

**Κλινικοεργαστηριακές  
μελέτες**

## Η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται αρνητικά με τις τιμές της μεταστίνης πλάσματος σε γυναίκες με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών

Δ. Ρούσσοσ<sup>1</sup>  
Α. Κούρτης<sup>2</sup>  
Γ. Κολιάκος<sup>3</sup>  
Η. Κατσίλης<sup>2</sup>  
Δ. Φαρμακιώτης<sup>2</sup>  
Α. Πιούκα<sup>2</sup>  
Ε. Βότση<sup>1</sup>  
Ε. Αλτσιτσιάδης<sup>2</sup>  
Β. Ζουρνατζή-Κόιου<sup>2</sup>  
Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη<sup>4</sup>  
Δ. Πανίδης<sup>2</sup>

### Περίληψη

Έχει αναφερθεί ότι η μεταστίνη διεγείρει την έκκριση της LH. Έχει, ακόμη, αναφερθεί ότι η παραγωγή μεταστίνης ρυθμίζεται αρνητικά από την τεστοστερόνη. Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό: α) την εκτίμηση των επιπέδων της μεταστίνης πλάσματος σε γυναίκες με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και σε μάρτυρες, κατά τη διάρκεια της πρώιμης παραγωγικής φάσης του κύκλου, και, β) την αναζήτηση ενδεχόμενης συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές της μεταστίνης πλάσματος και στις ορμονικές και μεταβολικές παραμέτρους του συνδρόμου. Σημειώνεται ότι ανάλογα αποτελέσματα δεν έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Μελετήθηκαν 80 επιλεγμένες γυναίκες, οι οποίες κατατάχθηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα (ομάδα Ι) περιλάμβανε 56 γυναίκες με PCOS και η δεύτερη ομάδα (ομάδα ΙΙ) 24 γυναίκες με φυσιολογικούς ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους, χωρίς υπερανδρογοναιμία (μάρτυρες). Οι γυναίκες με PCOS ταξινομήθηκαν σε δύο υποομάδες, με δείκτη μάζας σώματος (BMI)  $>25 \text{ Kg/m}^2$  (υποομάδα Ια,  $n=28$ ) και με BMI  $<25 \text{ Kg/m}^2$  (υποομάδα Ιβ,  $n=28$ ). Επίσης, οι μάρτυρες ταξινομήθηκαν σε δύο υποομάδες, με BMI  $>25 \text{ Kg/m}^2$  (υποομάδα ΙΙα,  $n=13$ ) και με BMI  $<25 \text{ Kg/m}^2$  (υποομάδα ΙΙβ,  $n=11$ ). Αιμοληψίες για τον προσδιορισμό των γοναδοτροπινών, της προλακτίνης, των ανδρογόνων, της 17α-υδροξυπρογεστερόνης, της SHBG, της ινσουλίνης, της γλυκόζης και της μεταστίνης έγιναν μεταξύ της τρίτης και της έκτης ημέρας αυτόματου εμμηνορρυσιακού κύκλου, στις 9 π.μ., ύστερα από ολονύκτια νηστεία. Βρέθηκε ότι:

α) τα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος στις γυναίκες με PCOS και με BMI  $>25 \text{ Kg/m}^2$  ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα των γυναικών με το σύνδρομο και με BMI  $<25 \text{ Kg/m}^2$  και οριακά ελαττωμένα σε σύγκριση με τις μάρτυρες με παρόμοιο BMI

β) οι συγκεντρώσεις της μεταστίνης πλάσματος σχετίζονταν αρνητικά, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, με το δείκτη HoMA-IR, με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας, με το δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων (FAI) και με το δείκτη μάζας σώματος (BMI) και θετικά με τα επίπεδα της SHBG και το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη

γ) ο λόγος γλυκόζης προς ινσουλίνη αποτελούσε τον ισχυρότερο ανεξάρτητο παράγοντα για τις τιμές της μεταστίνης και

δ) οι διαφορές στα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος έγιναν μη σημαντικές, ύστερα από προσαρμογή για το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη. Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν τη θέση ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξάνοντας τα επίπεδα των ελεύθερων ανδρογόνων, καταστέλλει τα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος. Η αύξηση των ελεύθερων ανδρογόνων από την αντισταθμισι-

<sup>1</sup> Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Α.Π.Θ.

<sup>2</sup> Μονάδα Ενδοκρινολογίας και Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Β' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Α.Π.Θ.

<sup>3</sup> Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

<sup>4</sup> Ενδοκρινολογικό Τμήμα, Α' Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών

Αλληλογραφία:

Δ. Ρούσσοσ

Μαιευτήρας-Γυναικολόγος

Μητροπόλεως 46-48

546 23, Θεσσαλονίκη

Τηλ.: 2310 285040

E-mail: magdacab@med.auth.gr

κή υπερινσουλιναίμια, λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, επάγεται με διπλό μηχανισμό, την αύξηση, δηλαδή, της παραγωγής ανδρογόνων από τις ωοθήκες και την ελάττωση της ηπατικής βιοσύνθεσης της SHBG.

**Όροι ευρηγίον:** Μεταστίνη, αντίσταση στην ινσουλίνη, PCOS, δείκτης ελεύθερων ανδρογόνων.

### Εισαγωγή

Η μεταστίνη είναι πεπτίδιο με 54 αμινοξέα, το οποίο απομονώθηκε από τον ανθρώπινο πλακούντα το 2001<sup>1</sup>. Το γονίδιο της μεταστίνης είναι το kiss-1, λόγος για τον οποίο η μεταστίνη ονομάστηκε και kiss-πεπτίνη<sup>2-4</sup>. Η μεταστίνη ασκεί τη δράση της ύστερα από σύνδεση με τον υποδοχέα της, τον GPR54, ο οποίος ονομάζεται, επίσης, AXOR12 ή hOT7T175<sup>1,5,6</sup>.

Όσον αφορά στις βιολογικές του δράσεις, το γονίδιο Kiss-1 χαρακτηρίζεται από δυνητική αντιμεταστατική δραστηριότητα έναντι ορισμένων όγκων, όπως το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδή, ο καρκίνος του μαστού, το μελάνωμα και ο καρκίνος του παγκρέατος<sup>1,3,5,7</sup>. Η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου Kiss-1, δηλαδή η αδυναμία παραγωγής μεταστίνης, οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους του όγκου και σε μεταστάσεις, στις περιπτώσεις του επιθηλιακού καρκίνου του οισοφάγου και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης<sup>8,9</sup>.

Καθώς είναι γνωστό ότι η μεταστίνη βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον ανθρώπινο πλακούντα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του πεπτιδίου αυτού στο πλάσμα εγκύων γυναικών. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι τα επίπεδα της μεταστίνης αυξάνονται 900 φορές στο πρώτο και 7.000 φορές στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σε σχέση με τα επίπεδα πλάσματος των μη εγκύων γυναικών<sup>10</sup>.

Πρόσφατα, προτάθηκε ότι η μεταστίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογίας της διείσδυσης της τροφοβλάστης, δεδομένης της δυνατότητάς της να παρεμποδίζει τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων<sup>11</sup>. Υπάρχουν εντυπωσιακές ομοιότητες ανάμεσα στη συμπεριφορά της διείσδυσης των κυττάρων του πλακούντα και εκείνης των καρκινικών κυττάρων<sup>12-14</sup>. Όπως τα καρκινικά κύτταρα, έτσι και τα κύτταρα της συγκυτιοτροφολάστης μεταναστεύουν και εισβάλλουν στο τοίχωμα της μήτρας κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης.

Σε αντίθεση, όμως, με την εισβολή των όγκων, η μοναδική αυτή αλληλεπίδραση ανάμεσα στα γενετικά άνομοια κύτταρα της τροφοβλάστης και της μήτρας ρυθμίζεται άμεσα και περιορίζεται χρονικά και χωροταξικά από μηχανισμούς που είναι, κατά μεγάλο μέρος, άγνωστοι. Δεδομένης της εντόπισης της μεταστίνης στα κύτταρα της συγκυτιοτροφολάστης και της δραματικής αύξησης των επιπέδων της στο πλάσμα στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, είναι πιθανόν ότι το πεπτίδιο αυτό εμπλέκεται στο μηχανισμό της διείσδυσης της τροφοβλάστης.

Χαμηλά επίπεδα μεταστίνης έχουν βρεθεί και στο

πλάσμα ανδρών και μη εγκύων γυναικών. Το εύρημα αυτό ενισχύει την άποψη ότι η μεταστίνη παράγεται και από μη πλακουντικούς ιστούς και ενδέχεται να παίζει κάποιο ρόλο και εκτός εγκυμοσύνης. Έτσι, το m-RNA του Kiss-1 εκφράζεται στο πάγκρεας, στην υπόφυση και στα λευκά αιμοσφαίρια, μολονότι το επίπεδο έκφρασης του m-RNA στους ιστούς αυτούς είναι χαμηλότερο από εκείνο του πλακούντα<sup>1,5,6</sup>.

Έχει αναφερθεί ότι σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείψεις του γονιδίου του GPR54 παρατηρούνται σε ασθενείς με οικογενείς μορφές ιδιοπαθούς υπογοναδοτροπικού υπολειπόμενου χαρακτήρα<sup>15,16</sup>. Αντίστοιχο κλινικό σύνδρομο αναπαράχθηκε σε μοντέλα ποντικών με null μεταλλάξεις του γονιδίου του GPR54<sup>16,17</sup>. Φαίνεται, λοιπόν, ότι το σύστημα Kiss-1/GPR54 ασκεί σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης ή και της λειτουργίας του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες. Έτσι, η μεταστίνη θεωρήθηκε ως ένας νέος ρυθμιστικός παράγοντας της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο και της απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών από την υπόφυση<sup>18-20</sup>.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), που χαρακτηρίζεται από χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και υπερανδρογοναιμία, αποτελεί, ενδεχομένως, την πιο συχνή ενδοκρινική διαταραχή στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας<sup>21,22</sup>. Οι γυναίκες με PCOS παρουσιάζουν διαταραχή στην έκκριση των γοναδοτροπινών<sup>21,23-28</sup>. Η πιο συχνή παρέκκλιση που παρατηρείται είναι η αύξηση της σχέσης της LH προς την FSH, που ονομάστηκε από ορισμένους ερευνητές «γοναδοτροπικός διαχωρισμός»<sup>26</sup> και οφείλεται στην αύξηση της έκκρισης της LH<sup>23-28</sup>. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε σε διαταραχές τόσο της βασικής όσο και της παλμικής έκκρισης της LH<sup>29</sup>. Μολονότι ορισμένοι ερευνητές<sup>21</sup> θεώρησαν την αύξηση των επιπέδων της LH χαρακτηριστική του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών, δε συμπεριλήφθηκε στα κριτήρια ορισμού του συνδρόμου<sup>30,31</sup>.

Έχει αναφερθεί ότι η μεταστίνη διεγείρει την έκκριση της LH<sup>18-20,32</sup>. Έχει, ακόμη, αναφερθεί ότι η παραγωγή μεταστίνης ρυθμίζεται αρνητικά από την τεστοστερόνη<sup>32</sup>. Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό: α) την εκτίμηση των επιπέδων της μεταστίνης πλάσματος σε γυναίκες με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και σε μάρτυρες, κατά τη διάρκεια της πρώιμης παραγωγικής φάσης του κύκλου, και, β) την αναζήτηση ενδεχόμενης συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές της μεταστίνης πλάσματος και στις ορμονικές και μεταβολικές παραμέτρους του συνδρόμου.

### Άτομα που μελετήθηκαν και μέθοδοι

Μελετήθηκαν 56 γυναίκες με PCOS (ομάδα I), ηλικίας 15-37 ετών (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα: 23,97 ± 0,65 έτη), οι οποίες προσήλθαν στο Εξωτερικό Ιατρείο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας με ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω συμπτώματα και σημεία: ολιγομηνόρροια, πρόβλημα γονιμότητας, υπερτρίχωση, ακμή και απόπτω-

**Πίνακας 1.** Ανθρωπομετρικά, ορμονικά και μεταβολικά στοιχεία των γυναικών των δύο ομάδων που μελετήθηκαν (Μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα, στατιστική σημαντικότητα)

Παράμετροι	PCOS (Ομάδα I, n=56)	Μάρτυρες (Ομάδα II, n=24)	p
Ηλικία (έτη)	23,97±0,65	26,50±0,91	<0,05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,82±0,89	27,03±1,53	ns
W/H	0,80±0,01	0,78±0,01	ns
FSH (mIU/ml)	6,03±0,22	6,30±0,47	ns
LH (mIU/ml)	12,77±1,25	5,18±0,46	<0,001
PRL (ng/ml)	14,91±1,18	12,90±1,14	ns
T (ng/dl)	83,86±3,26	40,78±1,79	<0,001
FAI	11,22±1,06	2,89±0,21	<0,001
Δ <sub>4</sub> A (ng/ml)	3,02±0,13	1,57±0,10	<0,001
DHEA-S (μg/ml)	2,62±1,40	1,83±1,34	<0,001
17α-υδροξυπρογεστερόνη (ng/ml)	1,23±0,08	0,64±0,04	<0,001
SHBG (nmol/l)	33,84±2,35	55,34±4,88	<0,001
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	95,91±1,76	94,00±2,64	ns
Ινσουλίνη νηστείας (μIU/ml)	12,25±0,92	9,63±1,23	ns
Λόγος γλυκόζης προς ινσουλίνη	10,83±0,90	12,21±0,94	ns
HoMA-IR	2,95±0,25	2,34±0,35	ns
<b>Μεταστίνη (fmol/ml)</b>	<b>0,2846±0,0140</b>	<b>0,3409±0,0337</b>	<b>ns</b>

ση των τριχών της κεφαλής ανδρικού τύπου. Επιπλέον, εκτιμήθηκαν 24 εθελόντριες (ομάδα II), ηλικίας 18-31 ετών (26,50±0,91 έτη), με φυσιολογικούς ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους, διάρκειας 28±2 ημερών (προγεστερόνη ορού>10 ng/ml σε δύο συνεχόμενους εμμηνορρυσιακούς κύκλους), χωρίς βιοχημική ή κλινική υπερανδρογοναιμία (μάρτυρες). Συνολικά μελετήθηκαν 80 γυναίκες (πίνακας 1). Καμία από τις γυναίκες δεν παρουσίαζε γαλακτόρροια και συστηματικές ή άλλες παθήσεις, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία του γεννητικού άξονα. Επίσης, καμία γυναίκα δεν ανέφερε λήψη φαρμάκων το τελευταίο εξάμηνο, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες.

Οι 56 γυναίκες με PCOS κατατάχθηκαν σε δύο υποομάδες, ανάλογα με την τιμή του δείκτη μάζας σώματος (πίνακας 2). Η πρώτη υποομάδα (Iα) αποτελούνταν από 28 γυναίκες, ηλικίας 15-37 ετών, (24,30±1,18 έτη), με BMI > 25 Kg/m<sup>2</sup> (33,02±0,56 Kg/m<sup>2</sup>). Στη δεύτερη υποομάδα (Iβ) ανήκαν 28 γυναίκες, ηλικίας 20-31 ετών (23,64±0,58 έτη) με BMI < 25 Kg/m<sup>2</sup> (20,63±0,26 Kg/m<sup>2</sup>). Εξάλλου, οι 24 μάρτυρες κατατάχθηκαν και αυτές σε δύο υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα (IIα) περιλάμβανε 13 γυναίκες, ηλικίας 18-31 ετών (26,85±1,06 έτη) με BMI > 25 Kg/m<sup>2</sup> (32,13±1,85 Kg/m<sup>2</sup>), ενώ η δεύτερη (IIβ) 11 γυναίκες, ηλικίας 17-35 ετών (26,09±1,60 έτη) με BMI < 25 Kg/m<sup>2</sup> (21,00±0,32 Kg/m<sup>2</sup>).

Η διάγνωση του PCOS στηρίχθηκε στα κριτήρια που τέθηκαν από το National Institute of Health - National Institute of Child Health and Human Development (NIH-NICHHD) το 1990<sup>30</sup> και αναθεωρήθηκαν από το Rotter-

dam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group το 2003<sup>31</sup>. Οι μάρτυρες ήταν εθελόντριες με φυσιολογικούς ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους, διάρκειας 28±2 ημερών (επίπεδα προγεστερόνης ορού > 10 ng/ml σε δύο συνεχόμενους κύκλους), χωρίς βιοχημική ή κλινική υπερανδρογοναιμία.

Σε όλες τις γυναίκες έγινε αιμοληψία για τον προσδιορισμό των βασικών επιπέδων της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της προλακτίνης (PRL), της τεστοστερόνης (T), της Δ<sub>4</sub>-ανδροστενιδιόνης (Δ<sub>4</sub>A) και της θειικής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA-S<sup>4</sup>). Επιπλέον, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της 17α-υδροξυπρογεστερόνης, της σφαιρίνης που δεσμεύει τις ορμόνες του φύλου (SHBG), της TSH, της FT<sub>4</sub>, της ινσουλίνης, της γλυκόζης και της μεταστίνης.

Οι αιμοληψίες για τον προσδιορισμό των παραπάνω παραμέτρων έγιναν μεταξύ της τρίτης και της έκτης ημέρας αντόματου εμμηνορρυσιακού κύκλου, στις 9 π.μ., ύστερα από ολονύκτια νηστεία. Την ίδια ημέρα έγινε υπερηχογραφικός έλεγχος των έσω γεννητικών οργάνων.

#### Μετρήσεις

Η γλυκόζη του ορού προσδιορίστηκε με την ενζυμική μέθοδο (GOD/POD). Οι τιμές της FSH, της LH, της προλακτίνης, των ανδρογόνων και της 17α-OH-προγεστερόνης προσδιορίστηκαν με τη ραδιοανοσολογική μέθοδο, ενώ οι τιμές της SHBG με την ανοσοραδιομετρική μέθοδο, με τη βοήθεια έτοιμων αντιδραστηρίων, που φέρονται στο εμπόριο με τη μορφή kits (FSH: Radioisotopic Kit, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, California, 926 75, USA. LH: Radioisotopic Kit, Nichols In-

**Πίνακας 2.** Ανθρωπομετρικά, ορμονικά και μεταβολικά στοιχεία των γυναικών των τεσσάρων υποομάδων που μελετήθηκαν (Μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα, στατιστική σημαντικότητα)

Παράμετροι Στατιστική Σημαντικότητα	Ομάδα Ια n = 28 Ια έναντι Ιβ	Ομάδα Ιβ n = 28 Ιβ έναντι Ιβ	Ομάδα Ια n = 13 Ια έναντι Ια	Ομάδα Ιβ n = 11 Ια έναντι Ιβ
Ηλικία (έτη)	24,30 ± 1,18 ns	23,64 ± 0,58 ns	26,85 ± 1,06 ns	26,09 ± 1,60 ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	33,02 ± 0,56 p<0,001	20,63 ± 0,26 ns	32,13 ± 1,85 ns	21,00 ± 0,32 p<0,001
W/H	0,84 ± 0,01 p<0,001	0,76 ± 0,01 ns	0,80 ± 0,02 p<0,05	0,75 ± 0,01 p<0,05
FSH (mIU/ml)	6,02 ± 0,33 ns	6,04 ± 0,30 ns	5,64 ± 0,63 ns	7,10 ± 0,67 ns
LH (mIU/ml)	11,41 ± 1,29 ns	14,14 ± 2,14 p<0,01	4,37 ± 0,60 p<0,001	6,13 ± 0,63 p<0,05
PRL (ng/ml)	12,71 ± 1,52 ns	17,10 ± 1,74 ns	11,23 ± 1,72 ns	14,87 ± 1,25 ns
T (ng/dl)	79,37 ± 3,92 ns	88,34 ± 5,14 p<0,001	41,59 ± 2,74 p<0,001	39,82 ± 3,02 ns
FAI	14,15 ± 1,76 p=0,001	8,29 ± 0,93 p<0,001	3,35 ± 0,28 p<0,001	2,34 ± 0,25 p<0,05
Δ4A (ng/ml)	2,74 ± 0,17 p<0,05	3,29 ± 0,19 p<0,001	1,36 ± 0,11 p<0,001	1,83 ± 0,15 p<0,05
DHEA-S (μg/ml)	2,54 ± 0,22 ns	2,69 ± 0,17 p=0,001	1,88 ± 0,19 p<0,05	1,77 ± 0,19 ns
17α-υδροξυ- προγεστερόνη (ng/ml)	1,15 ± 0,10 ns	1,31 ± 0,11 p<0,001	0,59 ± 0,05 p<0,001	0,69 ± 0,06 ns
SHBG (nmol/l)	24,16 ± 1,83 p<0,001	43,51 ± 3,49 p<0,01	47,55 ± 5,89 p<0,001	64,55 ± 7,40 ns
Γλυκόζη (mg/dl)	98,64 ± 2,59 ns	93,18 ± 2,31 ns	99,54 ± 3,54 ns	87,45 ± 3,06 p<0,05
Ινσουλίνη (μIU/ml)	16,81 ± 1,18 p<0,001	7,70 ± 0,71 ns	11,90 ± 1,98 p<0,05	6,94 ± 0,83 p<0,05
Λόγος γλυκόζης προς ινσουλίνη	6,83 ± 0,60 p<0,001	14,83 ± 1,34 ns	10,70 ± 1,24 p<0,05	13,99 ± 1,28 ns
HoMA-IR	4,16 ± 0,34 p<0,001	1,74 ± 0,15 ns	3,04 ± 0,55 ns	1,51 ± 0,20 p<0,05
<b>Μεταστίνη (fmol/ml)</b>	<b>0,24 ± 0,02 p=0,005</b>	<b>0,33 ± 0,02 ns</b>	<b>0,36 ± 0,05 p=0,05</b>	<b>0,32 ± 0,04ns</b>

stitute Diagnostics, San Juan Capistrano, California, 926 75, USA. PRL: Radioisotopic Kit, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, California, 926 75, USA. T: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA. Δ4A: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA. DHEA-S: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA. 17α-OH προγεστερόνη: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA. SHBG: Immunoradiometric Assay (IRMA) Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA). Τα επίπεδα της ινσουλίνης προσδιορίστηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (Insulin: ELISA Kit, Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Τέλος, η συγγέντρωση της μεταστίνης μετρήθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (Metastin: ELISA kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc, Belmont, CA, USA), ύστερα από εκχύλιση με στήλες sep-columns της εταιρείας Phoenix Peptide (RK-Sepcol-2).

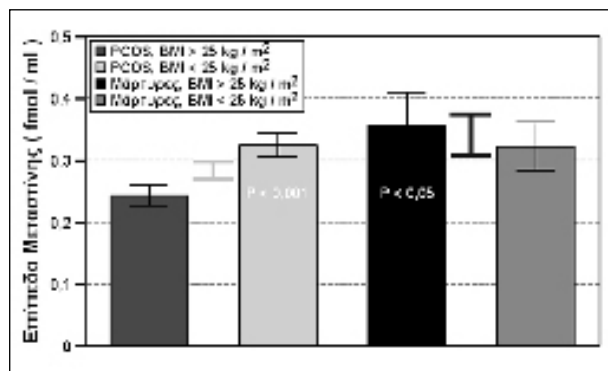
Ο δείκτης ελεύθερων ανδρογόνων (Free Androgen Index: FAI) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση: FAI = T (nmol/l) x 100 / SHBG (nmol/l). Ο δείκτης HoMA-IR υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση: γλυκόζη νηστείας (mmol/l) x ινσουλίνη νηστείας (μIU/ml) / 22,5. Υπολογίστηκε, ακόμη, ο λόγος γλυκόζης (mg/dl) προς ινσουλίνη (μIU/ml) νηστείας.

### Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnoff. Στην τιμές που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν μη-παραμετρικές δοκιμασίες. Η σύγκριση των μέσων όρων των δειγμάτων έγινε με το απλό t-test (παραμετρική δοκιμασία) ή με το Mann-Whitney U-test (μη-παραμετρική δοκιμασία). Οι συσχετίσεις δύο μεταβλητών μεταξύ τους εκτιμήθηκαν με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Pearson (παραμετρική δοκιμασία) ή Spearman (μη-παραμετρική δοκιμασία). Οι ανεξάρτητες συσχετίσεις εκτιμήθηκαν με γραμμική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών (multiple linear regression analysis), ύστερα από λογαριθμική μετατροπή των τιμών, οι οποίες δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οι προσαρμογές για την ηλικία (adjustment for age) έγιναν με ανάλυση γραμμικού μοντέλου (general linear model analysis), ύστερα από λογαριθμική μετατροπή των τιμών που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%. Η επεξεργασία έγινε με το στατιστικό πακέτο λογισμικού SPSS (v.11.5 SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

### Αποτελέσματα

Τα ανθρωπομετρικά, τα ορμονικά και τα μεταβολικά



**Σχήμα 1.** Επίπεδα μεταστίνης πλάσματος στις γυναίκες των τεσσάρων υποομάδων που μελετήθηκαν (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα). Απεικονίζονται, επίσης, οι μέσες τιμές ± σταθερό σφάλμα του συνόλου των γυναικών με PCOS (κόκκινο χρώμα) και του συνόλου των μαρτύρων (μπλε χρώμα). Στατιστική σημαντικότητα έναντι της ομάδας των γυναικών με PCOS και BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>.

χαρακτηριστικά των γυναικών των δύο ομάδων που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον πίνακα 1. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές του BMI ανάμεσα στις γυναίκες των δύο ομάδων. Αντίθετα, οι γυναίκες της ομάδας II είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ηλικία από εκείνες της ομάδας I ( $p < 0,05$ ). Επιπλέον, οι γυναίκες με PCOS (ομάδα I) παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερες τιμές τεστοστερόνης, δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων (FAI), Δ-ανδροστενδιόνης, 17α-υδροξυπρογεστερόνης, DHEA-S και LH και σημαντικά χαμηλότερες τιμές SHBG. Οι μέσες τιμές των υπολοίπων παραμέτρων δε διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις γυναίκες των δύο ομάδων. Οι παραπάνω διαφορές δε μεταβλήθηκαν ύστερα από προσαρμογή για τις τιμές της ηλικίας (adjustment for age). Η μέση τιμή της μεταστίνης στις 56 γυναίκες με PCOS ήταν  $0,2846 \pm 0,0140$  fmol/ml (μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα), ενώ η μέση τιμή του πεπτιδίου αυτού στις μάρτυρες ήταν  $0,3409 \pm 0,0337$  fmol/ml. Μολονότι τα επίπεδα της μεταστίνης ήταν χαμηλότερα στις γυναίκες με PCOS, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0,07$ ).

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά, τα ορμονικά και τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των 80 γυναικών, όπως υποδιαιρέθηκαν σε τέσσερις υποομάδες, με βάση τις τιμές του δείκτη μάζας σώματος. Οι γυναίκες με PCOS (υποομάδες Ia και Ib) εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης, FAI, Δ-ανδροστενδιόνης, 17α-υδροξυπρογεστερόνης, DHEA-S και LH και σημαντικά χαμηλότερες τιμές SHBG, σε σύγκριση με τις μάρτυρες (υποομάδες IIa και IIb αντίστοιχα). Εξάλλου, ο FAI ήταν σημαντικά υψηλότερος στις γυναίκες με BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> (Ia και IIa), σε σύγκριση με τις γυναίκες με BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (Ib και IIb αντίστοιχα). Ακόμη, οι τιμές της Δ-ανδροστενδιόνης ήταν σημαντικά υψηλότερες στις γυναί-

κες με BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (Ib και IIb) από ό,τι στις γυναίκες με BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> (Ia και IIa, αντίστοιχα). Επιπλέον, τα επίπεδα της SHBG των γυναικών της υποομάδας Ia ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα των γυναικών της υποομάδας Ib. Τέλος, τα επίπεδα της LH των γυναικών της υποομάδας IIa ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα των γυναικών της υποομάδας IIb. Οι γυναίκες με PCOS και BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα Ia) είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης και χαμηλότερες τιμές του λόγου γλυκόζης προς ινσουλίνη σε σύγκριση τόσο με τις γυναίκες με το σύνδρομο και BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα Ib), όσο και με τις μάρτυρες με παρόμοιο BMI (υποομάδα IIa). Οι τιμές του δείκτη HoMA-IR ήταν σημαντικά υψηλότερες στις γυναίκες της υποομάδας Ia σε σύγκριση με εκείνες των γυναικών της υποομάδας IIa. Ακόμη, οι τιμές του δείκτη HoMA-IR ήταν σημαντικά υψηλότερες στις μάρτυρες με BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα IIa) σε σύγκριση με εκείνες των μαρτύρων με BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα IIb). Επιπλέον, οι μάρτυρες με BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, σε σύγκριση με τις μάρτυρες με BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>.

Τα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος (σχήμα 1) στις γυναίκες με PCOS και BMI > 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα Ia) ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα των γυναικών με το σύνδρομο και BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> (υποομάδα Ib), και οριακά ελαττωμένα σε σύγκριση με τις μάρτυρες με παρόμοιο BMI (υποομάδα IIa) (πίνακας 2). Οι συγκεντρώσεις του πεπτιδίου αυτού βρέθηκε ότι σχετιζόνταν αρνητικά, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, με το BMI ( $r = -0,319$ ,  $p < 0,005$ ), με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας ( $r^{sp} = -0,305$ ,  $p < 0,01$ ), με το FAI ( $r = -0,276$ ,  $p < 0,05$ ) και με το δείκτη HoMA-IR ( $r = -0,256$ ,  $p < 0,05$ ) και θετικά με τα επίπεδα της SHBG ( $r^{sp} = 0,241$ ,  $p < 0,05$ ) και με το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη ( $r = 0,321$ ,  $p < 0,005$ ). Με γραμμική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών (multiple linear regression analysis) βρέθηκε ότι ο λόγος γλυκόζης προς ινσουλίνη αποτελούσε τον ισχυρότερο ανεξάρτητο παράγοντα για τις τιμές της μεταστίνης (σχήμα 2). Οι διαφορές στα επίπεδα του πεπτιδίου έγιναν μη σημαντικές, ύστερα από προσαρμογή για το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη.

### Συζήτηση

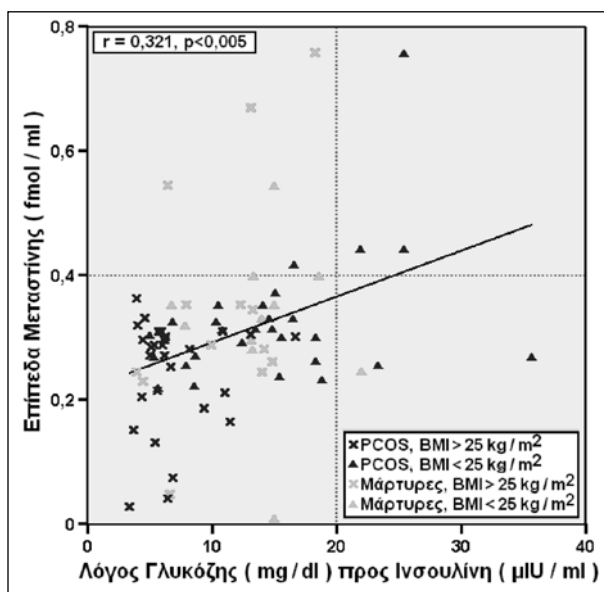
Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό: α) την εκτίμηση των επιπέδων της μεταστίνης πλάσματος σε γυναίκες με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών και σε μάρτυρες, κατά τη διάρκεια της πρώιμης παραγωγικής φάσης του κύκλου, και, β) την αναζήτηση ενδεχόμενης συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές της μεταστίνης πλάσματος και στις ορμονικές και μεταβολικές παραμέτρους του συνδρόμου. Σημειώνεται ότι ανάλογα αποτελέσματα δεν έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σε αρκετές γυναίκες με PCOS, οι τιμές της LH είναι υψηλές, ενώ οι τιμές της FSH βρίσκονται στα κατώτερα όρια της παραγωγικής φάσης<sup>21</sup>. Τα υψηλά επίπεδα της LH οφείλονται σε αύξηση της συχνότητας και του εύρους

των εκκριτικών επεισοδίων της ορμόνης (ένα εκκριτικό επεισόδιο ανά ώρα). Η αύξηση της συχνότητας και του εύρους των εκκριτικών επεισοδίων της LH αποδίδονται σε ανάλογη αύξηση της έκκρισης της εκλυτικής των γοναδοτροπινών, υποθαλαμικής ορμόνης (GnRH). Η έκκριση, δηλαδή, της GnRH είναι συνεχώς ταχεία στις γυναίκες με PCOS<sup>33</sup>. Για πολλά χρόνια έχει αποτελέσει αντικείμενο συζήτησης εάν η αύξηση της συχνότητας και του εύρους των εκκριτικών επεισοδίων της GnRH είναι πρωτοπαθής νευροενδοκρινική διαταραχή ή οφείλεται σε πρωτοπαθή βλάβη της στεροειδογένεσης στις ωοθήκες. Όποια και αν είναι η αιτία της αύξησης της συχνότητας των εκκριτικών επεισοδίων της GnRH, το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση των επιπέδων της LH του ορού, ενώ τα επίπεδα της FSH παραμένουν σταθερά. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την επίδραση της GnRH στην έκφραση των γονιδίων των υπομονάδων των γοναδοτροπινών. Έτσι, τα συχνά εκκριτικά επεισόδια της GnRH ευνοούν την έκφραση του γονιδίου της β-υπομονάδας της LH, ενώ τα αραιά εκκριτικά επεισόδια της υποθαλαμικής αυτής ορμόνης διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου της β-υπομονάδας της FSH<sup>33</sup>.

Ο ρόλος της μεταστίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης ή και της λειτουργίας του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες έγινε εμφανής όταν ανακοινώθηκε ότι σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείψεις του γονιδίου του GPR54 παρατηρούνται σε ασθενείς με οικογενείς μορφές ιδιοπαθούς υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, που κληρονομούνται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα<sup>15,16</sup>. Αντίστοιχο κλινικό σύνδρομο αναπαράχθηκε σε μοντέλα ποντικών με null μεταλλάξεις του γονιδίου του GPR54<sup>16,17</sup>. Φαίνεται, λοιπόν, ότι το σύστημα Kiss-1/GPR54 ασκεί σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης ή και της λειτουργίας του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες. Ο ρόλος της μεταστίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης ή και της λειτουργίας του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο από τρεις μελέτες, που δημοσιεύθηκαν ταυτόχρονα, στις οποίες διαπιστώθηκε η δυνατότητα της μεταστίνης να διεγείρει σημαντικά την έκκριση της LH in vivo<sup>18-20</sup>. Εντούτοις, παραμένει αδιευκρίνιστο εάν η ενδογενής μεταστίνη ρυθμίζει την έκκριση της εκλυτικής των γοναδοτροπινών, υποθαλαμικής ορμόνης (GnRH) και την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών με τρόπο νευρογενή, ορμονικό ή χυμικό. Ενώ, λοιπόν, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διευκρινισθεί ο φυσιολογικός ρόλος της μεταστίνης, το πεπτιδίο αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας νέος ρυθμιστικός παράγοντας της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο και της απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών από την υπόφυση.

Εφόσον η μεταστίνη διεγείρει την έκκριση της LH και οι γυναίκες με PCOS εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα LH (πίνακας 1), θα ήταν αναμενόμενο οι γυναίκες με PCOS να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μεταστίνης.



**Σχήμα 2.** Συσχέτιση των επιπέδων μεταστίνης πλάσματος με τις τιμές του λόγου γλυκόζης προς ινσουλίνη νηστείας στις τέσσερις ομάδες των γυναικών που μελετήθηκαν.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος ήταν χαμηλότερα στις γυναίκες με PCOS, αν και όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Όταν, όμως, οι γυναίκες με PCOS και οι μάρτυρες υποδιαιρέθηκαν με βάση τις τιμές του BMI (πίνακας 2), οι γυναίκες με PCOS και με BMI > 25Kg/m<sup>2</sup> είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεταστίνης πλάσματος από ό,τι οι γυναίκες με PCOS και με BMI < 25Kg/m<sup>2</sup>, αλλά και από ό,τι οι μάρτυρες με παρόμοιο BMI (>25Kg/m<sup>2</sup>). Τα χαμηλότερα επίπεδα μεταστίνης πλάσματος, που παρατηρήθηκαν στις γυναίκες με PCOS και με BMI > 25Kg/m<sup>2</sup>, θα μπορούσαν να αποδοθούν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερων ανδρογόνων που εμφάνιζαν οι γυναίκες αυτές (πίνακας 1), εύρημα που ενισχύεται ακόμη περισσότερο από την αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος και στις τιμές του FAI. Το εύρημά μας αυτό συμφωνεί με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών, που ανέφεραν ότι η παραγωγή μεταστίνης ρυθμίζεται αρνητικά από την τεστοστερόνη<sup>20</sup>.

Το πλέον ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης ήταν η σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της μεταστίνης πλάσματος και στους δείκτες αντίστασης στην ινσουλίνη. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις του πεπτιδίου σχετίζονταν αρνητικά με το δείκτη HoMA-IR, με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας, με το BMI και θετικά με το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη και με τα επίπεδα της SHBG.

Με γραμμική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών (Multiple Regression Analysis), βρέθηκε ότι ο λόγος γλυκόζης

προς ινσουλίνη αποτελούσε τον ισχυρότερο ανεξάρτητο παράγοντα για τις τιμές της μεταστίνης πλάσματος (σχήμα 2). Οι διαφορές στα επίπεδα του πεπτιδίου έγιναν μη σημαντικές ύστερα από προσαρμογή για το λόγο γλυκόζης προς ινσουλίνη. Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν τη θέση ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη, αυξάνοντας τα επίπεδα των ελεύθερων ανδρογόνων, καταστέλλει τα επίπεδα της μεταστίνης. Η αύξηση των ελεύθερων ανδρογόνων από την αντισταθμιστική υπερινσουλιναίμια, λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη, επάγεται με διπλό μηχανισμό, την αύξηση, δηλαδή, της παραγωγής ανδρογόνων από τις ωοθήκες και την ελάττωση της ηπατικής βιοσύνθεσης της SHBG<sup>34,35</sup>.

### Summary

**D. Roussos, A. Kourtis, G. Koliakos, I. Katsikis, D. Farmakiotis, A. Piouka, E. Votsi, E. Altsitsiadis, V. Zournatzi-Koiou, E. Diamanti-Kandarakis, D. Panidis**

**Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome**

**Helen Obstet Gynecol 19(1):64-72, 2007**

Metastin is a novel peptide with putative antimetastatic and LH-releasing activity. Metastin has also been found to be down-regulated by androgens. The present study was designed in order to: a) measure, for the first time, metastin levels in women with polycystic ovary syndrome (PCOS), a condition associated with hyper-secretion of LH and hyperandrogenemia; b) investigate the possible correlations between metastin and PCOS-related reproductive and metabolic disturbances. Twenty eight obese and overweight (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>) women with PCOS, 28 normal-weight (BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>) women with the syndrome and 13 obese and overweight controls (ovulatory women without clinical or biochemical hyperandrogenemia) were selected. Blood samples were collected between the 3rd and the 6th day of a spontaneous bleeding episode of the PCOS groups and a menstrual cycle of the controls, at 09:00 A.M., after an overnight fast. Circulating levels of LH, FSH, PRL, testosterone, Δ<sub>4</sub>-androstenedione, DHEA-S, 17α-OH-progesterone, SHBG, insulin, glucose and metastin were measured. Both normal-weight women with PCOS and obese controls were less insulin resistant and had significantly higher metastin levels, compared to obese and overweight women with the syndrome. Plasma metastin levels were negatively correlated with Body Mass Index (BMI), free androgen index and indices of insulin resistance. These results indicate that metastin is down-regulated as a result of PCOS-associated increase in free androgen levels. Insulin resistance and consecutive hyperinsulinemia contribute to this effect by (a) stimulating androgen synthesis by the polycystic ovary and (b) suppressing Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) produc-

tion in the liver.

**Key words:** Metastin, insulin resistance, PCOS, Free Androgen Index.

### Βιβλιογραφία

- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411:613-7.
- Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T et al. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:958-63.
- Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Burch HB, Schuppert F, Burman KD et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2399-404.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1731-7.
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276:34631-6.
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 276:28969-75.
- Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 1997; 57:2384-7.
- Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1379-83.
- Sanchez-Carbayo M, Capodici P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 2003; 162:609-17.
- Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S et al. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:914-9.
- Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological in-

- sion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 2004; 117:1319-28.
12. McMaster MT, Bass KE, Fisher SJ. Human trophoblast invasion. Autocrine control and paracrine modulation. *Ann NY Acad Sci* 1994; 734:122-31.
  13. Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17:275-90.
  14. Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion—a review. *Placenta*, 2000; 21:S55–S60.
  15. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100:10972-6.
  16. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349:1614-27.
  17. Funes S, Hendrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:1357-63.
  18. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004; 145:4073-7.
  19. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320:383-8.
  20. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE et al. Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and its putative receptor GPR54 in Rat Hypothalamus and Potent LH Releasing Activity of KiSS-1 Peptide. *Endocrinology* 2004; 145:4565-74.
  21. Lobo RA. What are the key features of importance in polycystic ovary syndrome? *Fertil Steril* 2003; 80:259-61.
  22. Lord MJ, Flight IK, Norman RJ. Metformin in polycystic syndrome: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2003; 327:951-6.
  23. Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Bergiele A, Filandra F, Tsianateli T, Spina G et al. A survey of the PCOS in the Greek island of Lesbos: Hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4006-11.
  24. Rebar R, Judd HL, Yen SSC, Rakoff J, Vendenberg G, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1976; 57:1320-9.
  25. Lobo RA, Kletzky OA, Campeau JD, di Zerega GS. Elevated bioactive luteinizing hormone in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1983; 39:674-8.
  26. Anttila L, Ding Y-Q, Ruutiainen K, Erkkola R, Irjala K, Huhtaniemi I. Clinical features and circulating gonadotropin, insulin and androgen interactions in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril* 1991; 55:1057-61.
  27. Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rouso D, Koliakos G. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, 2003; 18:1790-6.
  28. Panidis D, Koliakos G, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rouso D. Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:361-6.
  29. Ropelato MG, Garcia-Rudaz MC, Castro-Fernandez C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M et al. Both basal and pulsatile LH in adolescents with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84:4629-36.
  30. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GE, eds. *Hershman SM, series ed. Polycystic Ovary Syndrome. Current Issues in Endocrinology and Metabolism.* Boston: Blackwell, 1992:377-84.
  31. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19:41-7.
  32. Colledge WH. GPR54 and puberty. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:448-53.
  33. Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA et al. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:582-590.
  34. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985; 6:400-20.
  35. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:83-9.