

HISTORY OF GONADOTROPIN USE IN CONTROLLED OVARIAN STIMULATION IN PROCESS OF *IN VITRO* FERTILIZATION

ISTORIJAT PRIMENE GONADOTROPINA U KONTROLISANOJ OVARIJALNOJ STIMULACIJI U POSTUPKU VANTELESNE OPLODNJE

Jovana Radaković Ćosić^{1,2}, Željko Miković^{1,2}, Milan Perović^{1,2,3}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Beograd, Srbija

Correspondence: radakovic.jovana@gmail.com

Abstract

Gonadotropins are essential hormones for the reproductive health of women. This mini-review paper aims to provide historical facts related to developing and applying gonadotropins in reproductive medicine. The chronology of discoveries from the first hCG test and the isolated hormones FSH and LH up to synthesizing recombinant FSH drugs is presented. Knowledge of the history of the development of commercial gonadotropins, which are used nowadays in the process of in vitro fertilization, allows us to comprehend the complexity of human reproduction procedures and provides an incentive for the occurrence of new technologically advanced methods that include the application of genetic engineering.

Keywords:

gonadotropins,
history,
discovery,
infertility

Sažetak

Gonadotropini su hormoni neophodni za ostvarivanje reproduktivne funkcije žene. Ovaj pregledni rad ima za cilj da pruži osnovne faktografske i istorijske činjenice vezane za razvoj i primenu gonadotropina u medicini. Prikazana je hronologija otkrića, počev od prvog hCG testa i izolovanih folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) do sinteze rekombinantnih FSH lekova. Poznavanje istorijata razvoja komercijalnih gonadotropina, koji se danas koriste u procesu vantelesne oplodnje, omogućava nam sagledavanje složenosti procedura humane reprodukcije i daje podstrek za nastanak novih tehnoloških naprednih metoda koje podrazumevaju i primenu genetskog inženjeringa.

Ključne reči:

gonadotropini,
istorijat,
otkriće,
infertilitet

Uvod

Kontrolisana ovarijalna stimulacija u postupku vantelesne oplodnje podrazumeva primenu egzogenih gonadotropina u cilju rasta i razvoja velikog broja folikula i dobijanja što većeg broja visoko kvalitetnih i zrelih jajnih ćelija (1). Gonadotropini su hormoni neophodni za ostvarivanje reproduktivne funkcije žene i u njih spadaju folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH), koji se sintetišu u hipofizi i humani horionski gonadotropin (hCG) koji stvaraju horion i placenta trudne žene (2).

Otkriće horionskog gonadotropina, luteinizirajućeg i folikulostimulirajućeg hormona

Pronalazak supstance sa sposobnošću stimulacije jajnika vezuje se za Bernharda Zondeka i Selmara Ašhajma (*Aschheim*) jer su je oni još davne 1928. prvi izolovali iz urina trudnih žena (3). Danas znamo da su oni zapravo otkrili hCG i da su potom osmislili prvi test za detekciju trudnoće, tzv. Ašhajm-Zondekov test. Nakon godinu dana Zondek je postavio hipotezu o hipofizi kao žlezdi koja luči dva hormona čija je funkcija da stimulišu gonade. Dve biološke supstance nazvao je prolanima (prolan A i B) i implicirao da su one "*spiritus movens*" svih reproduktivnih funkcija - ključni hormoni za kontrolu gonada i, samim tim, odgovorni za produžetak vrste. Poreklo imena "prolan" potiče od latinske reči "*proles*", što znači "potomak" (4). Već 1930. Zondek je dokazao da krv i urin postmenopauzalnih žena sadrže gonadotropine i otkrio da prolan A stimuliše folikularni rast, a prolan B izaziva ovulaciju i formiranje žutog tela. Prolan A i B zajedno indukuju endometrijalnu transformaciju i promene u vaginalnom epitelu (3). Zondek je već tada opisao odnos hipofize i gonada kakav danas poznajemo. Dinamika lučenja prolana A (koji danas nazivamo FSH) i vreme sekrecije prolana B (koji danas nazivamo LH) odgovorna je za ciklične promene na jajnicima (ovarijalni ciklus), proliferaciju i sekretornu transformaciju endometrijuma (endometrijalni ciklus) i stvaranje optimalnih uslova za implantaciju blastociste. Zondekova hipoteza je definitivno potvrđena 1931. godine ekstrakcijom dva različita hormona hipofize, gde je jedan delovao kao faktor stimulacije folikula, a drugi kao luteinizirajući faktor (5).

Gonadotropini životinjskog porekla

Ubrzo nakon ovih otkrića započelo se sa pravljenjem ekstrakta hipofize domaćih životinja (svinja, ovaca, kobilica, goveda) u cilju lečenja infertilnih žena sa insuficijencijom gonadotropina. Prvi komercijalni animalni gonadotropin za kliničku upotrebu dobijen je iz hipofize svinja. Implementiran je 1930. od strane kompanije *IG Farbenindustrie A-G* iz Leverkusena u Nemačkoj, a kasnije se na tržištu pojavio i komercijalni gonadotropin za kliničku upotrebu dobijen iz hipofize ovaca (4). U sastavu

gonadotropina prirodnog porekla često su prisutni alergeni koji izazivaju stvaranje antitela na gonadotropine životinjskog porekla. Alergijske reakcije su se najčešće javljale nakon davanja gonadotropina dobijenih od gravidnih kobilica i svinja, kada je prvi put i opisana pojava generalizovane alergijske reakcije (6). Zbog ovih neželjenih reakcija i niskih stopa ostvarenih trudnoća primena animalnih gonadotropina je ubrzo obustavljena (7). Skroman uspeh u ostvarivanju trudnoća objašnjen je fenomenom nazvanim "pojava antihormona". Tokom hroničnog lečenja gonadotropnim hormonom životinjskog porekla primećeno je da jajnik održava odgovor na stimulaciju u ograničenom vremenskom periodu, nakon čega odgovor postaje slabiji, dok se u jednom momentu konačno ne izgubi. U *in vivo* i *in vitro* uslovima je pokazano da ova terapija indukuje stvaranje antihormona u krvi, sposobnog za inaktivaciju gonadotropina. Tako je čak nekoliko decenija pre otkrića imunoloških fenomena zapravo opisano stvaranje antitela na životinjske gonadotropine (8).

Postmenopauzalni urinarni humani gonadotropini

Prvi pokušaj ekstrakcije humanih gonadotropina iz urina postmenopauzalnih žena se odigrao 1941. godine, ali su ovaj i brojni drugi pokušaji koji su usledili bili neuspešni. Prva uspešna ekstrakcija humanih gonadotropina iz urina postmenopauzalnih žena izvršena je 1949. godine, a deset godina kasnije su urinarni hCG i humani menopauzalni gonadotropin (hMG) postali dostupni za komercijalnu upotrebu (3). Humani urinarni menopauzalni gonadotropini prečišćavani su i izolovani iz sirovih ekstrakata urina Bredberi i Albert metodama ekstrakcije i koncentracije, koje su koristile kaolin za adsorpciju i aceton za precipitaciju proteina (gonadotropina). Ova jednostavna metoda omogućila je ekstrakciju velikih količina humanih menopauzalnih gonadotropina. Podrazumevala je da se menopauzalni urin pomeša sa kaolinom i suspenzija ostavi da se slegne na sobnoj temperaturi. Potom se suspenzija centrifugira, a nakon uklanjanja supernatanta se rastvor ispitnog uzorka (koji sadrži adsorbovane urinarne proteine, uključujući gonadotropine) ispere, zakiseli do pH 5,5 da bi se potom proteini precipitali acetonom. Nakon ispiranja acetonom, etanolom i etrom talog se tretira dietil-aminoetil celulozom i propušta kroz kolonu permutit hromatografije.



Slika 1. Ekstrakcija gonadotropina iz menopauzalnog urina; desno kolekcija urina, levo filtriranje urina kroz kaolinski kolač (4).

Prvi hMG preparat koji je uveden u kliničku upotrebu nosio je naziv "Pergonal 25 Serono" i registrovan je 22. maja 1950. u Italiji. Tada je u okviru Farmakološkog instituta Serono u Rimu dr Piero Donini proizveo gonadotropin u dozi od 25 jedinica, koji je korišćen za sazrevanje folikula, indukciju ovulacije, spermatogenezu i insuficijenciju žutog tela. Prvi preparati su sadržali različite nivoe FSH, LH i hCG. Pored ovog nedostatka, preparati su sadržali svega 5% hormona u čistoj formi (7, 8). Tehnike korišćene za prečišćavanje preparata su s vremenom unapređivane i, zahvaljujući tome, danas imamo standardizovani odnos svakog gonadotropina (FSH i LH) u odnosu 1:1 i to po 75 IU za svaki tip gonadotropina korišćenjem standardnog in vivo bioeseja pod imenom Stilman-Polijev (*Steelman-Pohley*) esej. Jedna internacionalna jedinica (engl. *international unit* - IU), definiše se kao količina hMG koja ima kapacitet da izazove estrus u prepubertalnoj ženki pacova starosti 28 dana (9).

Zanimljiv je sled događaja nakon uvođenja u kliničku upotrebu prvog hMG preparata Pergonal 25 Serono. Tokom 1953. je hMG uspešno upotrebljen za ovarijalnu stimulaciju hipofizektomiranih ženki pacova (9). Bruno Lunenfeld je izvodio ogled na prepubertalnim mišicama, koje još nisu počele da ovuliraju, ubrizgavajući im urin postmenopauzalnih žena, koji je sakupljen pre i posle tretmana žena estrogenima. Zapazio je da urin postmenopauzalnih žena nelečenih estrogenom indukuje ovulaciju mišica, što je sugerisalo i da urin takvih žena sadrži supstancu koja stimuliše gonade (10). Tokom 1953. godine, uz svesrdnu pomoć svog mentora, profesora Huberta de Vatieva (*Hubert de Watteville*), Bruno Lunenfeld je u Ženevi organizovao sastanak velikog broja naučnika koji su tom prilikom razmenjivali informacije i koordinisali istraživačke aktivnosti vezane za proučavanje gonadotropina (10). Tada je oformljen klub naučnika nazvan *G-Club*, a među osnivačima ovog kluba su se našli čuveni lekari i naučnici Egon Dičfalusi (*Egon Diczfalusy*), Džim Braun (*Jim Brown*) i Džon Loren (*John Loraine*). Prvi zajednički naponi G-kluba rezultirali su dvema publikacijama, kolaborativnim esejima o dva urinarna preparata humanog hipofiznog gonadotropina i o dva gonadotropinska preparata humanog postmenopauzalnog urina (11,12). Nadovezujući se na zapažanje da postmenopauzalne žene sintetišu veće količine gonadotropina, Bruno Lunenfeld je želeo da prečisti velike količine ovog jedinjenja i da ga koristi za izazivanje ovulacije kod žena sa amenorejom. U međuvremenu, loši rezultati prodaje komercijalnog gonadotropina Pergonal 25 Serono, usled njegovih slabih rezultata u lečenju, doveli su do toga da kompanija zaustavi dalji razvoj preparata. Međutim, dr Piero Donini je pročitao Lunenfeldov rad i 1957. ga je pozvao u Rim da bi svoj rad predstavio Izvršnom odboru kompanije Serono. Članovi Izvršnog odbora su potom diskutovali o komplikovanom načinu prikupljanja i obrade velikih količina urina. Sastanku je prisustvovao i Frančesko Pačeli, koji je, uprkos skepticizmu većine članova Izvršnog odbora, narednih deset dana ugostio Lunenfelda u Rimu i za to vreme sa njim razgovarao o

idejama i pristupu u generisanju postmenopauzalnih gonadotropina. Kako je Pačelijev ujak bio papa Pio XII, katolička crkva se obavezala da obezbedi velike količine urina časnih sestara u postmenopauzi. Ovo je omogućilo da se hMG pročisti i izoluje (10). U engleskom gradu Birmingemu 1955. održan je drugi sastanak G-kluba, na kome je dr J. Dekanski (*J. Dekansky*) iz Organon laboratorije Univerziteta u Edinburgu u Škotskoj donirao veliku seriju kaolinskog ekstrakta iz urina u menopauzi (hMG 20) koja je određena kao laboratorijski standard. Doktor Bort (*Borth*) je sa saradnicima opisao prelazak sa životinjskih jedinica na izražavanje rezultata u odnosu na referentne preparate. Jedinica je prvobitno definisana u odnosu na referentne preparate hMG 20, hMG 20a i hMG 24 (13,14). Do 1959. većina referentnog preparata hMG 24 je upotrebljena, a dr Dekanski nije mogao da stavi na raspolaganje prvobitno dogovorenu količinu. Dr Piero Donini iz kompanije Serono je tada bio spreman da donira 50g preparata „Pergonal 23“, pa je ovaj materijal postao „Međunarodni referentni preparat“ (IRP-hMG) za kvantifikaciju hMG. Potom su započeta klinička ispitivanja sa hMG preparatima, čija čistoća je bila svega 5%. U nedostatku alternative, ove preparate su prihvatile sve regulatorne agencije i celokupna naučna zajednica.

Tokom 1960. upotreba ovih preparata dovela je do željenih promena na endometriju, vaginalnom epitelu i do željene steroidne eksrecije (4). Tokom 1961. primećeno je da je hipogonadotropnim ženama sa amenorejom potrebno 6,8 do 13,6 mg preparata, a u zavisnosti od individualne osetljivosti (120 – 240 mg ekvivalent međunarodnom referentnom preparatu), kako bi stimulisale jajnike da proizvode estrogene (4). Usledila je prva uspešna indukcija ovulacije praćena trudnoćom kod hipogonadotropnih anovulacijskih žena korišćenjem sekvencijalnog protokola "step-up/step-down".

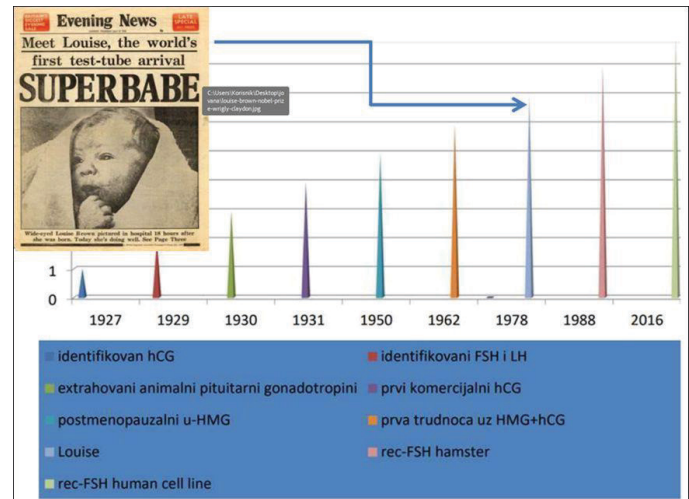
Tokom 1958. Karl Gemzel (*Carl Gemzell*) je izolovao ekstrakt humanih hipofiznih gonadotropina (15). Iako je komercijalni preparat za kliničku upotrebu ubrzo implementiran, njegova upotreba u lečenju infertiliteta nije zaživela iz više razloga. Prvi se odnosio na male količine gonadotropina koji se mogu dobiti na ovaj način, a drugi na pojavu Krojcfeld-Jakobovog (*Creutzfeldt-Jacob*) oboljenja koje se može preneti upotrebom ovih preparata (16). Konačno, hipersenzitivnost i alergijske reakcije opisane su i kod upotrebe ekstrakata humanih gonadotropina iz hipofize (17).

Rekombinantni humani gonadotropini

Sledeći krupan korak u terapiji gonadotropinima bio je stvaranje rekombinantnih humanih gonadotropina. Opšti princip za njihovo dobijanje se oslanja na identifikaciju i odvajanje odgovarajućih proteinskih molekula. Aminokiselinske sekvence alfa i beta subjedinica FSH opisali su Ratnam (*Rathnam*) i Sakena (18), a naknadno je kloniran gen koji kodira molekul FSH (19). U odgovarajućim uslovima ovaj gen se ugrađuje u nuklearnu DNK ćelije domaćina preko plazmidnog

vektora, koristeći spojene DNK nizove koji sadrže FSH gen i segmente bakterijske DNK. Ovim je molekularna biologija omogućila da se FSH gen eksprimira u fibroblastima miša. Ipak, proizvodnja rekombinantnih molekula gonadotropina pokazala se komplikovanom. U početku se tehnologija bazirala na proizvodnji bioloških molekula u bakterijskim ćelijama (obično *Escherichia coli*). Bakterije efikasno proizvode neglikozilovane peptide kao što je insulin, a kvasac je kloniran za proizvodnju određenih vakcina. Međutim, strukturna složenost ljudskih gonadotropina, kao što je FSH, i potreba za posttranslacionom modifikacijom molekula savijanjem i glikozilacijom proteina, učinili su nemogućom funkcionalnu proizvodnju proteina kod prokariota. Mesta i obim glikozilacije određuju tercijarnu strukturu, vreme degradacije, regione molekula izložene receptorima ciljne ćelije i izloženost molekula mehanizmima koji regulišu metabolizam *in vivo* (4).

Ukratko rečeno, rekombinantni preparati se proizvode umetanjem gena koji kodiraju alfa i beta subjediniice FSH u ekspresione vektore koji se transferišu u ćelijske linije jajnika kineskog hrčka (20). Do skora su bila dostupna samo dva rekombinantna preparata FSH, folitropin alfa i folitropin beta. Iako su strukturno identični prirodnom FSH, nazvani su folitropin alfa i folitropin beta jer svaki sadrži jedan alfa i jedan beta glikoproteinski lanac. Ovi različiti lanci glikoproteina nekovalentno su povezani elektrostatičkim i hidrofobnim silama za dve složene strukture ugljenih hidrata. Proces posttranslacione glikozilacije i postupci prečišćavanja ova dva rekombinantna preparata FSH nisu identični. To je rezultiralo različitim sastavima ostataka sijalinske kiseline i, posledično, različitim izoelektričnim koeficijentima. Ipak, ove suptilne razlike u strukturi nisu dovele do razlika u kliničkim performansama (20,21). U međuvremenu su stvoreni i rekombinantni FSH preparati sa produženim delovanjem, kao što je corifolotropin alfa, ali i preparati stvoreni iz ćelijske linije humane retine, kao što je follitropin delta (21). Folitropin delta ima drugačiji farmakokinetički profil od folitropina alfa zbog prisustva veće koncentracije tri- i tetrasijalizovanih glikana i 2,6-vezane sijalične kiseline. Ovo rezultira snažnijim gonadotropnim dejstvom folitropina delta u dozi identičnoj sa folitropinom alfa, što dovodi do većih serumskih koncentracija FSH, jačeg folikularnog odgovora i većih serumskih koncentracija estradiola (22). Istovremeno, lek ima dve osobenosti koje ga čine superiornim u odnosu na druge gonadotropine. Prva je da on ima najbezbedniji profil i njegova primena u kontrolisanoj ovarijalnoj stimulaciji može se smatrati vidom prevencije protiv sindroma ovarijalne hiperstimulacije, opasne i ponekad životno ugrožavajuće komplikacije stimulacije jajnika (22). Druga je da se ovaj lek dozira prema personalizovanom algoritmu doziranja, u zavisnosti od telesne mase pacijenta i njegovog Anti-Müllerovog hormona, kao prediktora rezerve jajnika i prediktora odgovora jajnika na egzogeno date gonadotropine (23).



Slika 2. Hronologija glavnih događaja u razvoju i primeni gonadotropina. Deo slike preuzet iz časopisa *The Evening News*, London, Velika Britanija.

Zaključak

Otkriće gonadotropina omogućilo je shvatanje kompleksnosti i savršenosti procesa involviranih u humanu reprodukciju. Ubrzo su nađeni načini da se gonadotropini upotrebe u lečenju žena sa problemom amenoreje, anovulacija i infertiliteta. Zanimljiv zaplet koji je pratio istorijat razvoja komercijalnih preparata gonadotropina razrešen je sticajem srećnih okolnosti, a razrešenje je omogućilo široku komercijalnu upotrebu već postojećih preparata i dalo zamajac i podsticaj za nastanak novih tehnoloških naprednih metoda koje podrazumevaju i primenu genetskog inženjeringa. Iako se čini da je stvaranjem folitropina delta dostignut vrhunac savršenstva u terapiji gonadotropinima, sigurni smo da će dalji napredak nauke i farmakologije dovesti do narednih dostignuća i sagledavanja novih horizonata.

Literatura

1. Roque M, Bianco B, Christofolini DM, Barchi Cordts E, Vilarino F, Carvalho W, et al. Pharmacogenetic algorithm for individualized controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Panminerva Med.* 2019; 61(1):76-81.
2. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Gonadotropins. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548856>
3. Leão Rde B, Esteves SC. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo).* 2014; 69(4):279-93.
4. Lunenfeld B. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum Reprod Update.* 2004; 10(6):453-67.
5. Fevold SL, Hisaw FL, Leonard SL. The Gonad-stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *Am J Physiol* 1931; 97(2):291-301.
6. Harrison S, Wolf T, Abuzeid MI. Administration of recombinant follicle stimulating hormone in a woman with allergic reaction to menotropin: a case report. *Gynecol Endocrinol.* 2000; 14(3):149-52.
7. Ostergaard E. Incidence and rate of appearance and disappearance of antigonadotrophin in the blood of patients treated with

- pregnant mares' serum gonadotrophin. *Acta Endocrinol* 1964; 45(SUPPL90):235-42.
8. Ostergaard E. Antigonadotrophic substances. Copenhagen: Ejnar Munksgaard; 1942:1-184.
9. Borth R, Lunenfeld B, de Watteville H. Activite gonadotrope d'un extrait d'urines de femmes en menopause. *Experientia*. 1954; 10(6):266-8.
10. Romero R. A profile of Bruno Lunenfeld, MD, FRCOG, FACOG (hon). *Am J Obstet Gynecol*. 2018; 219(3):225-34.
11. Albert A, Borth R, Diczfalusy E, Loraine JA, Lunenfeld B, McArthur JW, et al. Collaborative assays of two urinary preparations of human pituitary gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1958; 18(10):1117-23.
12. Benz F, Borth R, Brown PS, Crooke AC, Dekanski JB, Diczfalusy E, et al. Collaborative assay of two gonadotrophin preparations from human postmenopausal urine. *J Endocrinol*. 1959; 19:158-63.
13. Borth R, Diczfalusy E, Heinrichs HD. Grundlagen der statistischen Auswertung biologischer Bestimmungen. *Arch Gynaecol*. 1957; 188(6):497-538.
14. Borth R, Lunenfeld B, Watteville de H. Le dosage des gonadotrophins—méthode et intérêt clinique. *Bull Soc Belge Gynaecol Obstet*. 1957; 27:639.
15. Gemzell CA, Diczfalusy E, Tillinger G. Clinical effect of human pituitary follicle stimulating hormone (FSH). *J Clin Endocrinol Metab*. 1958; 18(12):1333-48.
16. Lazarus L. Suspension of the Australian human pituitary hormone programme. *Med J Aust*. 1985; 143(2):57-9.
17. Sobel DO, Gutai JP, Rabin BS, Mondino BJ, Fireman P. Pituitary cellular hypersensitivity in idiopathic hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1984; 20(3):341-8.
18. Rathnam P, Saxena BB. Primary amino acid sequence of follicle-stimulating hormone from human pituitary glands. I. alpha subunit. *J Biol Chem*. 1975; 250(17):6735-46.
19. Howles CM. Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Hum Reprod Update*. 1996; 2(2):172-91.
20. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertil Steril*. 2008; 90(5 Suppl):S13-20.
21. Rebar RW. The development of human gonadotropins and their use in infertility: a personalized history. *F S Sci*. 2020; 1(2):106-12.
22. Palomba S, Costanzi F, Nelson SM, Besharat A, Caserta D, Humaidan P. Beyond the Umbrella: A Systematic Review of the Interventions for the Prevention of and Reduction in the Incidence and Severity of Ovarian Hyperstimulation Syndrome in Patients Who Undergo In Vitro Fertilization Treatments. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(18):14185.
23. Doroftei B, Ilie OD, Anton N, Marcu OA, Scripcariu IS, Ilea C. A Narrative Review Discussing the Efficiency of Personalized Dosing Algorithm of Follitropin Delta for Ovarian Stimulation and the Reproductive and Clinical Outcomes. *Diagnostics (Basel)*. 2023; 13(2):177.