση η οποία εξουδετερώθηκε από τον GnRH ανταγωνιστή (21, 22). Είναι προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

Ο σχετικά μικρός αριθμός των γυναικών που έλαβαν μέρος στην παρούσα έρευνα δεν αποτελεί απαραίτητα περιοριστικό παράγοντα, καθώς κάθε γυναίκα ερευνηθήκε σε δύο κύκλους και, επομένως, η καθεμία εξ αυτών αποτελούσε control του εαυτού της. Αναμφίβολα, τα παρόντα ευρήματα δεν έχουν άμεση κλινική

εφαρμογή. Πράγματι, στα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης, η εξωγενώς χορηγούμενη FSH αναμένεται να υπερिσχύσει του μηχανισμού επίδρασης του Ganirelix στην ωοθήκη. Παρ' όλα αυτά, ο δεύτερος εν χρήσει ανταγωνιστής, Cetrotorelix, έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από την αρχή του κύκλου είτε προς επίτευξη συγχρονισμού του ενδομήτριου σε πρωτόκολλα δωρητών ωαρίων (95) είτε πριν από την έναρξη χορήγησης FSH για τη διέγερση των ωοθηκών (96). Σε κάθε περίπτωση, τα παρόντα αποτελέσματα παρέχουν πληροφορίες για περαιτέρω έρευνα αναφορικά με το ρόλο των GnRH ανταγωνιστών στην ωοθυλακιογένεση στους ανθρώπους.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν, επίσης, οι μεταβολές των τιμών της κισπεπτίνης στο αίμα και η συσχέτισή τους με εκείνες των γοναδοτροφινών και των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης, στην προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης του ανταγωνιστή στην έκκριση των ορμονών αυτών. Όσον αφορά στον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, υπάρχουν στη βιβλιογραφία δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης είναι αυξημένες στην πρόωμη ωοθυλακική φάση (71) και την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο (74, 97). Επιπλέον, ως προς την συσχέτιση των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης με εκείνες της οιστραδιόλης, δύο μελέτες κατέληξαν σε αντιφατικά συμπεράσματα, αφού μόνο η μία εξ' αυτών υποστήριξε ότι υπάρχει συσχέτιση (74, 97).

Η παρούσα εργασία δεν μπόρεσε να αποτυπώσει το μοτίβο αυτό έκκρισης της κισπεπτίνης που περιγράφηκε ανωτέρω, αφού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των συγκεντρώσεων της κισπεπτίνης στον κύκλο 1 από την πρόωμη ωοθυλακική φάση μέχρι και δύο μέρες μετά την έναρξη του κύματος της LH (Σχήμα 9). Επιπροσθέτως, δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της κισπεπτίνης ή των μεταβολών αυτών και των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης. Ωστόσο, υπήρξε θετική συσχέτιση μεταξύ της κισπεπτίνης και της LH στην ημέρα 2 έως την ημέρα 4, καθώς υψηλότερες τιμές της LH την ημέρα 4 σχετίζονταν με υψηλότερες τιμές της κισπεπτίνης τις ημέρες 2 και 3 (Σχήμα 11).

Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τον ανταγωνιστή, δεν επηρεάστηκε η έκκριση της κισπεπτίνης, διότι δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά των συγκεντρώσεών της ανάμεσα στους δύο κύκλους, εκτός των ημερών 5 και 6 στις οποίες οι συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης ήταν μεγαλύτερες στον κύκλο του ανταγωνιστή (Σχήμα 9). Είναι γνωστό ότι ακόμη και πολύ μικρές συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης έχουν την δυνατότητα να διεγείρουν την έκκριση της LH, δράση, όμως,

που αναστέλλεται από τη χορήγηση ενός GnRH ανταγωνιστή (66), γεγονός το οποίο ερμηνεύει τη μη συνοδό μεταβολή των επιπέδων της LH σε εκείνο το χρονικό διάστημα στον κύκλο θεραπείας με Ganirelix. Επιπροσθέτως, ο ανταγωνιστής δεν επηρέασε τον ρυθμό έκκρισης της κισπεπτίνης, καθώς δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ούτε στον βαθμό μεταβολής των τιμών της κισπεπτίνης μεταξύ των δύο κύκλων ούτε στις μεταβολές των επιπέδων της εντός των κύκλων.

Βεβαίως, όσον αφορά στο μοτίβο έκκρισης και τη μελέτη συσχέτισης της κισπεπτίνης με τις υπόλοιπες ορμόνες στην παρούσα εργασία, το πιο πιθανόν είναι ότι ο αριθμός των γυναικών και η συχνότητα των αιμοληψιών αποτέλεσαν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα. Πιθανότατα, ένας μεγαλύτερος αριθμός εθελοντριών και πιο συχνές αιμοληψίες κατά την διάρκεια της ημέρας στην ωοθυλακική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου, να μπορούσαν να αποτυπώσουν ένα πλήρες μοτίβο έκκρισης της κισπεπτίνης και συσχέτισης αυτής με τις υπόλοιπες ορμόνες. Επομένως, περισσότερες μελέτες θα πρέπει να ακολουθήσουν για τη διευκρίνιση του ρόλου της κισπεπτίνης στον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο.

Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι κατά τη διάρκεια της χορήγησης του GnRH ανταγωνιστή, Ganirelix, σε φυσιολογικές γυναίκες, η επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου απέτυχε. Το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροφινών ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους σημαίνει ότι ο Ganirelix παρεμβαίνει στη διαδικασία επιλογής του ωοθυλακίου δρώντας στην ωοθήκη. Για τη διερεύνηση του υπεύθυνου μηχανισμού, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Τέλος, δεν διαπιστώθηκε κάποια σχέση μεταξύ της δράσης του Ganirelix και της κισπεπτίνης, όμως η φύση της παρούσας εργασίας δείχνει την αναγκαιότητα περαιτέρω έρευνας.



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η χορήγηση του GnRH ανταγωνιστή, Ganirelix, σε φυσιολογικές γυναίκες, στη δοσολογία χρήσης του κατά την ωοθηκική διέγερση, ελάττωσε τις βασικές τιμές της LH χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τις βασικές τιμές της FSH κατά το πρώτο μισό της ωοθυλακικής φάσης.
2. Κατά το ως άνω χρονικό διάστημα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των ημερήσιων τιμών των δύο γοναδοτροφινών μέσα στον ίδιο κύκλο.
3. Οι βασικές τιμές της οιστραδιόλης στο ίδιο διάστημα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά κατά τη χορήγηση του ανταγωνιστή τόσο σε σχέση με τους κύκλους, στους οποίους δεν χορηγήθηκε ο ανταγωνιστής όσο και μέσα στον ίδιο κύκλο.
4. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η στεροειδογένεση στις ωοθήκες δεν επηρεάστηκε από τον ανταγωνιστή κατά το πρώτο μισό της χορήγησης του και συνεπώς οι ελάχιστες ορμονικές μεταβολές (LH) στο ως άνω διάστημα, αν και σημαντικές, δεν είχαν κλινική σημασία.
5. Το μέγεθος του ωοθυλακίου στο ίδιο χρονικό διάστημα δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση του ανταγωνιστή.
6. Στην υπόλοιπη χρονική περίοδο, χορήγησης του ανταγωνιστή, και κυρίως από τη 10η ημέρα του κύκλου, δεν παρατηρήθηκε ωοθυλακική ωρίμανση. Αυτό ήταν συμβατό και με τη μη αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στο αίμα.
7. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο και την αντίστοιχη αύξηση της οιστραδιόλης στον κύκλο, στον οποίο δεν χορηγήθηκε ο ανταγωνιστής, υποδηλώνουν ότι η χρήση του ανταγωνιστή οδήγησε σε αποτυχία επιλογής του επικρατούντος ωοθυλακίου.
8. Τα δεδομένα αυτά περιγράφονται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία και αποτελούν σημαντική προσθήκη στην υπάρχουσα επιστημονική γνώση σχετικά με την πιθανή δράση του ανταγωνιστή στην ωοθήκη.
9. Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου ο ganirelix μπορεί να δρα στην ωοθήκη και να “αναστέλλει” τη διαδικασία της επιλογής του επικρατούντος ωοθυλακίου, δεν είναι γνωστός.

- 10.** Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του ανταγωνιστή, οι συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης δεν επηρεάστηκαν και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές αυτών μέσα στον ίδιο κύκλο, ενώ δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της κισπεπτίνης ή των μεταβολών αυτών και των ορμονών LH, FSH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο.
- 11.** Αν και τα δεδομένα αυτά σημαίνουν ότι η δράση του ανταγωνιστή στην έκκριση των υποφυσιακών γοναδοτροφινών δεν επηρεάζεται από την κισπεπτίνη, στο θέμα αυτό χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.
- 12.** Γενικώς, η χορήγηση του GnRH ανταγωνιστή, Ganirelix, σε φυσιολογικές γυναίκες στην ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου φαίνεται να αποκτά μεγαλύτερη κλινική σημασία ως προς την πιθανή δράση τους στη διαδικασία ωρίμανσης του ωοθυλακίου στην ωοθήκη παρά ως προς την έκκριση των γοναδοτροφινών ορμονών από την υπόφυση. Τα παραπάνω χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

## IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Σκοπός

Ο Ganirelix είναι ένας GnRH ανταγωνιστής που χρησιμοποιείται για να εμποδίσει το πρώιμο κύμα της LH κατά τη διέγερση των ωοθηκών. Η κισπεπτίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο το οποίο εκκρίνεται από την υποθάλαμο και πιθανότατα διαδραματίζει κύριο ρόλο στον άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Γονάδων. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετήσει την επίδραση του Ganirelix στην έκκριση των γοναδοτροφινών και στην ωοθυλακική ωρίμανση σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας.

### Υλικό και Μέθοδοι

Η μελέτη περιέλαβε 10 γυναίκες, με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Οι γυναίκες μελετήθηκαν σε δύο γεννητικούς κύκλους, ονομαζόμενοι κύκλος 1 (φυσιολογικός γεννητικός κύκλος) και κύκλος 2 (Ganirelix). Κατά τη διάρκεια και των δύο κύκλων ελήφθησαν από τις γυναίκες δείγματα αίματος καθημερινά από την ημέρα 2, ενώ διενεργήθηκε διακολπικός υπερηχογραφικός έλεγχος την 8<sup>η</sup> και την 10<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου των γυναικών και, εν συνέχεια, καθημερινώς μέχρι την διαπίστωση της ωοθυλακιορρηξίας. Κατά τη διάρκεια του κύκλου 2, χορηγήθηκε σε όλες τις γυναίκες υποδορίως ο GnRH ανταγωνιστής Ganirelix, στη δόση των 0,25 mg/ημέρα καθημερινά, από την 2<sup>η</sup> ημέρα μέχρι την ημέρα της έναρξης του κύματος της LH στον κύκλο 1. Σε όλα τα δείγματα αίματος μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των ορμονών FSH, LH, οιστραδιόλης, προγεστερόνης και κισπεπτίνης.

## Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του Ganirelix, οι συγκεντρώσεις της FSH και της οιστραδιόλης παρέμειναν σταθερές, ενώ, αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της LH στον κύκλο 2 ήταν σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με τον κύκλο 1 στις ημέρες 3 και 4 ( $P<0,05$ ) και στις ημέρες 7 και 9 ( $P<0,01$ ). Δεν παρατηρήθηκε, ωστόσο, καμία σημαντική μεταβολή στις τιμές της LH εντός του κύκλου 2. Από την ημέρα 10 και στη συνέχεια, στον κύκλο 2 δεν διαπιστώθηκε ωοθυλακική ωρίμαση, σε αντίθεση με τον κύκλο 1. Ωοθυλακιορρηξία παρατηρήθηκε στις 9 από τις 10 γυναίκες στον κύκλο 1. Στο κύκλο 2, η ωοθυλακιορρηξία καθυστέρησε σε 8 γυναίκες κατά τουλάχιστον μία εβδομάδα. Μόνο σε μία γυναίκα διαπιστώθηκε ανάπτυξη ωοθυλακίου και ωοθυλακιορρηξία, παρά τη χορήγηση του Ganirelix.

Οι συγκεντρώσεις της κισπεπτίνης ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους, σε όλες τις ημέρες, εκτός των ημερών 5 ( $P=0,050$ ) και 6 ( $P=0,043$ ), στις οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο 2. Ειδικότερα, δεν υπήρξε μεταβολή των επιπέδων της κισπεπτίνης στην ωοθυλακική φάση ούτε υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της FSH, οιστραδιόλης, προγεστερόνης και εκείνων της κισπεπτίνης. Θετική συσχέτιση των τιμών της LH την 4<sup>η</sup> ημέρα με τις τιμές της κισπεπτίνης διαπιστώθηκε τις ημέρες 2 ( $r=0,89$ ,  $P<0,01$ ) και 3 ( $r=0,79$ ,  $P<0,05$ ).

## Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά ότι, κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Ganirelix σε γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου απέτυχε. Επειδή τα επίπεδα των γοναδοτροφινών ήταν παρόμοια και στους δύο κύκλους, προκύπτει ότι ο Ganirelix επηρεάζει τη διαδικασία της επιλογής του ωοθυλακίου δρώντας στην ωοθήκη, γεγονός που χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω. Για το ρόλο της κισπεπτίνης στη δράση του Ganirelix στην έκκριση των γοναδοτροφινών απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

## V. SUMMARY

### **Purpose**

Ganirelix is a GnRH antagonist, which is widely used in Assisted Reproduction Technology (ART), for the prevention of premature LH peaks. Kisspeptin is a neuropeptide, which is secreted from the hypothalamus, and may have a crucial role on the onset of puberty in humans and on ovulation in women. The aim of this study was to examine the effect of Ganirelix on the secretion of LH and on follicle maturation in healthy women.

### **Patients and measurements**

Ten healthy female volunteers were studied during two menstrual cycles, i.e. cycle 1 (control, spontaneous cycle) and cycle 2 (Ganirelix). In both cycles, blood samples were taken daily starting on cycle day 2 until ovulation occurred on cycle 1 and transvaginal ultrasound was performed on cycle day 8 and 10 and then on a daily basis until ovulation occurred. During cycle 2, all women were given S.C. injections of the GnRH antagonist Ganirelix at the dose of 0,25 mg/day, starting on cycle day 2 until the day of the endogenous LH surge in cycle 1. In all blood samples, FSH, LH, Estradiol, Progesterone and Kisspeptin levels were measured.

## Results

During treatment with Ganirelix FSH levels remained stable and similar to those in cycle 1. LH levels were reduced in cycle 2 as compared to cycle 1 on days 3, 4, 7 and 9 ( $P<0,05$ ), with no significant within-cycle variation. Estradiol levels until day 10 did not differ significantly between the two cycles. After day 10, no follicle maturation and no substantial increase in serum estradiol levels were observed in the antagonist cycle (cycle 2), in contrast to cycle 1. In cycle 1, ovulation was observed in 9 women. In cycle 2, one volunteer ovulated, despite the treatment with Ganirelix, and in 8 women ovulation was postponed for a week. Serum Kisspeptin levels were similar in both cycles, except on days 5 and 6 ( $P<0,05$ ) in which they were higher in cycle 2. There was no significant within-cycle variation in Kisspeptin levels during the follicular phase. No correlation was found between serum FSH, estradiol and progesterone levels and those of Kisspeptin. However, Kisspeptin levels showed a positive correlation with those of LH on cycle days 2 ( $r=0,89$ ,  $P<0,01$ ) and 3 ( $r=0,79$ ,  $P<0,05$ ).

## Conclusions

This study shows for the first time that Ganirelix interferes with the selection of the dominant follicle. Since circulating gonadotrophin levels did not change substantially, it is suggested that Ganirelix affects the process of follicle selection by acting on the ovary. This, however, needs to be further investigated. Regarding the role of Kisspeptin in Ganirelix-suppressed gonadotrophin secretion further studies are required.

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μεσσήνης Ι.Ε., *Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία*; 2005.
2. Messinis IE. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2006;12(5):557-71.
3. Leslie J. DeGroot, J.Larry Jameson, *Endocrinology*, 5<sup>th</sup> ed.; 2005.
4. Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev*. 2010;31(4):544-77.
5. Shaw ND, Histed SN, Srouji SS, Yang J, Lee H, Hall JE. Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1955-61.
6. Dafopoulos K, Mademtzis I, Vanakara P, Kallitsaris A, Stamatiou G, Kotsovassilis C, Messinis IE. Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):641-5.
7. Kumanov P, Nandipati KC, Tomova A, Robeva R, Agarwal A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(6):786-812.
8. Coccia ME, Comparetto C, Bracco GL, Scarselli G. GnRH antagonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;1(115):44-56.
9. Griesinger G, Felberbaum RE, Schultze-Mosgau A, Diedrich K. Gonadotropin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive techniques: are there clinical differences between agents? *Drugs*. 2004;64(6):563-75.
10. Elter K, Nelson LR. Use of third generation gonadotropin-releasing hormone antagonists in vitro fertilization-embryo transfer: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2001;56(9):576-88.
11. Ron-El R, Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Kasterstein E, Friedler S. Induction of ovulation after gnRH antagonists. *Hum Reprod Update*. 2000;6(4):318-21.
12. European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 2001;16(4):644-51
13. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2002;8(3):279-90.
14. Hayden C. GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(1):17-25.

15. Tarlatzis BC, Bili HN. Gonadotropin-releasing hormone antagonists: impact of IVF practice and potential non-assisted reproductive technology applications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003;15(3):259-64.
16. Huirne JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet*. 2001;358(9295):1793-803.
17. Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):333-40.
18. Millar RP, Zhu YF, Chen C, Struthers RS. Progress towards the development of non-peptide orally-active gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists: therapeutic implications. *Br Med Bull*. 2000;56(3):761-72.
19. Taylor JE, Miller BT, Gray KD, Scott RT Jr, Catherino WH, Segars JH. The mechanism responsible for the supraphysiologic gonadotropin surge in females treated with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and primed with GnRH antagonist. *Fertil Steril*. 2010;93(5):1668-75.
20. Impicciatore GG, Tiboni GM. Extrapituitary actions of GnRH antagonists: prospects for in vitro fertilization programs. *Curr Pharm Des*. 2012;18(3):264-9.
21. Tilly JL, LaPolt PS, Hsueh AJ. Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1992;130(3):1296-302.
22. Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1991;128(5):2449-56.
23. Ludwig M, Albano C, Olivennes F, Felberbaum RE, Smitz J, et al. Plasma and follicular fluid concentrations of LHRH antagonist cetrorelix (Cetrotide) in controlled ovarian stimulation for IVF. *Arch Gynecol Obstet*. 2002;266(1):12-7.
24. 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.
25. Asimakopoulos B, Nikolettos N, Nehls B, Diedrich K, Al-Hasani S, et al. 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.
26. Weiss JM, Oltmanns K, Gürke EM, Polack S, Eick F, et al. Actions of gonadotropin-releasing hormone antagonists on steroidogenesis in human granulosa lutein cells. *Eur J Endocrinol*. 2001;144(6):677-85.
27. Metallinou C, Köster F, Diedrich K, Nikolettos N, Asimakopoulos B. The effects of cetrorelix and triptorelin on the viability and steroidogenesis of cultured human granulosa luteinized cells. *In Vivo*. 2012;26(5):835-9.



28. Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazábal A, Remohí J, et al. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetorelix). *Hum Reprod.* 2001;16(12):2533-9.
29. Mohamed KA, Davies WA, Lashen H. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist on steroidogenesis of low responders undergoing in vitro fertilization. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(2):57-62.
30. Minaretzis D, Alper MM, Oskowitz SP, Lobel SM, Mortola JF, et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist versus agonist administration in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation: cycle performance and in vitro steroidogenesis of granulosa-lutein cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(5):1518-25.
31. Winkler N, Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR. Gonadotropin releasing hormone antagonists suppress aromatase and anti-Müllerian hormone expression in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2010;94(5):1832-9.
32. Simon C, Oberyé J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, Murphy C, Adams S, Riesewijk A, Mannaerts B, Pellicer A. Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3318-27.
33. Griesinger G, Felberbaum R, Diedrich K. GnRH-antagonists in reproductive medicine. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;273(2):71-8.
34. Gonzalez-Barcena D, Vadillo Buenfil M, Garcia Procel E, Guerra-Arguero L, Cardenas Cornejo I, et al. Inhibition of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and sex-steroid levels in men and women with a potent antagonist analog of luteinizing hormone-releasing hormone, Cetorelix (SB-75). *Eur J Endocrinol.* 1994;131(3):286-92
35. Leroy I, d'Acremont M, Brailly-Tabard S, Frydman R, de Mouzon J, et al. A single injection of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist (Cetorelix) postpones the luteinizing hormone (LH) surge: further evidence for the role of GnRH during the LH surge. *Fertil Steril.* 1994;62(3):461-7.
36. Christin-Maitre S, Olivennes F, Dubourdieu S, Chabbert-Buffet N, Charbonnel B, et al. Effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) antagonist during the LH surge in normal women and during controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;52(6):721-6.
37. Sommer L, Zanger K, Dyong T, Dorn C, Luckhaus J, et al. Seven-day administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetorelix in normal cycling women. *Eur J Endocrinol.* 1994;131(3):280-5.
38. Nagaraja NV, Pechstein B, Erb K, Klipping C, Hermann R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of cetorelix, an LH-RH antagonist, after subcutaneous administration in healthy premenopausal women. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):617-25.
39. Erb K, Klipping C, Duijkers I, Pechstein B, Schueler A, et al. Pharmacodynamic effects and plasma pharmacokinetics of single doses of

- cetorelix acetate in healthy premenopausal women. *Fertil Steril*. 2001;75(2):316-23.
40. Nagaraja NV, Pechstein B, Erb K, Klipping C, Hermann R, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of luteinizing hormone (LH) suppression and LH surge delay by cetorelix after single and multiple doses in healthy premenopausal women. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(3):243-51.
  41. Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod*. 1998;13(9):2392-8.
  42. Oberyé JJ, Mannaerts BM, Huisman JA, Timmer CJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran) Part II Dose-proportionality and gonadotropin suppression after multiple doses of ganirelix in healthy female volunteers. *Fertil Steril*. 1999;72(6):1006-12.
  43. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) The ganirelix dose-finding study group. *Hum Reprod*. 1998;13(11):3023-31.
  44. Rabinovici J, Rothman P, Monroe SE, Nerenberg C, Jaffe RB. Endocrine effects and pharmacokinetic characteristics of a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist (Ganirelix) with minimal histamine-releasing properties: studies in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75(5):1220-5.
  45. Nelson LR, Fujimoto VY, Jaffe RB, Monroe SE. Suppression of follicular phase pituitary-gonadal function by a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist with reduced histamine-releasing properties (ganirelix). *Fertil Steril*. 1995;63(5):963-9.
  46. Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2006;12(2):159-68.
  47. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception: a Cochrane review. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(5):640-9.
  48. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(5):CD001750.
  49. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, et al. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4:CD001750.
  50. Engel JB, Ludwig M, Felberbaum R, Albano C, Devroey P, Diedrich K. Use of cetorelix in combination with clomiphene citrate and gonadotrophins: a suitable approach to 'friendly IVF'? *Hum Reprod*. 2002;17(8):2022-6.

51. Messinis IE, Loutradis D, Domali E, Kotsovassilis CP, Papastergiopoulou L, Kallitsaris A, Drakakis P, Dafopoulos K, Milingos S. Alternate day and daily administration of GnRH antagonist may prevent premature luteinization to a similar extent during FSH treatment. *Hum Reprod.* 2005;20(11):3192-7.
52. Messinis IE, Vanakara P, Zavos A, Verikouki C, Georgoulas P, Dafopoulos K. Failure of the GnRH antagonist ganirelix to block the positive feedback effect of exogenous estrogen in normal women. *Fertil Steril.* 2010;94(4):1554-6.
53. Felberbaum RE, Albano C, Ludwig M, Riethmüller-Winzen H, Grigat M, et al. Ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the GnRH antagonist cetrorelix according to the multiple dose protocol: a prospective uncontrolled phase III study. *Hum Reprod.* 2000;15(5):1015-20.
54. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev.* 1998;19(3):302-30.
55. Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(8):452-66.
56. Chappell PE, Goodall CP, Tonsfeldt KJ, White RS, Bredeweg E, Latham KL. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by an endogenous circadian clock. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(4):339-45.
57. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972-6.
58. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614-27.
59. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358(7):709-15.
60. Trevisan CM, Montagna E, de Oliveira R, Christofolini DM, Barbosa CP, et al. Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction?. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(4):1259-1276.
61. Kuohung W, Kaiser UB. GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(4):257-63.
62. Harter CJL, Kavanagh GS, Smith JT. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J Endocrinol.* 2018;238(3):R173-R183.
63. Tng EL. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med J.* 2015;56(12):649-56.
64. George JT, Seminara SB. Kisspeptin and the hypothalamic control of reproduction: lessons from the human. *Endocrinology.* 2012;153(11):5130-6.
65. Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, et al. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* 2010;1364:103-15.

66. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004;145(9):4073-7.
67. Jayasena CN, Nijher GM, Chaudhri OB, Murphy KG, Ranger A, et al. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4315-23.
68. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1731-7.
69. Kaiser UB, Kuohung W. KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. *Endocrine*. 2005;26(3):277-84.
70. Witchel SF, Tena-Sempere M. The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril*. 2013;100(1):12-22.
71. Chan YM, Butler JP, Sidhoum VF, Pinnell NE, Seminara SB. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1458-67.
72. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(10):3958-66.
73. George JT, Anderson RA, Millar RP. Kisspeptin-10 stimulation of gonadotrophin secretion in women is modulated by sex steroid feedback. *Hum Reprod*. 2012;27(12):3552-9.
74. Zhai J, Ding L, Zhao S, Li W, Sun Y, et al. Kisspeptin: a new marker for human pre-ovulation. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(7):560-563.
75. Abbara A, Clarke SA, Dhillon WS. Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocr Rev*. 2018;39(5):593-628.
76. Jayasena CN, Abbara A, Comninou AN, Nijher GM, Christopoulos G, et al. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3667-77.
77. Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, et al. Efficacy of Kisspeptin-54 to Trigger Oocyte Maturation in Women at High Risk of Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) During In Vitro Fertilization (IVF) Therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(9):3322-31.
78. Abbara A, Clarke S, Islam R, Prague JK, Comninou AN, et al. A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a Phase 2 randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2017;32(9):1915-1924.
79. Fraser HM. LHRH analogues: their clinical physiology and delivery systems. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1988;2(3):639-58.

80. Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, et al. Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod.* 1995;10(8):1974-81.
81. Felberbaum RE, Ludwig M, Diedrich K. Clinical application of GnRH-antagonists. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;166(1):9-14.
82. Hayden C. GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(1):17-25.
83. Borm G, Mannaerts B. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial The European Orgalutran Study Group. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1490-8.
84. Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, et al. GnRH antagonist versus long agonist protocols in IVF: a systematic review and meta-analysis accounting for patient type. *Hum Reprod Update.* 2017;23(5):560-579.
85. Fujimoto VY, Monroe SE, Nelson LR, Downey D, Jaffe RB. Dose-related suppression of serum luteinizing hormone in women by a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist (Ganirelix) administered by intranasal spray. *Fertil Steril.* 1997;67(3):469-73.
86. Griesinger G, Dawson A, Schultze-Mosgau A, Finas D, Diedrich K, et al. Assessment of luteinizing hormone level in the gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol. *Fertil Steril.* 2006;85(3):791-3.
87. Wang HL, Lai HH, Chuang TH, Shih YW, Huang SC, et al. A Patient Friendly Corifollitropin Alfa Protocol without Routine Pituitary Suppression in Normal Responders. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154123.
88. Weissman, A., Ravhon, A., Biran, G., Levin, D., Golan, A., Levran, D. Follicular growth and development under continuous gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Fertil. Steril.*, 2007;88(6):1677.e15-17.
89. Cedars, M.I., Surey, E., Hamilton, F., Lapolt, P., Meldrum, D.R. Leuprolide acetate lowers circulating bioactive luteinizing hormone and testosterone concentrations during ovarian stimulation for oocyte retrieval. *Fertil. Steril.* 1990;53(4):627-631.
90. Dahl, K.D., Pavlou, S.N., Kovacs, W.J., Hsueh, A.J. The changing ratio of serum bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men following treatment with a potent gonadotropin releasing hormone antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986;63(3):792-794.
91. Pavlou, S.N., Dahl, K.D., Wakefield, G., Rivier, J., Vale, W., Hsueh, A.J., Lindner, J. Maintenance of the ratio of bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men during chronic luteinizing hormone-releasing hormone agonist administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;66(5):1005-1009.

92. Meldrum, D.R., Tsao, Z., Monroe, S.E., Braunstein, G.D., Sladek, J., Lu, J.K., Vale, W., Rivier, J., Judd, H.L., Chang, R.J. Stimulation of LH fragments with reduced bioactivity following GnRH agonist administration in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984;58(4):755-757.
93. Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, André V, et al. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Hum Reprod Update.* 2016;22(3):358-81.
94. Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PC. Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4562-70.
95. Vidal, C., Giles, J., Garrido, N., Remohí, J., Simón, C., Bellver, J., Pellicer, A. GnRH antagonist for endometrial priming in an oocyte donation programme: a prospective, randomized controlled trial. *Reprod. Biomed. Online*, 2018;37(4):415-424.
96. Weissman, A., Ravhon, A., Steinfeld, Z., Nahum, H., Golan, A., Levran, D. Controlled ovarian stimulation using a long gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a proof of concept and feasibility study. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2013;76(2):113-8.
97. Latif R, Rafique N. Serum kisspeptin levels across different phases of the menstrual cycle and their correlation with serum oestradiol. *Neth J Med.* 2015;73(4):175-8.