



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ: ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ι.Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

**ΩΟΘΗΚΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ  
ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ**

**ΙΟΡΔΑΝΗΣ ΜΑΔΕΜΤΖΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7886/1  
Ημερ. Εισ.: 07-12-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιδετικός Κωδικός: Δ  
612.62  
ΜΑΔ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083847

✓

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το μεσοκύκλιο κύμα της LH αποτελεί σταθερό εύρημα του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου και είναι απαραίτητο για την αναπαραγωγική λειτουργία καθώς προκαλεί τη ρήξη και ωχρινοποίηση του ωοθυλακίου. Στη ρύθμιση του κύματος αυτού συμμετέχουν ωοθηκικοί παράγοντες, με την οιστραδιόλη να αποτελεί τον κύριο παράγοντα για την έναρξη του. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί στεροειδικοί και μη στεροειδικοί ωοθηκικοί παράγοντες, που ρυθμίζουν τα χαρακτηριστικά του κύματος της LH, αλλά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με το μηχανισμό τερματισμού του κύματος.

Από την άλλη μεριά, πειράματα σε γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών, έχουν δείξει ότι στην ωχρινική φάση του γεννητικού κύκλου ο αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της ωοθήκης πάνω στην έκκριση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση είναι εντονότερος σε σχέση με την ωοθυλακική φάση, λόγω της έκκρισης της προγεστερόνης. Όσον αφορά όμως στην ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, αν και υπάρχουν αρκετά δεδομένα κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, η ωχρινική φάση δεν έχει επαρκώς μελετηθεί.

Αντικείμενο της παρούσης μελέτης ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών αφ'ενός του τερματισμού του κύματος της LH και αφ'ετέρου του ωοθηκικού ελέγχου της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης των LH και FSH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου.



Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιωάννη Μεσσίνη, ο οποίος μου ανέθεσε την εκπόνηση της διατριβής αυτής καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση, την κατανόηση και την υποστήριξη του καθ'όλη τη διάρκεια του ερευνητικού έργου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας Αθανάσιο Καλλιτσάρη και το Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για τη βοήθεια τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλες τις γυναίκες, οι οποίες συμμετείχαν εθελοντικά στην παρούσα μελέτη.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ωοθήκες είναι οι γεννητικοί αδένες του θήλεος, που εκκρίνουν στεροειδείς αλλά και μη στεροειδείς ορμόνες. Από τις στεροειδείς ορμόνες, η οιστραδιόλη (E2) αποτελεί το κύριο εκκριτικό παράγωγο του ωοθυλακίου και τα επίπεδα της στο αίμα αυξάνουν σταδιακά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Yen, 1991). Η E2 ασκεί διπλή επίδραση στην έκκριση των γοναδοτροφινών, αφ' ενός αρνητική ελαττώνοντας τα βασικά επίπεδα της FSH και της LH και αφ' ετέρου θετική. Η θετική επίδραση της E2 εκδηλώνεται όταν η συγκέντρωση της στο αίμα ξεπεράσει ένα ορισμένο επίπεδο, όπως αυτό συμβαίνει στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου. Αποτέλεσμα της θετικής αυτής επίδρασης (θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης) είναι η εκδήλωση του μεσοκύκλιου γοναδοτροφικού κύματος, που αποτελεί σταθερό εύρημα ενός φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Messinis & Templeton, 1988).

Εκτός από τις στεροειδείς ορμόνες, οι ωοθήκες παράγουν και ορισμένες μη στεροειδείς ουσίες, οι οποίες τουλάχιστον *in vitro* επηρεάζουν την έκκριση της FSH (Burger, 1992). Οι ουσίες αυτές είναι οι δύο μορφές της ινχιμπίνης (inhibin), καθώς και οι ακτιβίνες (activins) και η φολλιστατίνη (follistatin), για τις οποίες όμως δεν είναι γνωστό αν παίζουν φυσιολογικό ρόλο, δηλαδή εάν παρεμβαίνουν στους μηχανισμούς feedback στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Τα τελευταία χρόνια, εκτός από τις ουσίες αυτές, οι οποίες εκλεκτικά επηρεάζουν την έκκριση της FSH, έχουν προκύψει ενδείξεις ότι οι ωοθήκες παράγουν μία ακόμη μη στεροειδή ουσία, η οποία ονομάζεται

παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (gonadotrophin surge attenuating factor - GnSAF) (Messinis & Templeton, 1989). Ο παράγοντας αυτός, τουλάχιστον υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, προκαλούμενης κατόπιν διέγερσης των ωοθηκών με FSH, ελαττώνει την υποφυσιακή απάντηση στη GnRH (Messinis & Templeton, 1989, 1991a; Messinis et al., 1994a, 1996, 1998). Η παρουσία ενός τέτοιου παράγοντα στις περιπτώσεις αυτές (Pappa et al, 1999) δημιουργεί την υπόθεση ότι οι ωοθήκες πιθανόν να παράγουν τον παράγοντα αυτό και στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Εάν κάτι τέτοιο συμβαίνει, τότε θα πρέπει να γίνει δεκτό ότι παράλληλα με την ευαισθητοποιούσα δράση που ασκεί η E2 στην υπόφυση, σε ό,τι αφορά στην επίδραση της GnRH, υπάρχει και μία άλλη δράση ανταγωνιστική της πρώτης ασκούμενη από τον GnSAF. Αυτό δημιουργεί μία ισορροπία, ώστε να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα η έκκριση της LH στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης και να επιτρέπεται η μεγάλη αύξηση της έκκρισης της στο μέσον του κύκλου, οπότε είναι απαραίτητη η παρουσία του κύματος της LH για την ωχρινοποίηση και τη ρήξη του ωοθυλακίου. Μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει ενδείξεις, ότι ο GnSAF πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου κυρίως καθορίζοντας το εύρος του κύματος της LH, δηλαδή της απάντησης της υπόφυσης στο θετικό μηχανισμό feedback της E2 (Messinis et al., 1996, 1998). Ωστόσο, δεν έχει ακόμη πλήρως χαρακτηριστεί αυτός ο παράγοντας.

Σε αρκετές μελέτες έχει δειχθεί η διεγερτική επίδραση της E2 στην έκκριση της LH σε πειράματα, που έχουν διεξαχθεί είτε κατά την ωοθυλακική φάση του

γεννητικού κύκλου είτε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Tsai & Yen 1971; Yen & Tsai, 1972; Leyendecker et al., 1972; Liu & Yen, 1983; Lutjen et al., 1986; Messinis & Templeton, 1990). Μόνη της η προγεστερόνη δεν είναι ικανή να προκαλέσει την έκφραση του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Εάν της χορηγηθεί η χορήγηση οιστρογόνων, η προγεστερόνη επιταχύνει την έναρξη και ενισχύει το εύρος του από την E2 προκαλούμενου κύματος της LH (Liu & Yen, 1983; Messinis & Templeton, 1990). Είναι πιθανό η προγεστερόνη να ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH καθώς η χορήγηση του αντιπρογεσταγόνου μifeπριστόνη σε φυσιολογικές γυναίκες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της υποφυσιακής απάντησης στη GnRH (Kazem et al., 1996).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τόσο η έναρξη όσο και το εύρος του μεσοκύκλιου κύματος της LH εξαρτώνται από τα ωοθηκικά στεροειδή, αν και ο GnSAF μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο (Messinis, 2003). Ωστόσο, ο μηχανισμός, ο οποίος ευθύνεται για τον τερματισμό του από την E2 κύματος της LH, δεν είναι γνωστός. Η εξάντληση των εφεδρειών της υπόφυσης αποτελεί μία πιθανότητα, αλλά αυτό δεν έχει ακόμη διερευνηθεί. Μία άλλη πιθανότητα είναι η αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης στην κυκλοφορία μετά από την έναρξη του κύματος της LH κατά το μέσον του κύκλου να συμμετέχουν στον τερματισμό του κύματος, σύμφωνα με πειράματα σε γυναίκες που περιλάμβαναν την εξωγενή χορήγηση γοναδικών στεροειδών (Messinis & Templeton, 1990). Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος των ενδογενών στεροειδών δεν έχει ακόμη μελετηθεί.

Η παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό:

1. Τη διερεύνηση του ρόλου της ωοθήκης στον τερματισμό του από την E2 προκαλούμενου κύματος της LH, ώστε να αποσαφηνισθούν περαιτέρω οι μηχανισμοί, που ελέγχουν την έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες.
2. Τη διερεύνηση του μηχανισμού, με τον οποίο οι ωοθήκες ελέγχουν την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση των LH και FSH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου.



---

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

1. Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (GnRH)
  - Η έκκριση της GnRH
  - Η ρύθμιση της έκκρισης της GnRH
2. Οι γοναδοτροφίνες
  - Οι δεξαμενές αποθήκευσης των γοναδοτροφινών
  - Κυτταρικοί μηχανισμοί της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης των γοναδοτροφινών.
  - Η έκκριση των γοναδοτροφινών
  - Η ρύθμιση του μεσοκύκλιου κύματος της LH
  - Ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF)

## 1. Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ

### (GnRH)

Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (gonadotrophin releasing hormone-GnRH) (Schally et al., 1971; Matsuo et al., 1971; Burgus et al., 1972) αποτελεί τον υποθαλαμικό εκλυτικό παράγοντα (δεκαπεπτίδιο), που ελέγχει τη βιοσύνθεση των γοναδοτροφινών στην υπόφυση. Εκκρινόμενη στην υποφυσιακή-πυλαία κυκλοφορία φθάνει στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, όπου συνδέεται με τους ειδικούς υποδοχείς της και προκαλεί την έκκριση των γοναδοτροφινών.

### ***Η ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ GnRH***

Ο κύριος έλεγχος της παραγωγής και της έκκρισης των υποφυσιακών γοναδοτροφινών γίνεται από τη GnRH. Φαίνεται όμως ότι η έκκριση της FSH σε σύγκριση με της LH είναι λιγότερο εξαρτημένη από τη GnRH και πιθανόν να εμπλέκονται κάποιοι εκλυτικοί παράγοντες της FSH (Padmanabhan & McNeilly, 2001). Είναι γνωστό ότι για τη φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροφινών απαιτείται η κατά ώσεις έκκριση της GnRH με συγκεκριμένη διακύμανση τιμών συχνότητας και εύρους (Knobil, 1980). Διάφορα πειράματα σε ωθηκεκτομηθέντες πιθήκους, στους οποίους είχε καταστραφεί ο μέσος βασικός υποθάλαμος, έχουν αποδείξει ότι η διακοπτόμενη χορήγηση της GnRH με ρυθμό μιας ώσης ανά ώρα επαναφέρει την έκκριση της FSH και της LH στη μορφή που διαπιστώνεται σε πιθήκους με φυσιολογικούς υποθάλαμους (Belchetz et al., 1978; Nakai et al., 1978), ενώ η αύξηση της

συχνότητας χορήγησης της GnRH από τον φυσιολογικό ρυθμό μίας ώσης ανά ώρα σε 5, 3 ή και 2 ανά ώρα έχει ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων των γοναδοτροφινών σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Belchetz et al., 1978; Wildt et al., 1981). Σε γυναίκες με υποθαλαμική αμηνόρροια η συνεχής ενδοφλέβια έγχυση GnRH δεν μπορεί να διεγείρει τη συνεχή έκκριση γοναδοτροφινών, αλλά η διακεκομμένη χορήγηση της με συχνότητα μία ώση ανά 90 min, επαναφέρει τα επίπεδα των γοναδοτροφινών στο φυσιολογικό (Southworth et al., 1991).

Οι γοναδοτροφίνες εκκρίνονται κατά ώσεις, όπως η GnRH και θεωρείται ότι η μορφή έκκρισης τους αντικατοπτρίζει την αντίστοιχη της GnRH. Πρακτικά όμως, χρησιμοποιείται η μελέτη των ώσεων της LH ως μέθοδος εκτίμησης της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH. Αυτό συμβαίνει γιατί η FSH εμφανίζει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (Reame et al., 1984) και σε πειραματόζωα οι περιφερικές ώσεις της LH σχετίζονται καλύτερα με τις πιο άμεσες μετρήσεις της GnRH στην υποφυσιακή-πυλαία κυκλοφορία (Clarke & Cummins, 1982; Wilson et al., 1984; Levine et al., 1991; Moenter et al., 1991). Η μελέτη των εκκριτικών ώσεων της ελεύθερης α-υπομονάδας των γοναδοτροφινών (FAS) (η οποία έχει πιο μικρό χρόνο ημιζωής σε σχέση με την LH) είναι πιο ακριβής στην εκτίμηση της έκκρισης της GnRH συγκριτικά με την LH (Kourides et al., 1977; Sharpless et al., 1999).

Η συχνότητα των ώσεων της LH είναι μεγαλύτερη αλλά το εύρος τους μικρότερο κατά την ωοθυλακική φάση σε σχέση με την ωχρινική (Filicori et al., 1986), αν και υπάρχει μεγάλη διακύμανση των τιμών τόσο στο ίδιο όσο και σε

διαφορετικά άτομα (Veldhuis et al., 1986). Η πραγματοποίηση πολύ συχνών αιμοληψιών μπορεί να ανιχνεύσει τις αυξημένες συχνότητας ώσεις της LH κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, κατά το μεσοκύκλιο κύμα της LH και μετά την εμμηνόπαυση (Adams et al., 1994, Hall et al., 2000).

### ***Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ GnRH***

Η έκκριση της GnRH εξαρτάται από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δεκαπεπτιδίου με άλλες νευροορμόνες, τις γοναδοτροφίνες και τις ορμόνες των ωοθηκών. Ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους γίνεται με μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (feedback), τόσο θετικών (διεγερτικών) όσο και αρνητικών (ανασταλτικών), οι οποίοι δρουν στη σύνθεση και στην έκκριση της GnRH. Σχηματικά, οι μηχανισμοί αυτοί είναι οι ακόλουθοι: Ο μακρύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (long feedback loop), που αναφέρεται στην επίδραση των κυκλοφορούμενων ορμονών, που παράγονται από τους αδένες στόχους και αφορά τόσο στον υποθάλαμο όσο και στην υπόφυση. Ο βραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (short feedback loop), που υποδηλώνει την αρνητική επίδραση των υποφυσιακών ορμονών πάνω στην έκκριση τους, κυρίως μέσω αρνητικών επιδράσεων στην έκκριση της εκλυτικής υποθαλαμικής ορμόνης. Ο υπερβραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (ultrashort feedback) που αναφέρεται στην αναστολή της σύνθεσης της GnRH από αυτή την ίδια ορμόνη. Συνοπτικά και στα δύο φύλα των θηλαστικών, τα στεροειδή των γονάδων ασκούν καθοριστικές επιδράσεις στη βιοσύνθεση και την έκκριση της GnRH με μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν διάφορους νευρομεταβιβαστές και

νευροπεπτιδία, αν και ο ρόλος πολλών από αυτά δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί (Kaijra, 1993; Herbison, 1998). Ο κατάλογος των παραγόντων, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σύνθεσης και της έκκρισης της GnRH, είναι μεγάλος και παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πρέπει να τονισθεί ότι υπάρχουν πολλές οδοί ρύθμισης της έκκρισης της GnRH, που έχουν αποκαλυφθεί πειραματικά, με διαφορές όμως μεταξύ των διαφόρων ειδών, δυσκολεύοντας έτσι την εξαγωγή συμπερασμάτων από μελέτες σε ένα είδος για κάποιο άλλο είδος χωρίς προηγούμενη επιβεβαίωση. Παράλληλα, φαίνεται ότι στον εγκέφαλο υπάρχουν αντισταθμιστικοί μηχανισμοί, που μπορούν να αναλάβουν τον νευροενδοκρινικό έλεγχο του αναπαραγωγικού κύκλου (Smith & Jennes, 2001).



Νευρομεταβιβαστές	Αυξητικοί Παράγοντες	Άλλες νευροεκκριτικές ουσίες	Στεροειδείς ορμόνες	Πεπτιδία γονάδων
Κατεχολαμίνες: A,NA	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$	PGE2	Οιστρογόνα	Activins
Ντοπαμίνη	FBF	NO	Προγεστίνες	Inhibins
Σεροτονίνη	EGF		Ανδρογόνα	Φολλιστατίνη
Οπιοειδή	IGF-I, IGF-II		Γλυκοκορτικοειδή	
GABA				
Ουσία P				
Νευροτενσίνη				
NPY				
Νευροκίνη Β Νευροπεπτίδιο Κ				
Διεγερτικά αμινοξέα: γλουταμικό οξύ/ασπαρτικό οξύ				
CRH				
Οξυτοκίνη				
VIP				

Πίνακας 2. Παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή της GnRH.

Η αναλυτική αναφορά σε κάθε παράγοντα χωριστά, δεδομένης της τεράστιας σχετικής βιβλιογραφίας, ξεφεύγει από το αντικείμενο της παρούσης μελέτης και θα αναφερθούμε συνοπτικά μόνο στο ρόλο των στεροειδών ορμονών και των πεπτιδίων των γονάδων.

Στο παρελθόν, διάφορες ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι είχαν αποτύχει να ανιχνεύσουν υποδοχείς οιστρογόνων (ER) στους νευρώνες GnRH σε διάφορα είδη (Watson et al., 1992; Herbison et al., 1993; Sullivan et al., 1995),

με αποτέλεσμα να πιθανολογείται ότι η δράση των οιστρογόνων στον υποθάλαμο ασκείται έμμεσα. Ωστόσο, έχουν υπάρξει και μελέτες που αναφέρουν χαμηλά επίπεδα ER αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και σύνδεσης της E2 σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές GnRH (Radovick et al., 1994; Poletti et al., 1994; Rage et al., 1997; Shen et al., 1998). Ο προωθητής (promotor) του γονιδίου της GnRH έχει δειχτεί ότι περιέχει λειτουργικά τμήματα, που απαντούν στα οιστρογόνα (functional estrogen response elements) (Radovick et al., 1994; Klungland et al., 1993). Πιο πρόσφατα, έχει δειχτεί σε φυσικούς GnRH νευρώνες του θήλεος επίμυος η ύπαρξη και η κυκλική έκφραση mRNA τόσο για τους ER- $\alpha$  όσο και για τους ER- $\beta$  (Skynner et al., 1999). Αφ' ετέρου, η χορήγηση οιστρογόνων προκάλεσε μείωση των επιπέδων GnRH mRNA στην κυτταρική σειρά GT1-7, η οποία όπως δείχθηκε με τη χρήση αγωνιστών και ανταγωνιστών των ER ήταν εξαρτώμενη από τους ER (ER- $\alpha$  και ER- $\beta$ ) (Roy et al., 1999). Στην ίδια κυτταρική σειρά, η χορήγηση οιστρογόνων μείωσε το ποσοστό των GnRH νευρώνων, που ήταν θετικοί για την ύπαρξη ER- $\beta$  (Kallo et al., 2001). Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση της άμεσης επίδρασης των οιστρογόνων στους GnRH νευρώνες του υποθαλάμου. Εκτός αυτών, υπάρχουν και ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ασκούν ταχεία μη γονιδιακή δράση σε διάφορους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Schumacher, 1990; McEwen, 1991). Τέτοιου τύπου δράση (άμεση υπερπολωτική) έχει δειχτεί και στους GnRH νευρώνες ωθηκεκτομηθέντων χοίρων (Lagrange et al., 1995). Από όλα τα παραπάνω είναι σαφές ότι η δράση των οιστρογόνων στους GnRH νευρώνες μπορεί να ασκείται άμεσα αλλά και έμμεσα.

Η προγεστερόνη είναι γνωστό ότι ασκεί ανασταλτικές και διεγερτικές επιδράσεις στην έκκριση των γοναδοτροφινών στον άνθρωπο, οι οποίες περιλαμβάνουν και την τροποποίηση της παλμικής έκκρισης της GnRH (Skinner et al., 1998). Ωστόσο, δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη υποδοχέων προγεστερόνης στους GnRH νευρώνες, καθώς η ανοσοαντιδραστικότητα τους είτε δεν έχει ανιχνευτεί (Leranth et al., 1992; Skinner et al., 2001) ή έχει ανιχνευτεί σε πολύ μικρό ποσοστό αυτών των νευρώνων (King et al., 1995). Μια ηλεκτροφυσιολογική μελέτη σε φυσικούς GnRH νευρώνες του θήλεος επίμυος έδειξε ότι η αλλοπρεγνενολόνη, που αποτελεί τον κύριο νευροεκκριτικό μεταβολίτη της προγεστερόνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, προκαλεί άμεση επίδραση στους GnRH νευρώνες (μέσω της αλλοστεροειδικής τροποποίησης των υποδοχέων GABA-A, που υπάρχουν σε αυτούς τους νευρώνες), ενώ αντιθέτως η προγεστερόνη δεν είχε καμία επίδραση (Sim et al., 2001). Οι ίδιοι συγγραφείς προτείνουν ότι η προγεστερόνη μπορεί να έχει τουλάχιστον δύο τρόπους δράσης και ρύθμισης της λειτουργίας του GnRH νευρώνα *in vivo*: μία κλασσική, εξαρτώμενη από τον υποδοχέα της προγεστερόνης, γονιδιακή οδό και μία δεύτερη οδό, όπου μετά την ταχεία μετατροπή της προγεστερόνης σε αλλοπρεγνενολόνη ασκείται η παραπάνω περιγραφείσα άμεση επίδραση.

Στον υποθάλαμο του θήλεος προβάτου έχουν χαρτογραφηθεί και υποδοχείς ανδρογόνων (Scott et al., 2000) εκτός από τους υποδοχείς των άλλων στεροειδών του φύλου. Ωστόσο, η επίδραση των ανδρογόνων στους GnRH νευρώνες δεν έχει διευκρινιστεί.

Στους GnRH νευρώνες του επίμους έχουν βρεθεί υποδοχείς **γλυκοκορτικοειδών** και η ωθηκεκτομία αυξάνει το ποσοστό των θετικών για τους υποδοχείς αυτούς νευρώνων, ενώ η χορήγηση οιστρογόνων στη συνέχεια το μειώνει. Πιθανόν η γνωστή ανασταλτική δράση των χρονίως αυξημένων επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών στην αναπαραγωγική λειτουργία να ασκείται εν μέρει με άμεση επίδραση τους στον GnRH νευρώνα (Ahima & Harlan, 1992).

Οι **ακτιβίνες** (activins) και οι **ινχιμπίνες** (inhibins) είναι διμερείς γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες έχουν κοινή τη β-υπομονάδα. Η ινχιμπίνη είναι ένα ετεροδιμερές μιας ειδικής για την ινχιμπίνη α-υπομονάδας και μιας από τις δύο β-υπομονάδες ( $\beta_A$  ή  $\beta_B$ ), σχηματίζοντας έτσι δύο διαφορετικές ινχιμπίνες: ινχιμπίνη A και ινχιμπίνη B. Οι ακτιβίνες προκύπτουν από το διμερισμό των δύο β-υπομονάδων και υπάρχουν σε 3 διαφορετικές μορφές: ακτιβίνη A ( $\beta_A, \beta_A$ ), ακτιβίνη B ( $\beta_B, \beta_B$ ) και ακτιβίνη AB ( $\beta_A, \beta_B$ ) (Burger, 1992). Οι ορμόνες αυτές είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί, λόγω της ιδιότητας τους να διεγείρουν και να αναστείλουν αντίστοιχα την απελευθέρωση της FSH και είχαν απομονωθεί από τις γονάδες (Ling et al. 1985, 1986, Rivier et al. 1985, Vale et al. 1986). Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι έχουν ευρύτερη κατανομή στον οργανισμό και η παρουσία νευρώνων, που περιείχαν  $\beta_A$  και  $\beta_B$  υπομονάδες στον υποθάλαμο, πιθανολογεί την εμπλοκή τους στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH (Vale et al. 1988). Επίσης, ο υποδοχέας της ακτιβίνης (ActRII) βρέθηκε ότι εκφράζεται σε κύτταρα του υπερχιασματικού, υπεροπτικού, παρακοιλιακού και τοξοειδή πυρήνα (Cameron et al. 1994). Οι Gonzalez-Manchon και συν. (1991) βρήκαν ότι η ακτιβίνη A διεγείρει την απελευθέρωση της GnRH από την

κυτταρική σειρά GT1-7. Σε υποθαλάμους αρρένων επίμυων, η ακτιβίνη A διεγείρει την έκκριση της GnRH, ενώ η ινχιμπίνη εμποδίζει τη δράση της ακτιβίνης A, χωρίς όμως από μόνη της να έχει κάποια επίδραση στην έκκριση της GnRH (Calogero et al., 1998).

## 2. ΟΙ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΕΣ

Οι γοναδοτροφίνες ελέγχουν την παραγωγή των αρρένων και θηλέων γαμετών καθώς και των στεροειδών του φύλου. Περιλαμβάνουν τις υποφυσιακές ορμόνες FSH και LH και την πλακουντιακή ορμόνη χοριακή γοναδοτροφίνη (chorionic gonadotrophin-CG), η οποία παρουσιάζει ομοιότητες με την LH. Στο κεφάλαιο αυτό, θα αναφερθούμε στις υποφυσιακές γοναδοτροφίνες.

### **ΟΙ ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ**

Η επίδραση της GnRH στα γοναδοτρόφα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση των εκκριτικών κοκκίων στην περιφέρεια του κυττάρου και ακολούθως την εξωκυττάρωση. Αρκετές μελέτες τόσο σε πειραματόζωα (Pickering & Fink, 1979; Blake, 1978) όσο και στον άνθρωπο (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976), έδειξαν ότι η χορήγηση της GnRH για αρκετές ώρες προκαλεί ένα διφασικό χρονικά τύπο έκκρισης των γοναδοτροφινών. Η αρχική εκκριτική αιχμή στα 30 min ακολουθείται από μία πτώση ή plateau μεταξύ των 45 και 90 min και αργότερα μία παρατεταμένη αύξηση της έκκρισης στα 220 με 240 min. Από αυτές τις αρχικές μελέτες προέκυψε η θεωρία της ύπαρξης



δύο λειτουργικών δεξαμενών των γοναδοτρόφων. Έχει θεωρηθεί λοιπόν ότι η πρώτη φάση έκκρισης αντιπροσωπεύει μία άμεσα διαθέσιμη μορφή της LH, η οποία μπορεί να εκκριθεί άμεσα κατά τη διέγερση με την GnRH (και αντιπροσωπεύει την ευαισθησία του γοναδοτρόφου στη GnRH) και ότι η δεύτερη φάση αντιπροσωπεύει μία μορφή αποθήκευσης της LH, η οποία απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία πριν γίνει προσιτή για έκκριση. Το φαινόμενο αυτό της αυξημένης δεύτερης απάντησης της LH στη GnRH σε σύγκριση με την πρώτη ονομάζεται αυτοπριμοδότηση της GnRH ή αυτοεπαγωγικό φαινόμενο (GnRH self-priming) και αντιπροσωπεύει τη μετατροπή της λειτουργικά εφεδρικής δεξαμενής των γοναδοτροφινών (second-reserve pool) στη λειτουργικά άμεσα εκκρινόμενη δεξαμενή (first-releasable pool). Κλινικά το φαινόμενο αυτό μπορεί να ανιχνευθεί με την χορήγηση πολλαπλών ώσεων GnRH, ως μία ενισχυμένη απάντηση της LH στη δεύτερη ώση της GnRH, που χορηγείται 2 ώρες μετά την πρώτη ώση (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976). Όπως έχει δειχθεί και προγενέστερα, η απάντηση στην πρώτη δόση της εξωγενούς GnRH είναι μέγιστη στα 30 λεπτά και αυτό αντιπροσωπεύει την ευαισθησία της υπόφυσης, ενώ όλη η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) κατά τη διάρκεια των 240 λεπτών αντιπροσωπεύει τις εφεδρείες της υπόφυσης (Messinis & Templeton, 1991a). Διάφορες in vitro μελέτες συγκλίνουν με τις κλινικές μελέτες καθώς όπως και οι πρώτες δείχνουν ότι η έκκριση της LH σε παρατεταμένη έκθεση στη GnRH είναι διφασική (Evans et al., 1983; Loughlin et al., 1984).

### ***ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ GnRH ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ.***

Υπάρχει μια χρονική συσχέτιση μεταξύ της από τη GnRH προκαλούμενης ενδοκυττάριας απελευθέρωσης ασβεστίου και της έκκρισης της LH και τα δύο αυτά φαινόμενα χαρακτηρίζονται από μια αρχική αιχμή, που ακολουθείται από μία δευτερογενή παρατεταμένη φάση επιπέδωσης. Οι Leong & Thorner (1991) πρότειναν ότι αυτές οι απαντήσεις συνιστούν ένα δυαδικό ενδοκυττάριο σήμα για την έκκριση της LH. Στη μελέτη τους, η διφασική απάντηση του ασβεστίου, που προκλήθηκε από χορήγηση υψηλής δόσης GnRH, σχετιζόταν με απελευθέρωση LH, ενώ οι περιοδικές μεταβολές (oscillations) του ασβεστίου, που προκλήθηκαν από χαμηλή δόση GnRH, σχετιζόταν με αυξημένη έκφραση του γονιδίου της LHβ υπομονάδας και αυξημένο αριθμό υποδοχέων GnRH αλλά όχι με εξωκυττάρωση. Αντιθέτως, οι ταυτόχρονες μετρήσεις της συγκέντρωσης των  $Ca^{++}$  και της εξωκυττάρωσης σε απομονωμένα γοναδοτρόφα κύτταρα έδειξαν ότι ορισμένες διακριτές περιοδικές μεταβολές ασβεστίου από μία ακολουθία προκαλούμενων από τη GnRH συνέπιπταν με την εξωκυττάρωση (Tse et al., 1993). Αν και η διφασική απάντηση του ασβεστίου φαίνεται να αντιπροσωπεύει έναν αποτελεσματικό μηχανισμό ελέγχου της εξωκυττάρωσης της LH, οι περιοδικές μεταβολές του ασβεστίου έχουν το πλεονέκτημα της μειωμένης κυτταρικής τοξικότητας. Όσον αφορά στο ρόλο της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) στη μεσολάβηση της από την GnRH προκαλούμενης εξωκυττάρωσης φαίνεται ότι αυτή εμπλέκεται στην ενίσχυση παρά στην έναρξη της εξωκυττάρωσης (Anderson, 1996).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH (GnRH self-priming) αποτελεί την από τη GnRH προκαλούμενη ευαισθητοποίηση των γοναδοτρόφων σε επόμενη διέγερση με GnRH (Fink, 1995). Σειρές πειραματικών μελετών υποδεικνύουν ότι οι δυνητικοί υποκείμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν μεταβολές στον αριθμό των υποδοχέων της GnRH, στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς αυτούς και τις γοναδοτροφίνες καθώς και αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, παρέχοντας τη δυνατότητα στα εκκριτικά κοκκία να μετακινηθούν από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη. Το φαινόμενο αυτό *in vitro* σχετίζεται με τη μετανάστευση και την επακόλουθη τοποθέτηση των εκκριτικών κοκκίων σε περιοχές υπό την κυτταρική μεμβράνη σε ολόκληρο το γοναδοτρόφο κύτταρο (Fink, 1995). Παρομοίως, πειράματα στο πρόβατο *in vivo* δείχνουν ότι μία μόνο ομάδα εκκριτικών κοκκίων μεταναστεύει και ακολούθως τοποθετείται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, που είναι πλησίον στο αγγειακό σύστημα και η μετανάστευση αυτή διεγείρεται από την E2 (Cunnie & McNeilly, 1995). Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί από τη GnRH προκαλούμενες επιμηκύνσεις και μεταβολές στον προσανατολισμό των κυτταρικών μικροϊνιδίων (Lewis et al., 1985). Τέτοιες κυτταροσκελετικές μεταβολές μπορεί να περιλαμβάνουν την από τη GnRH προκαλούμενη διέγερση της δραστηριότητας της PKC και της MAP κινάσης, καθώς η φωσφορυλίωση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και από τις δύο κινάσες έχει συσχετισθεί με την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού (Hartwig et al., 1992).

Η αυξημένη ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH έχει επίσης συσχετισθεί με μεταβολές στον αριθμό των υποδοχέων της GnRH σε κρίσιμους χρόνους κατά τη διάρκεια του κύκλου στον επίμου (Savoy-Moore et al., 1980). Η προς τα άνω ρύθμιση (up-regulation) των υποδοχέων της GnRH κατά το χρόνο του προωοθυλακιωρρηκτικού κύματος της LH αντικατοπτρίζει παράλληλες μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου τους (Brooks & McNeilly, 1994). Η ενισχυμένη γονιδιακή έκφραση σχετίζεται με επιδράσεις της E2, που ασκούνται άμεσα στα γοναδοτρόφα ή έμμεσα μέσω της υποθαλαμικής οδού, πιθανόν επηρεάζοντας την έκκριση της GnRH. Ο αυξημένος αριθμός των υποδοχέων της GnRH κατά το χρόνο του προωοθυλακιωρρηκτικού κύματος της LH θα μπορούσε να ενισχύσει την ευαισθησία του γοναδοτρόφου στη GnRH, προκαλώντας έτσι την έναρξη μίας διφασικής, παρά μίας απάντησης με περιοδικές μεταβολές του ασβεστίου, ικανής για απελευθέρωση της LH από τα προετοιμασμένα κοκκία στην κυτταρική μεμβράνη. Επιπρόσθετα, η GnRH διεγείρει και αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου της γοναδοτροφίνης τόσο in vivo όσο και in vitro. Η κατά ώσεις επίδραση της GnRH μπορεί να προκαλέσει έκφραση των γονιδίων των LHβ και FSHβ υπομονάδων. Αντιθέτως, η χρόνια έκθεση στη GnRH προκαλεί προς τα κάτω ρύθμιση (down-regulation) της έκφρασης των γονιδίων των LHβ και FSHβ και εμποδίζει την αύξηση του mRNA, που κωδικοποιεί την α υπομονάδα και την LHβ μετά τη γοναδεκτομία. Παράλληλες διεγερτικές και ανασταλτικές επιδράσεις στις κυκλοφορούσες και στις υποφυσιακές συγκεντρώσεις της LH και της FSH έχουν επίσης παρατηρηθεί. Δεδομένου ότι λειτουργικά τμήματα που απαντούν στο cAMP υπάρχουν στο γονίδιο της α υπομονάδας, οι από τη GnRH προκαλούμενες αυξήσεις στο cAMP μπορεί να τροποποιούν την

έκφραση του γονιδίου της  $\alpha$  υπομονάδας. Οι μηχανισμοί, που εμπλέκονται στη διέγερση της έκφρασης της  $\beta$  υπομονάδας, είναι λιγότερο ξεκάθαροι αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν τη διέγερση της PKC (Anderson, 1996).

Η E2 έχει πολλαπλές επιδράσεις στην έκκριση της LH. Η αρχική έκθεση στην E2 προκαλεί καταστολή της έκκρισης της LH, η οποία ακολουθείται από σύντομη αλλά εκσεσημασμένη διέγερση. Η χρόνια καταστολή παρατηρείται επί συνεχούς παρουσίας της E2 (Karsch, 1987). Στα γοναδοτρόφα κύτταρα η E2 μειώνει τον αριθμό των υποδοχέων της GnRH και την αποτελεσματικότητα της φωσφολιπάσης C (PLC) ως δεύτερου αγγελιοφόρου (McArdle et al., 1992). Όσον αφορά στην FSH, η E2 μειώνει την έκκριση της κυρίως μέσω μείωσης της σύνθεσης της (Marshall et al., 1983).

Η ενίσχυση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH από την προγεστερόνη απαιτεί την προηγούμενη έκθεση στα οιστρογόνα. Έχει θεωρηθεί ότι η ενδοκυττάρια επικοινωνία μεταξύ των υποδοχέων GnRH και των υποδοχέων προγεστερόνης προάγει την ανεξάρτητη από την προγεστερόνη ενεργοποίηση (transactivation) του υποδοχέα της προγεστερόνης (Turgeon & Waring, 1992, 1994). Ενδοκυττάριας οδοί μετάδοσης του σήματος που περιλαμβάνουν είτε την PKC είτε την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) (Turgeon & Waring, 1994), οι οποίες φωσφορυλιώνουν ενδιάμεσες πρωτεΐνες ή μεταγραφικούς παράγοντες, μπορεί να μεσολαβούν για αυτή την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η προγεστερόνη επίσης μεταβάλλει τη μορφή και το μέγεθος των από την GnRH προκαλούμενων σημάτων του ασβεστίου στα γοναδοτρόφα (Ortmann et al., 1994). Η χορήγηση προγεστερόνης



μετατρέπει τις από τη GnRH προκαλούμενες περιοδικές μεταβολές του ασβεστίου σε διφασικό σήμα ασβεστίου και στην κυτταρική σειρά T3-1 το εύρος και των δύο φάσεων της διφασικής απάντησης του ασβεστίου είναι αυξημένο. Στο τέλος του κύματος της LH, η προγεστερόνη ή δεν έχει καμία επίδραση ή εμποδίζει την ποσότητα του mRNA (Yasin et al., 1995).

Τα γοναδοτρόφα κύτταρα ακόμη και στερημένα από την επίδραση της GnRH συνεχίζουν να εκκρίνουν FSH (Farnworth, 1995). Αυτή η ανεξάρτητη από την GnRH έκκριση περιλαμβάνει τις ρυθμιστικές της FSH πρωτεΐνες, που είναι η ακτιβίνη, η ινχιμπίνη και η φολλιστατίνη. Τόσο η αποθηκευμένη όσο και η εκκρινόμενη FSH αυξάνουν με την επίδραση της ακτιβίνης (Schwall et al., 1988; Carroll et al., 1989), ενώ η ινχιμπίνη εκλεκτικά μειώνει το mRNA που κωδικοποιεί την FSHβ (Carroll et al., 1989) και η φολλιστατίνη συνδέεται με την ακτιβίνη με υψηλή συγγένεια (Kogawa et al., 1991).

## ***Η ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ***

### ***Η κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροφινών***

Όπως έχει προαναφερθεί, υπάρχουν πολλά δεδομένα που δείχνουν ότι η έκκριση των γοναδοτροφινών γίνεται κατά ώσεις, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τη συχνότητα των ώσεων του GnRH βηματοδότη, ενώ το εύρος τους καθορίζεται από την ποσότητα της GnRH, που φθάνει στα γοναδοτρόφα και την ευαισθησία αυτών κυττάρων. Η ευαισθησία των γοναδοτρόφων ρυθμίζεται

τόσο από το νευρικό σήμα όσο και από το ορμονικό περιβάλλον, που προκύπτει από την εκκριτική δραστηριότητα των γονάδων.

Η μελέτη των ώσεων των γοναδοτροφινών δεν είναι απλή και τα αποτελέσματα των διαφόρων βιομαθηματικών τεχνικών ανίχνευσης των ώσεων εξαρτώνται από τα μεσοδιαστήματα των αιμοληψιών, καθώς για παράδειγμα απαιτούνται πιο συχνές αιμοληψίες για την ανίχνευση των υψηλότερης συχνότητας ώσεων των γοναδοτροφινών κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, κατά το χρόνο του μεσοκύκλιου κύματος της LH και μετά την εμμηνόπαυση (Hall et al., 2000; Adams et al., 1994). Επίσης, οι τεχνικές αυτές είναι πιο αξιόπιστες όταν δεν μελετούν μόνο τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της γοναδοτροφίνης στην κυκλοφορία με το χρόνο (conventional pulse analysis), αλλά συνυπολογίζουν και τη μεταβολική κάθαρση της ορμόνης (όμως απαιτούν ως σταθερή παράμετρο την εκ των προτέρων γνώση του χρόνου ημιζωής), οπότε τελικά εκτιμούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα χαρακτηριστικά της έκκρισης της (deconvolution pulse analysis). Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες μαθηματικές τεχνικές, που επιτρέπουν την ταυτόχρονη εκτίμηση και του χρόνου ημιζωής της ορμόνης ως «συγχυτικού» παράγοντα της ανάλυσης των ώσεων. Τα δεδομένα, που προέκυψαν από μία τέτοια μέθοδο ανίχνευσης ώσεων, ανεξάρτητης δηλαδή από το χρόνο ημιζωής της ορμόνης (multiple parameter deconvolution), παρουσιάζονται στον πίνακα 2 (Sollenberger et al., 1990a). Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που χρησιμοποιούσαν τη συμβατική μέθοδο ανίχνευσης των ώσεων (McIntosh & McIntosh, 1985), ο αριθμός των εκκριτικών ώσεων της LH βρέθηκε να είναι ο μέγιστος κατά την όψιμη

ωοθυλακική φάση, ο ελάχιστος κατά τη μέση ωχρινική φάση και ενδιάμεσος κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου. Επίσης, η διάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου μεταβάλλονταν μέσα στο γεννητικό κύκλο, με τα πιο σύντομα επεισόδια να συμβαίνουν κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση και τα πιο παρατεταμένα κατά τη μέση ωχρινική φάση, ενώ ενδιάμεσος διάρκειας επεισόδια παρατηρούνταν κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση.

ΦΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΕΠΕΙΣΟΔΙΟ		ΧΡΟΝΟΣ ΗΜΙΖΩΗΣ ΤΗΣ LH (min)	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΗΜΕΡΗΣΙΑ ΕΚΚΡΙΣΗ (mIU/ml/24ωρο)
	ΑΡΙΘΜΟΣ ΩΣΕΩΝ (24ωρο)	ΗΜΙΔΙΑΡΚΕΙΑ* (min)		
Πρώιμη ωοθυλακική	17.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	6.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	131 ± 13 <sup>a</sup>	49 ± 6 <sup>a</sup>
Όψιμη ωοθυλακική	26.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	128 ± 12 <sup>a</sup>	56 ± 8 <sup>a</sup>
Μέση ωχρινική	10.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	11.0 ± 1.1 <sup>c</sup>	103 ± 7 <sup>a</sup>	52 ± 4 <sup>a</sup>

Πίνακας 2. Τα χαρακτηριστικά (mean ± SEM) της έκκρισης της LH (immunoreactive LH) κατά τις διάφορες φάσεις του γυναικείου γεννητικού κύκλου. Οι τιμές στην κάθε στήλη που χαρακτηρίζονται με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. \* Διάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου της LH στο ήμισυ του μεγίστου εύρους (Sollenberger et al., 1990a).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, η συνολική έκκριση 24ωρου της LH δεν μεταβάλλονταν σημαντικά μέσα στον κύκλο, αλλά ήταν μάλλον σταθερή. Επιπρόσθετα, η έκκριση της LH ερμηνεύονταν με την ύπαρξη των εκκριτικών

επεισοδίων, χωρίς να είναι απαραίτητη η τονική έκκριση σημαντικής ποσότητας της εκτός των επεισοδίων αυτών (McIntosh & McIntosh, 1985; Sollenberger et al., 1990a) και επίσης διαπιστώθηκε μια τάση, αν και όχι σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό, για κυκλοφορία στο αίμα ισομορφών γοναδοτροφινών με μικρότερο χρόνο ημιζωής κατά τη μέση ωχρινική φάση του γεννητικού κύκλου. Μία άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν η ύπαρξη κατά την ωχρινική φάση δύο πιθανά διαφορετικών ειδών εκκριτικών ώσεων της LH, δηλαδή ενός ποσοστού 30% με υψηλό εύρος και ενός 70% με χαμηλό εύρος έκκρισης. Εάν το κατά πόσον αυτές οι μικρές εκκριτικές ώσεις έχουν κάποια βιολογική δράση στο επίπεδο των ωοθηκών είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Μία άλλη μελέτη (deconvolution analysis) (Genazzani et al., 1990), που όμως απαιτούσε στο σχεδιασμό της ως σταθερή παράμετρο την από πριν γνώση του χρόνου ημιζωής της ορμόνης, αφ' ενός έδειξε ότι περισσότερα εκκριτικά επεισόδια συμβαίνουν στην πρώιμη ωοθυλακική σε σχέση με την ωχρινική φάση, αφ' ετέρου δε σε ασυμφωνία με τη μελέτη των Sollenberger και συν. (1990a), έδειξε ότι η διάρκεια των επεισοδίων αυτών δεν μεταβάλλονταν μέσα στον κύκλο. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών των ώσεων των γοναδοτροφινών εξαρτώνται και από τις μεθόδους, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση τους.

Ως γνωστό οι συγκεντρώσεις της LH, όπως μετρούνται με τις ανοσολογικές μεθόδους, δεν είναι πάντοτε ανάλογες με αυτές, που προκύπτουν από τη μέτρηση της βιολογικά δραστηρικής ορμόνης. Όταν λοιπόν γίνεται παράλληλη εκτίμηση και με τις δύο μεθόδους των συγκεντρώσεων της, το πηλίκο B/I (bioassay-to-immunoassay ratio, B/I ratio) είναι υψηλότερο στον ορό μετά την

εμμηνόπαυση σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου (Dufau & Veldhuis, 1987). Με διάφορες τεχνικές ανίχνευσης των ώσεων, η συχνότητα των ώσεων της *in vitro* βιολογικά δραστικής LH φάνηκε ότι ήταν μεγαλύτερη στην όψιμη ωοθυλακική, ελάχιστη στην ωχρινική και ενδιάμεση στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου (Veldhuis et al., 1984). Επομένως, υπάρχει συμφωνία ως προς τα χαρακτηριστικά της παλμικής έκκρισης της LH κατά το γεννητικό κύκλο είτε αυτή μετράται με ανοσολογική είτε με βιολογική μέθοδο. Ακόμη, με τις βιολογικές μεθόδους μέτρησης, όπως έχει φανεί και με τις ανοσολογικές, ο χρόνος ημιζωής της ορμόνης, που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν της ορμόνης, που εκκρίνεται κατά τις ωοθυλακικές φάσεις.

### ***Η από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση των γοναδοτροφινών***

Ένας τρόπος να μελετηθούν χωριστά, τουλάχιστον εν μέρει, ο υποθάλαμος και ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης στη διαδικασία έκκρισης των γοναδοτροφινών είναι να χορηγείται εξωγενώς η GnRH. Εάν λοιπόν χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένες δόσεις και χρόνοι αιμοληψιών μετά τη χορήγηση της GnRH, τότε η απάντηση της γοναδοτροφίνης θα αντικατοπτρίζει τα χαρακτηριστικά της ευαισθησίας των γοναδοτρόφων που διεγείρονται, υποθέτοντας βέβαια ότι δεν υπάρχουν μεταβολές στην κάθαρση της GnRH ή της LH.

Από τέτοιες αρχικές μελέτες προέκυψαν οι παρατηρήσεις ότι ανεξάρτητα από τη χορήγηση της GnRH με σταθερό ή κατά ώσεις τρόπο, η ποσότητα της LH



που εκκρίνεται εξαρτάται ουσιαστικά από τη φάση του κύκλου στην οποία γίνεται η εξωγενής χορήγηση (Wang et al., 1976; Hoff et al., 1977). Έτσι, τόσο η ευαισθησία όσο και η εφεδρική δεξαμενή της υπόφυσης έχουν βρεθεί να είναι ελάχιστες κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, μεγαλύτερες κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, μέγιστες κατά το μέσο του κύκλου και κάπως μικρότερες (αν και ακόμη αυξημένες) κατά την ωχρινική φάση του κύκλου. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα ωοθηκικά στεροειδή και κυρίως η E2 πράγματι μεταβάλλουν την ικανότητα των γοναδοτρόφων κυττάρων να απαντούν στο σήμα της GnRH (Messinis, 2000). Με βάση αυτό το μοντέλο, έχει βρεθεί ότι η εφεδρική δεξαμενή της LH αυξάνει (κυρίως κάτω από τον έλεγχο των οιστρογόνων) κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου. Η αύξηση τόσο της ευαισθησίας όσο και της εφεδρικής δεξαμενής των γοναδοτρόφων είναι σημαντικές για την εκδήλωση του ενδογενούς κύματος της LH (Messinis, 2000). Κατά το χρόνο του μεσοκύκλιου κύματος της LH, η πρώτη δεξαμενή αυξάνει σημαντικά, ίσως μέσω μιας ενδοκυττάριας μετατόπισης της ορμόνης από την εφεδρική δεξαμενή. Όλη αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να εξασφαλίσει το προωοθυλακιόρρηκτικό κύμα της LH, χωρίς να απαιτούνται μεγάλες μεταβολές της υποθαλαμικής έκκρισης της GnRH.

Όσον αφορά στο φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH (GnRH self-priming effect) φαίνεται ότι είναι εξαρτώμενο από τις ωοθηκικές ορμόνες, καθώς παρατηρείται πιο έντονα κατά την όψιμη ωοθυλακική και την ωχρινική φάση του κύκλου (Hoff et al., 1977). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο εξαρτώμενος από τις ωοθηκικές ορμόνες μηχανισμός, που μεσολαβεί στην εκδήλωση του φαινομένου αυτού, θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για την

αυξημένη ευαισθησία των γοναδοτρόφων στην GnRH πριν την ωοθυλακιορρηξία (Hoff et al., 1977; Pickering et al., 1979). Οι πιθανοί υποκείμενοι κυτταρικοί μηχανισμοί, που ευθύνονται για την εκδήλωση αυτού του φαινομένου, έχουν αναφερθεί παραπάνω.

Από τη μελέτη (deconvolution analysis) των εκκριτικών απαντήσεων της LH στη GnRH (10 µg) στις διάφορες φάσεις του κύκλου καθώς και των απαντήσεων σε μία δεύτερη δόση GnRH (10 µg) 2 ώρες μετά την πρώτη (GnRH self-priming effect) προέκυψαν τα εξής (Sollenberger et al., 1990b):

Η μικρή δόση (submaximal dose) της GnRH διεγείρει εκκριτικά επεισόδια της LH μεγαλύτερης ποσότητας κατά την όψιμη ωοθυλακική και την ωχρινική σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου. Αυτές οι αυξημένες εκκριτικές ποσότητες προέρχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς, καθώς κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση η ημιδιάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της πρώιμης ωοθυλακικής ή της μέσης ωχρινικής φάσης και το εύρος του εκκριτικού επεισοδίου είναι μεγαλύτερο στη μέση ωχρινική σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ευαισθησία των γοναδοτρόφων μεταβάλλεται τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά από το γοναδικό ορμονικό περιβάλλον. Όσον αφορά στην αυτοπριμοδότηση της GnRH, η απάντηση στη δεύτερη ώση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στην αρχική ώση σε όλες τις φάσεις του κύκλου, αν και η σχετική αύξηση είναι σημαντικά μεγαλύτερη κατά την όψιμη ωοθυλακική και τη μέση ωχρινική φάση. Έτσι, το εύρος της έκκρισης της LH σε απάντηση στη δεύτερη δόση της GnRH είναι αυξημένο σε κάθε φάση του κύκλου, ενώ η ημιδιάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου παραμένει σχετικά

ανεπηρέαστη. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η κυτταρική βάση του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης μπορεί να περιλαμβάνει την ενίσχυση του ρυθμού κένωσης της LH από το γοναδοτρόφο παρά την επίδραση σε κυτταρικούς μηχανισμούς, που ρυθμίζουν τη διάρκεια της εξωκυττάρωσης.

### ***Η ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροφινών***

A) Τα στεροειδή των ωοθηκών.

Στα θήλεα, η έκκριση των γοναδοτροφινών ορμονών ρυθμίζεται από θετικούς και αρνητικούς μηχανισμούς feedback των ωοθηκικών ορμονών, κυρίως της E2 και της προγεστερόνης.

Έχειδειχθεί ότι η εξωγενής χορήγηση βενζοϊκής E2 σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, η οποία προκάλεσε την αύξηση της E2 στην κυκλοφορία σε προωοθυλακιόρρηκτικές συγκεντρώσεις, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των επιπέδων των FSH και LH (Messinis & Templeton 1990a). Στη μελέτη αυτή δείχθηκε η ικανότητα των εξωγενών οιστρογόνων να καταστέλλουν τις ενδογενείς γοναδοτροφίνες και επιπλέον φάνηκε ότι και οι δύο γοναδοτροφίνες είναι στον ίδιο βαθμό ευαίσθητες στο αρνητικό feedback της E2. Αφ' ετέρου και τα ενδογενή οιστρογόνα είναι ικανά να επιδρούν στην έκκριση των γοναδοτροφινών και αυτό είναι έκδηλο υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης με εξωγενή χορήγηση γοναδοτροφινών. Σε μία τέτοια μελέτη (Messinis & Templeton, 1989), η χορήγηση εξωγενώς

κεκαθαρμένης FSH σε φυσιολογικές γυναίκες, σε δόσεις 225 IU ημερησίως, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων των FSH και E2 στον ορό. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της E2 συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση των βασικών επιπέδων της LH, η οποία διαπιστώθηκε δύο ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας με FSH.

Η αντίστροφη συσχέτιση, που διαπιστώθηκε μεταξύ της E2 και της LH σε αυτή τη μελέτη (Messinis & Templeton, 1989), ήταν ακόμη πιο ξεκάθαρη σε μία άλλη μελέτη, στην οποία οι συγκεντρώσεις της E2 στην κυκλοφορία αυξήθηκαν για μία μόνο συγκεκριμένη χρονική περίοδο (Messinis et al., 1994a). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση ενδομυϊκώς μίας μόνο δόσης 450 IU FSH σε φυσιολογικές γυναίκες την ημέρα 2 του γεννητικού κύκλου αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της FSH στον ορό για τις επόμενες τρεις ημέρες και αυτό συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της E2 του ορού, η μέση τιμή των συγκεντρώσεων της οποίας έφθασε τα 600 pmol/l την ημέρα 4 του κύκλου και επέστρεψαν στα βασικά επίπεδα την ημέρα 6. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, οι τιμές της LH μειώθηκαν σημαντικά και η μείωση διήρκησε όσο η αύξηση της E2. Οι συγγραφείς έδειξαν επομένως, ότι η αύξηση της ενδογενούς E2 κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου μπορεί να καταστείλει την έκκριση της LH από την υπόφυση. Στη συνέχεια, διερευνώντας περαιτέρω τη σημασία των ενδογενών οιστρογόνων πάνω στη ρύθμιση της βασικής έκκρισης των γοναδοτροφινών, μελετήθηκε η επίδραση της μείωσης των επιπέδων της E2 στην κυκλοφορία με το μοντέλο της αμφοτερόπλευρης ωθηκεκτομίας σε γυναίκες. Με τον τρόπο αυτό φάνηκε ότι η ωθηκεκτομία εκτελούμενη είτε

στην ωοθυλακική είτε στην ωχρινική φάση του κύκλου συνοδεύεται από μία βαθμιαία αύξηση των βασικών επιπέδων των FSH και LH (Alexandris et al., 1997). Με την παραπάνω σειρά μελετών προέκυψε ότι η E2 είναι το κύριο στοιχείο του μηχανισμού, με τον οποίο οι ωοθήκες ελέγχουν τη βασική έκκριση των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, με την προγεστερόνη να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο κατά την ωχρινική φάση του κύκλου (Messinis, 2000; Alexandris et al., 1997).

Στην όψιμη ωοθυλακική φάση στα περισσότερα είδη, τα επίπεδα της E2 στην κυκλοφορία υπερβαίνουν τον ουδό του θετικού μηχανισμού feedback, οπότε και εκδηλώνεται το μεσοκύκλιο κύμα της LH (Plant, 1986). Στους επίμους, το στάδιο του κύκλου κατά το οποίο αφαιρούνται οι υποφύσεις επηρεάζει την *in vitro* ευαισθησία των γοναδοτρόφων στη GnRH, με την υψηλότερη τιμή κατά τον προοίστρο, λόγω της προεπίδρασης της E2 (Speight & Fink, 1981a). Η βραχυπρόθεσμη (<12 ώρες) έκθεση των καλλιεργημένων υποφυσιακών κυττάρων στην E2 αυξάνει τον αριθμό των υποδοχέων της GnRH (Gregg et al., 1990) και την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Huang & Miller, 1980). Η μακροπρόθεσμη (24-48 ώρες) *in vitro* έκθεση των γοναδοτρόφων του επίμους (Speight & Fink, 1981b) ή του προβάτου (Fowler et al., 1992, 1993) στην E2 έχει μικρή επίδραση στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH, αν και η συνεχής έκθεση στην E2 κατά τη διάρκεια μίας πρόκλησης με GnRH ενισχύει την από τη GnRH προκαλούμενη σύνθεση και έκκριση της LH (Ramey et al., 1987).



Η χορήγηση της προγεστερόνης μαζί με την GnRH ενισχύει την απελευθέρωση της LH από υποφύσεις επίμουσ, κάνοντας αποτελεσματική την αλληλεπίδραση (cross-talk) μεταξύ των υποδοχέων προγεστερόνης και GnRH (Turgeon & Waring, 1992). Η μακροπρόθεσμη χορήγηση της προγεστερόνης έχει μικρή επίδραση στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH από υποφύσεις προβάτου (Fowler et al., 1992, 1993), αν και μπορεί να μειώσει τον αριθμό των υποδοχέων της GnRH (Laws et al., 1990).

B) Οι μη στεροειδικές ορμόνες των ωοθηκών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ινχιμπίνες και οι ακτιβίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούμενες από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ η φολλιστατίνη αποτελείται από μία γλυκοζυλιωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα (Burger, 1992).

Διάφορες μελέτες έχουν δημοσιευθεί, οι οποίες υποδηλώνουν ότι οι ινχιμπίνες και οι ακτιβίνες μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροφινών *in vivo*, ωστόσο ακόμη δεν έχει διευκρινισθεί ο ακριβής ρόλος που παίζουν αυτές οι ορμόνες κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ινχιμπίνης A είναι χαμηλά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης και σημαντικά υψηλά κατά την ωχρινική φάση του φυσιολογικού γυναικείου γεννητικού κύκλου, υποδηλώνοντας την παραγωγή της από το ωχρο σώματιο (Groome et al., 1994). Αντιθέτως η ινχιμπίνη B αυξάνει βαθμιαία από την πρώιμη μέχρι τη μέση ωοθυλακική φάση και στη συνέχεια μειώνεται, παρουσιάζει μία αιχμή μία ημέρα μετά το μεσοκύκλιο κύμα της LH και τα επίπεδα της είναι πολύ χαμηλά

κατά την ωχρινική φάση (Groome et al., 1996), υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτή παράγεται κυρίως από τα μικρά ωοθυλάκια (Roberts et al., 1993; Groome et al., 1996).

Η γνωστή διακυκλική αύξηση της FSH κατά τη μετάπτωση από την ωχρινική στην ωοθυλακική φάση (Roseff et al., 1989; Messinis et al., 1993a), το λεγόμενο "παραθύρο της FSH", του οποίου η έναρξη τοποθετείται 2-3 μέρες πριν την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως και συνεχίζεται κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση και θεωρείται υπεύθυνο για τη στρατολόγηση των ωοθυλακίων και την επιλογή του κυρίαρχου, φαίνεται ότι ρυθμίζεται εν μέρει από τις ινχιμπίνες. Η μείωση της ινχιμπίνης A στον ορό από τη μέση προς την όψιμη ωχρινική φάση προηγείται της έναρξης του "παραθύρου της FSH" (Groome et al., 1994), ενώ η ινχιμπίνη B αρχίζει να αυξάνει μία ή δύο ημέρες μετά από την έναρξη του "παραθύρου" και καθώς τα επίπεδα της αυξάνουν παρατηρείται μία βαθμιαία μείωση των επιπέδων της FSH, χωρίς όμως σημαντικές μεταβολές κατά το διάστημα αυτό στα επίπεδα της E2 (Groome et al., 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ινχιμπίνη A συμμετέχει στην έναρξη και η ινχιμπίνη B στον τερματισμό του "παραθύρου της FSH", αποδίδοντας τους έτσι ένα ρόλο στην επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου κατά το γεννητικό κύκλο (Messinis, 2000; 2006). Επιπλέον φαίνεται ότι η FSH είναι ο κύριος διεγερτικός παράγοντας της έκκρισης της ινχιμπίνης B (Groome et al., 1996). Είναι σαφές ότι οι συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία της ινχιμπίνης A και της ινχιμπίνης B ελέγχονται με διαφορετικούς μηχανισμούς.

Διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα προσπάθησαν να διερευνήσουν την επίδραση της ινχιμπίνης στην έκκριση της LH με διφορούμενα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων ειδών. Στον επίμου, η ενδογενής ινχιμπίνη καταστέλλει την παλμική έκκριση της LH (Culler & Negro-Vilar, 1989). Ενώ το χοίρειο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να εμποδίσει το προωοθυλακιορρηκτικό κύμα της LH στους επίμους (Rush et al., 1981), το βόειο ωοθυλακικό υγρό είτε δεν έχει καμία επίδραση στην απελευθέρωση της LH στα θήλεα πρόβατα και στους επίμους (Wallace et al., 1988; de Greef et al., 1987) είτε διεγείρει την απελευθέρωση της LH στα πρόβατα (Brooks et al., 1992). Η ανοσοποίηση έναντι της ινχιμπίνης δεν έχει καμία επίδραση στην έκκριση της LH σε φυσιολογικά ή σε ευρισκόμενα υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης πρόβατα (Mizumachi et al., 1990). Αντιθέτως, όταν ο Culler (1992) ανοσοποίησε επίμους έναντι της ινχιμπίνης, η καταστολή της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης των LH και FSH, που παρατηρούνταν σε επίμους υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης που τους είχε χορηγηθεί μη άνοσος ορός προβάτου, είχε καταργηθεί. Ο συγγραφέας συμπέρανε ότι η ινχιμπίνη μείωσε την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH στους επίμους. Σε καλλιέργειες γοναδοτρόφων κυττάρων επιμύων, η ινχιμπίνη μειώνει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Fowler et al., 1994) και το mRNA της υπομονάδας της γοναδοτροφίνης (Attardi et al., 1989), εμποδίζοντας την προς τα άνω ρύθμιση (up-regulation) του υποδοχέα της GnRH (Braden et al., 1990) ή τη σύνδεση (Wang et al., 1988). Αντιθέτως, σε καλλιέργειες υποφύσεων προβάτου, η ινχιμπίνη διεγείρει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Fowler et al., 1994), τη σύνθεση (Muttukrishna & Knight, 1990) και τον αριθμό των υποδοχέων της GnRH (Laws et al., 1990). Ο

φυσιολογικός ρόλος των περιορισμένων επιδράσεων της ινχιμπίνης πάνω στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH *in vivo* παραμένει ασαφής.

Όσον αφορά στις ακτιβίνες, σε μία προγενέστερη ανασκόπηση (Messinis, 2000) ο συγγραφέας αφού επισημαίνει την ανεπάρκεια της μεθόδου μέτρησης της ακτιβίνης A να εκτιμήσει τη βιοδιαθέσιμη μορφή της και την ανάγκη για βελτίωση της, πιθανολογεί ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων της από τη μέση ωχρινική μέχρι τη μέση ωοθυλακική φάση του επόμενου γυναικείου γεννητικού κύκλου (Muttukrishna et al., 1996) μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του “παραθύρου της FSH” και επομένως να συμμετέχει στην επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Για την ακτιβίνη B, τα δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα, ενώ αναφορικά με τη φολλιστατίνη δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις της κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου, υποδηλώνοντας ότι αυτή δεν ασκεί κάποια συγκεκριμένη βιολογική επίδραση *in vivo* (Kettel et al., 1996), αλλά είναι πιθανό να χρησιμεύει σαν πρωτεΐνη-φορέας για τις ακτιβίνες στην κυκλοφορία, προκαλώντας την αδρανοποίηση τους και υποβοηθώντας τη δράση τους σε επίπεδο ιστού (Messinis, 2000; 2006).

Η ακτιβίνη διεγείρει την έκκριση της LH σε πιθήκους (Stouffer et al., 1993) αλλά όχι σε επίμους (Rivier & Vale, 1991). Ωστόσο, η φολλιστατίνη δεσμεύει την ακτιβίνη σε μία αδρανή μορφή στην ωοθήκη, στο ωοθυλακικό υγρό, στην κυκλοφορία και στην υπόφυση (Schneyer et al., 1992; Kogawa et al., 1991). Η ακτιβίνη *in vitro* διεγείρει τη βασική έκκριση της FSH (Vale et al., 1986) και καταστέλλει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH και τη σύνθεση

της στα γοναδοτρόφα του προβάτου (Muttukrishna & Knight, 1991), αλλά όχι του επίμουσ (Braden & Conn, 1992). Η φολλιστατίνη μπορεί να μειώσει την έκκριση των γοναδοτροφινών καταστέλλοντας την οδό της PKC και μειώνοντας τις θέσεις δέσμησης της GnRH στην υπόφυση (Wang et al., 1990).

### **Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΣΟΚΥΚΛΙΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ LH**

Το μεσοκύκλιο κύμα της LH είναι το υποχρεωτικό γεγονός του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Ως γνωστό η διάρκεια του μεσοκύκλιου κύματος της LH είναι περίπου 50 ώρες. Η έναρξη του λαμβάνει χώρα απότομα και χαρακτηρίζεται από 3 φάσεις: μία ταχεία ανοδική φάση διάρκειας περίπου 14 ωρών, μία επίπεδη φάση αιχμής επίσης διάρκειας περίπου 14 ωρών και μία μεγαλύτερη καθοδική φάση 20 ωρών. Η κλίση του κύματος της LH είναι πιο απότομη από αυτή του κύματος της FSH (Shoham et al., 1995).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η E2 είναι ο κύριος παράγοντας, που προκαλεί την έναρξη του ενδογενούς κύματος της LH κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, εφ' όσον η συγκέντρωση της στην κυκλοφορία έχει ξεπεραστεί για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο ένα ορισμένο επίπεδο (ουδό) (Karsch et al., 1973; Keye and Jaffe, 1975; Young and Jaffe, 1976; March et al., 1979; Liu and Yen, 1983; Karande et al., 1990). Αυτός ο ουδός είναι περίπου 200 pg/ml, και η χρονική περίοδος είναι τουλάχιστον 48 ώρες (Young and Jaffe, 1976; Simon et al., 1987; Karande et al., 1990). Ακόμη και υπερφυσιολογικά επίπεδα E2 που επιτυγχάνονται κατά την εξωγενή

χορήγηση οιστρογόνων είναι ικανά να προκαλέσουν κύμα της LH (Messinis et al., 1992).

Η αλληλεπίδραση της E2 με τη GnRH είναι σημαντική για την έναρξη του κύματος της LH μέσω της αυξημένης έκφρασης του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης της GnRH στην υπόφυση (Hoff et al., 1977).

Ο βαθμός, στον οποίο η προγεστερόνη συμμετέχει στο θετικό μηχανισμό feedback κατά το μέσο του κύκλου, δεν είναι ξεκάθαρος. Πειράματα σε γυναίκες έχουν δείξει ότι η προγεστερόνη μπορεί να προκαλέσει ένα θετικό μηχανισμό feedback μόνο μετά από προηγούμενη θεραπεία με οιστρογόνα, ακόμη και αν ο κατάλληλος ουδός για την E2 δεν έχει ξεπεραστεί (Chang & Jaffe, 1978; March et al., 1979).

Αν και υπάρχουν διφορούμενα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στην κυκλοφορία περιωοθυλακιορρηκτικά, σε μία μελέτη ενώ τα επίπεδα της E2 στον ορό παρουσιάζουν την αιχμή τους περίπου κατά την έναρξη της ταχείας ανοδικής φάσης του κύματος της LH, τα επίπεδα της προγεστερόνης αυξάνουν περίπου 12 ώρες πριν την έναρξη του κύματος και συνεχίζουν σε plateau μέχρι περίπου 36 ώρες μετά την αιχμή του κύματος (Hoff et al., 1983).

Είναι λοιπόν πιθανό, ότι στο μέσο του κύκλου η προγεστερόνη διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην έναρξη του κύματος της LH. Σε πειράματα σε γυναίκες, η



χορήγηση προγεστερόνης μπορεί να προωθήσει την έναρξη του από την E2 προκαλούμενου κύματος LH (Messinis & Templeton, 1990a).

Ο τόπος δράσης της E2 για το θετικό μηχανισμό feedback είναι τόσο ο υποθάλαμος όσο και η υπόφυση (Xia et al., 1992). Ένα πρωθυλακιωρηκτικό κύμα της GnRH έχει βρεθεί να υφίσταται στο πρόβατο (Moenter et al., 1991) αλλά όχι στον πίθηκο (Ferin et al., 1979). Στις γυναίκες δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα, αλλά σε μία μελέτη βρέθηκε αύξηση στη GnRH του πλάσματος, ως αποτέλεσμα της χορήγησης οιστρογόνων, η οποία προηγούνταν της αύξησης των LH και FSH (Miyake et al., 1983). Είναι πιθανόν λοιπόν, ότι ο κύριος τόπος δράσης του θετικού μηχανισμού feedback είναι η υπόφυση και ότι η GnRH διαδραματίζει ένα μεσολαβητικό ρόλο (Knobil, 1988).

Ο μηχανισμός δράσης της E2 στο μηχανισμό της θετικής παλινδρομής αλληλορρύθμισης πάνω στην έκκριση των γοναδοτροφινών ασκείται μέσω των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER). Δεν είναι γνωστό εάν αυτό αφορά στους ERα ή ERβ ή και στους δύο. Είναι γνωστό βέβαια ότι και οι δύο τύποι υποδοχέων υπάρχουν στα γοναδοτρόφα κύτταρα (Mitchner et al., 1998). Στο πρόβατο, η E2 ερμηνεύει αρκετά από τα δεδομένα σχετικά με τη μεταστροφή της επίδρασης της από αρνητική σε θετική ρύθμιση του κύματος της LH. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η έναρξη του κύματος της LH στο πρόβατο σχετίζεται με μία αύξηση της απάντησης του γοναδοτρόφου κυττάρου στη GnRH, δημιουργώντας την υπόθεση ότι μία μείωση σε μη στεροειδικό αρνητικό feedback θα μπορούσε να εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία (Clarke, 1995).

Στις γυναίκες, ο μηχανισμός που εμπλέκεται στη μεταστροφή του feedback της E2 από αρνητικό σε θετικό δεν είναι επίσης ξεκάθαρος. Σε μία πρόσφατη μελέτη (Taylor et al., 1995) έχει δειχθεί ότι η E2 δεν είναι ικανή να προκαλέσει ένα φυσιολογικό κύμα της LH σε φυσιολογικές γυναίκες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι και άλλοι ωθητικοί παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στον έλεγχο του φυσιολογικού μεσοκύκλιου κύματος της LH. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (gonadotrophin surge attenuating factor - GnSAF), ο οποίος θα περιγραφεί παρακάτω.

Οι παράγοντες που ελέγχουν τον τερματισμό του ενδογενούς κύματος της LH δεν είναι γνωστοί. Μετά την έναρξη του κύματος της LH, οι συγκεντρώσεις της E2 μειώνονται. Είναι μάλλον απίθανο η μείωση της E2 να τερματίζει το κύμα, καθώς ο τερματισμός επίσης λαμβάνει χώρα και όταν σε πειράματα διατηρούνται υψηλά τα επίπεδα των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του κύματος της LH (Liu & Yen, 1983). Επιπρόσθετα, σε πειραματόζωα έχει δειχθεί ότι η E2 είναι σημαντική για την έναρξη του κύματος LH και δεν είναι απαραίτητη μετά την έναρξη του (Evans et al., 1997). Ωστόσο, σε πειράματα σε επίμυες έχει δειχθεί ότι τα οιστρογόνα μπορούν να μειώσουν την πρωτεΐνη των υποδοχέων ER $\alpha$  and ER $\beta$ , υποδηλώνοντας ότι μέσω αυτού του μηχανισμού τα στεροειδή αυτά περιορίζουν το θετικό μηχανισμό feedback (Schreihofner et al., 2000, 2002). Πιο πρόσφατα δεδομένα όμως έχουν δείξει ότι η απώλεια των κυμάτων της LH σε ωθηκεκτομηθέντες επίμυες κατά τη διάρκεια της χρόνιας θεραπείας με E2 επιτυγχάνονταν χωρίς μεταβολές στο

ποσοστό των GnRH νευρώνων που εξέφραζαν υποδοχείς ER $\alpha$  or ER $\beta$  (Legan & Tsai, 2003).

Η προγεστερόνη του ορού στις γυναίκες αυξάνει σταδιακά από την έναρξη προς το τέλος του κύματος της LH και στη συνέχεια κατά την ωχρινική φάση του κύκλου (Hoff et al., 1983). Είναι πιθανόν ότι τα αυξανόμενα επίπεδα της προγεστερόνης συμμετέχουν στον τερματισμό του κύματος της LH μέσω ενός αρνητικού μηχανισμού feedback. Σε πειράματα σε γυναίκες, έχειδειχθεί ότι όταν ένα κύμα της LH προκαλούνταν από την εξωγενή χορήγηση της E $2$ , οι τιμές της LH μειώνονταν μετά από τη μέγιστη τιμή (peak), αλλά έφθαναν στα επίπεδα που υπήρχαν πριν την έναρξη του κύματος μόνο μετά από τη χορήγηση προγεστερόνης (Messinis & Templeton, 1990a).

Έχει επίσηςδειχθεί η ύπαρξη βραχείας αγκύλης (short loop) ρύθμισης της LH πάνω στην έκκριση της GnRH (Kesner et al, 1986). Ακόμη έχει διατυπωθεί και η άποψη, χωρίς όμως να έχει αποδειχτεί, ότι η LH έχει υπερβραχεία αγκύλη (ultrashort-loop) feedback πάνω στην ίδια της την έκκριση και αυτό αποτελεί έναν άλλο πιθανό μηχανισμό για τον τερματισμό του κύματος. Αποτελεί τέλος μία πιθανότητα ο τερματισμός του κύματος της LH να οφείλεται απλά στην εξάντληση των αποθηκών της στην υπόφυση (Shoham et al., 1995).

## Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ (*GnSAF*)

### *Ενδείξεις της ύπαρξης του GnSAF*

Τα τελευταία 20 χρόνια περίπου, έχουν προκύψει ενδείξεις ότι μία ωθηκική μη στεροειδής ουσία, η οποία ονομάζεται παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (gonadotrophin surge attenuating factor - GnSAF) (Messinis & Templeton, 1989) εμπλέκεται στον αρνητικό μηχανισμό feedback της ρύθμισης της λειτουργίας της υπόφυσης και επηρεάζει το εύρος του μεσοκύκλιου κύματος της LH. Παρακάτω παρουσιάζονται περιληπτικά οι ενδείξεις αυτές:

#### In vivo ενδείξεις.

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός ωθηκικού παράγοντα, ο οποίος μείωνε την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, προήλθαν από παρατηρήσεις σε συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, προκαλούμενης κατόπιν διέγερσης των ωοθηκών με FSH, όπου τα ενδογενή κύματα της LH ήταν μειωμένα ή καταργημένα σε σύγκριση με αυτόματους κύκλους. Η κατασταλτική αυτή επίδραση αποδόθηκε στον GnSAF, ο οποίος μειώνει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης τόσο σε γυναίκες όσο σε πιθήκους και επίμους (Littman & Hodgen, 1984; Messinis & Templeton, 1989; Sopolak & Hodgen, 1984). Η βιοδραστικότητα του θεωρούμενου GnSAF υπήρχε στο

χοίρειο ωοθυλακικό υγρό (pFF), το οποίο προκαλούσε άμβλυση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH σε πιθήκους στους οποίους είχε προεπιδράσει η E2 (Sopelak & Hodgen, 1984). Μέχρι σήμερα, ουσίες με GnSAF βιοδραστικότητα έχουν απομονωθεί από κύτταρα Sertoli στον επίμου (Tio et al., 1994), από το pFF (Danforth & Cheng, 1995) και από το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (hFF) (Pappa et al. 1999). Στις γυναίκες φαίνεται ότι ο GnSAF μειώνει την απάντηση της υπόφυσης στη GnRH και αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ελέγχου της in vivo βιοδραστικότητας του GnSAF (Messinis & Templeton, 1990b). Η παραγωγή της θεωρούμενης in vivo βιοδραστικότητας του GnSAF διεγείρεται από την FSH σε ανθρώπους, πιθήκους και επίμους (Messinis & Templeton, 1986; 1991a; Messinis et al., 1993b; 1994a; Busbridge et al., 1988; Schenken et al., 1984), κατά τη διάρκεια της μέσης και της όψιμης ωοθυλακικής φάσης (Messinis & Templeton, 1990c) και της ωχρινικής φάσης (Messinis et al., 1993c) σε γυναίκες υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Καθώς η χορήγηση εξωγενούς FSH σε μετεμμηνοπαυσιακές ωοθήκες δεν μειώνει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, συγκεντρώσεις της FSH στην κυκλοφορία δεν δείχνουν βιοδραστικότητα GnSAF (Messinis et al., 1994b).

Τα προβλήματα των ερευνητικών μοντέλων με τη χρήση των γυναικών υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης για τη μελέτη της αυξημένης GnSAF βιοδραστικότητας περιλαμβάνουν τις αυξημένες συγκεντρώσεις της E2, της προγεστερόνης και της ινχιμπίνης κατά τη διάρκεια της εξωγενούς χορήγησης των γοναδοτροφινών (Messinis & Templeton, 1988). Η χορήγηση της FSH κατά τη διάρκεια της πρώιμης και της μέσης ωχρινικής φάσης

κατέστειλε την έκκριση της LH σε απάντηση στη GnRH και η επίδραση του GnSAF δεν μπορεί να οφείλεται σε στεροειδικό feedback, καθώς η καταστολή παρατηρήθηκε νωρίτερα από την αύξηση της E2 και της προγεστερόνης (Messinis et al., 1993c). Η προγεστερόνη μπορεί επίσης να μειώσει το από την E2 προκαλούμενο κύμα της LH, αλλά για αυτό απαιτούνται συγκεντρώσεις υπέρ των φυσιολογικών (Messinis & Templeton, 1990a). Αντίστροφα, η αγωγή με E2 κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου επιδρά με θετικό μηχανισμό feedback αλλά δεν ήταν ικανή να εξουδετερώσει την κατασταλτική επίδραση της σύγχρονηγούμενης FSH (Messinis et al., 1992).

Τα πιο πειστικά δεδομένα ότι η από την FSH διεγερόμενη βιοδραστικότητα του GnSAF δεν μπορεί να οφείλεται στο αρνητικό feedback της E2 ή της προγεστερόνης στο επίπεδο της υπόφυσης προέρχονται από in vivo μελέτες, στις οποίες η υποφυσιακή απάντηση στη GnRH ελέγχθηκε σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά από μία μόνη χορήγηση FSH σε γυναίκες (Messinis et al., 1991; 1993b). Στα πειράματα αυτά βρέθηκε ότι η χορήγηση μιας δόσης FSH είχε δοσοεξαρτώμενες κατασταλτικές επιδράσεις στην ευαισθησία της υπόφυσης στην εξωγενώς χορηγούμενη GnRH. Η κατασταλτική επίδραση παρατηρήθηκε 8 ώρες μετά τη χορήγηση της FSH, ενώ τα επίπεδα της E2 στην κυκλοφορία δεν είχαν αυξηθεί σημαντικά τουλάχιστον 24 ώρες μετά τη χορήγηση της FSH. Επίσης, η βιοδραστικότητα του GnSAF σε γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε εξωγενώς FSH δεν θα μπορούσε να οφείλεται σε μία αύξηση των επιπέδων της ινχιμπίνης στην κυκλοφορία. Στα παραπάνω πειράματα, η αύξηση της in vivo GnSAF βιοδραστικότητας προηγήθηκε των



αυξήσεων της E2 και της ινχιμπίνης στην κυκλοφορία. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, οι Messinis και συν. (1998) έδειξαν ότι κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, όπου χορηγούνται εξωγενώς FSH, η απάντηση της LH στη GnRH ήταν μειωμένη κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση (επικράτηση της επίδρασης του GnSAF), ανέκαμπτε και αυξάνονταν κατά τη μέση ωοθυλακική φάση (επικράτηση της επίδρασης της E2) και δεν αύξανε περαιτέρω κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση παρά τη συνεχιζόμενη αύξηση των επιπέδων της E2 (ο GnSAF αντιστάθμιζε την επίδραση της E2). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, η E2 ενισχύει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, ενώ ο GnSAF ανταγωνίζεται τη δράση αυτή.

Στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, οι Messinis και συν. (1994a, 1998) έχουν δείξει ότι παρά τη σημαντική αύξηση της E2 από την πρώιμη στη μέση ωοθυλακική φάση, η ευαισθητοποίησή της επίδραση στην υπόφυση είναι εμφανής μόνο κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο, όπου παρατηρείται μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απάντησης της LH στη GnRH και των συγκεντρώσεων της E2. Υπάρχουν επομένως σήμερα ενδείξεις (Messinis et al., 1998), που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο η παραγωγή του GnSAF είναι μεγαλύτερη κατά την πρώιμη και τη μέση ωοθυλακική φάση και μικρότερη κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση (Messinis & Templeton, 1991b). Στις περιόδους αυτές, ο GnSAF ανταγωνίζεται την ευαισθητοποίησή επίδραση της E2 στην υπόφυση (Messinis et al., 1998; Messinis, 2000).

Στις γυναίκες, η χορήγηση της FSH ελάττωσε και τις δύο αιχμές της LH που εκκρίνονταν ως απάντηση σε δύο διαδοχικές ώσεις της GnRH (Messinis et al., 1994c). Επιπρόσθετα, το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH που προέκυπτε από τις δύο χορηγούμενες δόσεις GnRH ήταν επίσης μειωμένο (Messinis & Templeton, 1991a). Η από την FSH προκαλούμενη βιοδραστικότητα του GnSAF βρέθηκε ότι μείωνε την αυτοπριμοδότηση της GnRH και στους επίμυες *in vivo* (Korppenaal et al., 1991). Τόσο στις γυναίκες όσο και στους επίμυες, ο από την FSH διεγερόμενος GnSAF διατηρεί την υπόφυση σε μία κατάσταση χαμηλής ευαισθησίας στη GnRH (de Koning et al., 1987), μία επίδραση η οποία μπορεί να ξεπεραστεί με επαναλαμβανόμενες ώσεις της GnRH (Korppenaal et al., 1993; Messinis et al., 1994c). Το μεγαλύτερο διάστημα μεταξύ των ώσεων της GnRH επιτρέπει στον GnSAF να επαναφέρει την υπόφυση σε μία ανερέθιστη κατάσταση (Korppenaal et al., 1993), ενώ οι ποικίλες απαντήσεις του GnSAF στην FSH μπορεί να οφείλονται στις κυμαινόμενες σχετικές επιδράσεις του GnSAF και της GnRH (de Koning et al., 1994) καθώς και στο κυμαινόμενο στεροειδικό feedback και τη συχνότητα των ώσεων της GnRH στα διάφορα ζώα.

Πειράματα σε υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν ενισχύσει τη θεωρία της δράσης του GnSAF κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (Dafopoulos et al., 2004a). Πιο συγκεκριμένα, σε αυτές τις γυναίκες είχαν προσομειωθεί δύο ωοθυλακικές φάσεις και μία ωχρινική φάση μεταξύ τους μέσω της εξωγενούς χορήγησης E2 και προγεστερόνης. Τα πειράματα διήρκεσαν 43 ημέρες και η ευαισθησία της υπόφυσης, μετρούμενη ως η απάντηση της LH στη GnRH στα 30 min (10 μg GnRH *i.v.*), διερευνήθηκε σε καθημερινή βάση. Αμέσως μετά το

τέλος της εξομοιωμένης ωχρινικής φάσης, η απάντηση της LH στη GnRH ήταν παρόμοια με την πρώιμη ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού κύκλου. Ωστόσο, από το χρονικό αυτό σημείο και μετά (δηλαδή κατά την εξομοιωμένη ωοθυλακική φάση) διαπιστώθηκε μία συνεχής αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH, η οποία ήταν διαφορετική από το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Στο φυσιολογικό κύκλο, ως γνωστό, η αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης παρατηρείται κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της παραγωγής του GnSAF, ο οποίος απουσίαζε από τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες καθώς οι ωοθήκες τους δεν ήταν λειτουργικές. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και άλλα πειραματικά δεδομένα σε υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες η αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία δεν επηρέασε την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH (Dafopoulos et al., 2004b).

#### In vitro ενδείξεις.

Μετά από τις αρχικές παρατηρήσεις της βιοδραστικότητας του GnSAF, οι Schenken και συν. (1984) έδειξαν ότι ο ορός της ωοθηκικής φλέβας από πιθήκους στους οποίους χορηγούνταν εξωγενώς FSH κατέστειλε in vitro την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH από κύτταρα υπόφυσης επίμυων. Επίσης έχουνδειχτεί οι κατασταλτικές επιδράσεις του GnSAF εντός του ελεύθερου από στεροειδή ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού γυναικών υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης (Korpenaal et al., 1992), βοείου ωοθυλακικού υγρού (de Koning et al., 1989), εκχυλισμάτων ωοθηκών επιμύων (de Koning et al., 1989), απομονωμένων προωοθυλακιόρρηκτικών

ωοθυλακίων (Busbridge et al., 1988) και χοίρειου ωοθυλακικού υγρού (Danforth et al., 1987) πάνω στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH από υποφύσεις επιμύων *in vitro*. Ακόμη, σε υποφύσεις προβάτων η παρουσία του ελεύθερου από στεροειδή ανθρώπειου ωοθυλακικού υγρού γυναικών που λαμβάνονταν υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης μείωνε την από τη GnRH προκαλούμενη έκκρισης της LH (Fowler et al., 1990; 1992). Διαλύματα που περιέχουν GnSAF βιοδραστικότητα καταστέλλουν και τις δύο δεξαμενές της LH, που εκκρίνεται σε απάντηση στη GnRH από υποφύσεις επιμύων (Korpenaal et al., 1992, Knight et al., 1990) και προβάτων (Fowler et al., 1993). Ακολούθως, ο GnSAF βρέθηκε να ελαττώνει το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH σε υποφύσεις προβάτων (Fowler et al., 1994) και επιμύων (Byrne et al., 1996) κατά τη χορήγηση επαναλαμβανόμενων ώσεων GnRH. Βιοδραστικότητα του GnSAF βρέθηκε επίσης στο ελεύθερο από στεροειδή ανθρώπειο ωοθυλακικό υγρό, που λαμβάνονταν από γυναίκες κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (Fowler & Templeton, 1996). Επιπρόσθετα, ο GnSAF δυνητικά έχει κεντρικό ενδοκρινικό ρόλο, επειδή η βιοδραστικότητά του έχει βρεθεί στον ορό γυναικών τόσο υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης κατόπιν διέγερσης των ωοθηκών όσο και σε φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (Byrne et al., 1993; Fowler et al., 1994).

## **Απομόνωση του GnSAF**

### 1. In vitro βιολογικές μέθοδοι μέτρησης

Ένας σημαντικός αριθμός διαφορετικών βιολογικών μεθόδων μέτρησης του GnSAF έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με την άποψη των Fowler & Templeton (1996) η ποικιλία των τεχνικών και των διαλυμάτων, που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της βιοδραστικότητας του GnSAF, αποτελεί μία από τις ισχυρές βάσεις αυτού του χώρου έρευνας, καθώς σε αυτές περιλαμβάνονται τόσο στατικές όσο και δυναμικές τεχνικές. Έτσι, τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει δεν μπορεί να οφείλονται σε μη ειδικές επιδράσεις μεταξύ των διαφόρων βιολογικών ειδών, καθώς τα χοίρεια, βόεια και ανθρώπια ωοθυλακικά υγρά και τα ωοθηκικά και ορχικά εκχυλίσματα έχουν όλα δείξει να εκδηλώνουν GnSAF βιοδραστικότητα με τουλάχιστον μία από τις διάφορες βιολογικές μεθόδους μέτρησης. Μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί ο GnSAF και δεν είναι ακόμη διαθέσιμη μία ανοσολογική μέθοδος μέτρησης του.

### 2. Κάθαρση (purification) του GnSAF

Το θέμα αυτό δεν θα αναλυθεί εκτενώς καθώς τα δεδομένα είναι περιορισμένα αλλά και επειδή είναι εκτός των στόχων της παρούσης μελέτης όντας ιδιαίτερα εξειδικευμένο και σχετικό με άλλες τεχνικές. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν μερικές ασυμφωνίες σχετικά με την αλληλουχία των αμινοξέων του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου και το μοριακό βάρος των ουσιών, που έχουν απομονωθεί (Pappa et al., 1999; Fowler et al., 2002; Tavoulari et al., 2004; Karligiotou et al., 2006), οι οποίες υποδηλώνουν ότι περισσότερες της μίας πρωτεΐνες

μπορεί να εμπλέκονται στον έλεγχο της έκκρισης της LH από την υπόφυση μέσω της μείωσης της από τη GnRH διαγειρούμενης έκκρισης της LH (Messinis, 2000).

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια της HSA είχαν παραχθεί με την εφαρμογή του συστήματος έκφρασης-έκκρισης του *Pichia pastoris* (Tavoulari et al., 2004). Το καρβοξυτελικό άκρο 95πεπτίδιο της HSA (residues 490–585), παραγόμενο σε ανασυνδυασμένη μορφή, παρουσίασε βιοδραστικότητα GnSAF μειώνοντας την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH σε ποσοστό 50-82%, σε καλλιέργειες υποφύσεων επιμύων (Tavoulari et al., 2004). Εάν βέβαια, ο GnSAF είναι τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της HSA, θα ήταν αναμενόμενο τα κοκκώδη κύτταρα να εκφράζουν ολόκληρο ή τμήμα του γονιδίου της HSA. Μία πολύ πρόσφατη μελέτη (Karlgiotou et al., 2006) έλεγξε αυτό το ερώτημα και με την τεχνολογία της RT-PCR και sequencing analysis του cDNA σε ωχριντοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, έδειξε την έκφραση του αμινο- και του καρβοξυ-τελικού τμήματος του γονιδίου της HSA.

Αναμένεται ο καθορισμός της πλήρους αλληλουχίας των αμινοξέων του και του γονιδίου, που ελέγχει την παραγωγή του.

### ***Η παραγωγή του GnSAF***

Υπάρχουν σήμερα αρκετές ενδείξεις ότι ο GnSAF παράγεται στις ωοθήκες. Αρχικά διάφορες μελέτες (de Koning et al., 1987, 1989), έδειξαν ότι η



ωοθηκεκτομία στους επίμυες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας στη GnRH, υποδηλώνοντας ότι η ωοθήκη παράγει κάποιον παράγοντα ο οποίος διατηρεί την υπόφυση σε κατάσταση χαμηλής ευαισθησίας στη GnRH. Επιπρόσθετα, η ωοθηκική προέλευση του GnSAF δείχθηκε, μεταμοσχεύοντας υποφύσεις κάτω από τη νεφρική κάψα σε άθικτους και ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες (van Dieten et al., 1989). Η χορήγηση της E2 σε αυτές τις μελέτες απέκλεισε την πιθανότητα ότι τα αποτελέσματα αυτά οφείλονταν στην έλλειψη της E2. Έχει επίσης δειχθεί (Korpenaal et al., 1991) ότι οι ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες δεν εμφανίζουν το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH. Στα πειραματόζωα αυτά η χορήγηση της FSH δεν μειώνει την από την GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH in vivo και επίσης δεν παρουσιάζει διεγερτική επίδραση στη βιοδραστικότητα του GnSAF σε άρρενες επίμυες (Korpenaal et al., 1993).

Η χορήγηση HMG σε πιθήκους με φυσιολογικό κύκλο προκάλεσε τη μείωση της ευαισθησίας στη GnRH in vivo (Littman & Hodgen, 1984). Επιπλέον, η επίδραση αυτή του GnSAF εξαλειφόταν 90 min μετά την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία. Σε μία άλλη μελέτη (Schenken et al., 1984) σε πιθήκους, που τους χορηγούνταν FSH, η in vitro βιοδραστικότητα του GnSAF ήταν μέγιστη στον ορό της ωοθηκικής φλέβας στους ακέραιους πιθήκους σε σχέση με αυτούς που τους είχε γίνει αναρρόφηση των ωοθυλακίων. Τα ελεύθερα από στεροειδή εκχυλίσματα ωοθηκών επιμύων επίσης βρέθηκε να περιέχουν GnSAF, που κατέστειλε την από τη GnRH διεγερόμενη έκκριση της LH από υποφύσεις επιμύων σε παρόμοιο ποσοστό με το ελεύθερο από στεροειδή βόειο ωοθυλακικό υγρό (de Koning et al., 1989). Το υγρό περιεχόμενο των

απομονωμένων προωθυλακιορρηκτικών ωθυλακίων επίσης εμφανίζει βιολογική δράση GnSAF (Busbridge et al., 1990). Σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που τους χορηγήθηκε εξωγενώς FSH σε δόσεις οι οποίες αυξάνουν την *in vivo* GnSAF βιοδραστικότητα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Messinis & Templeton, 1989, 1990c; Messinis et al., 1991, 1994a) δεν μειώθηκε η ευαισθησία της υπόφυσης στην εξωγενή GnRH σε σύγκριση με την αντίστοιχη ευαισθησία της υπόφυσης των γυναικών της ομάδας ελέγχου, που τους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (Messinis et al., 1994b). Συμπεραίνεται ότι η μετεμμηνοπαυσιακή ωθήκη δεν είναι ικανή να παράγει GnSAF ως απάντηση στην αυξημένη FSH.

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GnSAF βιοδραστικότητας υπάρχουν στα μικρά ωθυλάκια (5 με 6 mm) και η βιοδραστικότητα αυτή σχετίζεται αρνητικά με το μέγεθος του ωθυλακίου, υποστηρίζοντας έτσι την υπόθεση ότι ο GnSAF, του οποίου η βιοδραστικότητα ελαττώνεται με την πρόοδο της ωθυλακικής ωρίμανσης, διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παρεμπόδιση της πρόωρης έναρξης του κύματος της LH (Fowler et al., 2001).

Όλα τα παραπάνω δεδομένα της παρουσίας της βιοδραστικότητας του GnSAF στο ωθυλακικό υγρό διαφόρων βιολογικών ειδών τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε διεγερμένους κύκλους υποδηλώνουν ότι ο GnSAF παράγεται από την ωθήκη και πιο συγκεκριμένα από τα ωθυλάκια. Όσον αφορά στην υπόθεση ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι ο πιθανός τόπος παραγωγής του GnSAF, σε μια μελέτη όπου τα κοκκώδη κύτταρα και τα

κύτταρα της θήκης λήφθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό γυναικών, που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν, βρέθηκε ότι στο περιβάλλον της καλλιέργειας υπήρχε βιοδραστικότητα του GnSAF (Fowler & Templeton, 1996). Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε φυσιολογικούς γυναικείους γεννητικούς κύκλους τα κοκκώδη κύτταρα και όχι τα κύτταρα της θήκης ή του στρώματος παράγουν GnSAF, ο οποίος φαίνεται να είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 60-66 kDa (Fowler et al., 2002).

Στις γυναίκες, η μειωμένη ευαισθησία της υπόφυσης στην εξωγενή GnRH κατά την κύηση είναι υποδηλωτική βιολογικής δράσης του GnSAF. Ο κατάλληλα επεξεργασμένος ορός, που του αφαιρέθηκε η ινχιμπίνη, από έγκυες γυναίκες στο τρίτο τρίμηνο της κύησης προκάλεσε την ελάττωση της ευαισθησίας των βοείων υποφύσεων στη GnRH και ανέστειλε το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH (Fowler et al., 1995a). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο πλακούντας μπορεί να είναι ένας επιπλέον, εκτός της ωοθήκης, τόπος παραγωγής του GnSAF.

### ***Μηχανισμός της δράσης του GnSAF***

#### **A). Αλληλεπιδράσεις με στεροειδικούς και μη στεροειδικούς παράγοντες και δεύτερους αγγελιοφόρους.**

Η υπόφυση, in vivo, λαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό μηνυμάτων, διαφορετικών από τον ωοθηκικό GnSAF, εκ των οποίων άλλα είναι διεγερτικά και άλλα ανασταλτικά. Αν και δεν υπάρχουν αμφιβολίες ότι τα στεροειδή δεν είναι

υπεύθυνα για τα βιοδραστικότητα του GnSAF, ωστόσο αυτά έχουν σημαντικές επιδράσεις στην υπόφυση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Έχει παρατηρηθεί ότι η επώαση της E2 και της προγεστερόνης μαζί με hFF ενισχύει τη βιοδραστικότητα του GnSAF σε υποφύσεις επίμυων (Fowler et al., 1995b), παρά το γεγονός ότι η από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH και η ευαισθησία του κυττάρου αυξάνονται από την περαιτέρω αγωγή με τα στεροειδή (Turgeon & Waring, 1990). Η μακροπρόθεσμη (24ωρη) επώαση με E2, προγεστερόνη, ή E2+προγεστερόνη δεν υπερνικά τη GnSAF βιοδραστικότητα *in vitro*, αλλά μάλλον την καθιστά περισσότερο αποτελεσματική.

Ως γνωστό, η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και η διέγερση της PKC μεσολαβούν στην από τη GnRH προκαλούμενη αύξηση της LH *in vitro*. Σε υποφύσεις επίμυων, που είχε προεπιδράσει η E2, η 4ωρη επώαση με GnRH και E2 ή προγεστερόνη ή ένα διεγέρτη της PKC ή ιόντα ασβεστίου προκάλεσε σημαντική ενίσχυση της έκκρισης και της σύνθεσης της LH σε σύγκριση με τις επιδράσεις μόνης της GnRH. Η βιοδραστικότητα του GnSAF σε hFF προερχόμενο από γυναίκες υπό γοναδοτροφική διέγερση, μετά την αφαίρεση της ινχιμπίνης κατέστειλε σημαντικά τις ενισχυτικές επιδράσεις των παραπάνω ενώσεων (Fowler & Templeton, 1996). Ωστόσο, το hFF δεν είχε κατασταλτικές επιδράσεις στην από την οξεία χορήγηση προγεστερόνης ενίσχυση της από τη GnRH διεγερόμενης σύνθεσης της LH. Φαίνεται *in vitro* ότι τόσο η E2 όσο και η προγεστερόνη από μόνες τους δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τη βιοδραστικότητα του GnSAF. Παρ' όλα αυτά, υπό συνθήκες που μιμούνται την ημέρα του προοίστρου (προεπίδραση της E2), η

προγεστερόνη ανταγωνίζεται τις κατασταλτικές επιδράσεις του GnSAF στην από τη GnRH αυξημένη σύνθεση της LH. Ο GnSAF επίσης ανταγωνίζεται τις θετικές επιδράσεις του αυξημένου ενδοκυττάριου ασβεστίου και του διεγερμένου συστήματος της PKC, ακόμα και σε προετοιμασμένα με E2 γοναδοτρόφα κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι ο GnSAF ασκεί κατασταλτικές επιδράσεις στην οδό του δεύτερου αγγελιοφόρου, ο οποίος μεταφέρει το σήμα της GnRH μέσα στα γοναδοτρόφα κύτταρα (Fowler & Templeton, 1996).

Η ινχιμπίνη, η ακτιβίνη και η φολλιστατίνη επίσης τροποποιούν τις επιδράσεις της GnRH στην υπόφυση *in vitro*. Παρά τις αρνητικές επιδράσεις τους στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH σε βόειες υποφύσεις, τουλάχιστον κατά την περίοδο της αναπαραγωγής, ο GnSAF είναι ικανός να ξεπεράσει τη βιοδραστικότητα της ινχιμπίνης στο ελεύθερο από στεροειδή hFF (Fowler et al., 1990, 1992, 1993). Η επώαση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ινχιμπίνης με μικρή δόση (submaximal) HIC-εμπλουτισμένου GnSAF αυξάνει την καταστολή της από τη GnRH διεγερόμενης έκκρισης της LH σε υποφύσεις επιμύων σε σύγκριση με τις επιδράσεις μόνης της μορφής αυτής του GnSAF. Παρ' όλα αυτά, βρέθηκε ότι η φολλιστατίνη αύξησε τις κατασταλτικές επιδράσεις του GnSAF και της ινχιμπίνης στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH. Αυτές οι αθροιστικές επιδράσεις δεν είναι μη αναμενόμενες καθώς σε καλλιεργημένα γοναδοτρόφα κύτταρα επιμύων οι επιδράσεις της ινχιμπίνης και της φολλιστατίνης είναι επίσης αθροιστικές και η E2 αυξάνει τις επιδράσεις της ινχιμπίνης στη βασική έκκριση της FSH (Fowler & Templeton, 1996). Αν και η κυκλοφορούσα στο αίμα φολλιστατίνη πιθανότατα δεν έχει κάποιο ενδοκρινικό ρόλο (Messinis, 2000), η έκφραση

της στην υπόφυση αυξάνει κατά τη διάρκεια του κύματος της LH, υποδηλώνοντας κάποιο παρακρινικό ρόλο. Μπορεί η φολλιστατίνη τοπικά να τροποποιεί τις επιδράσεις του GnSAF στην υπόφυση *in vivo* (Fowler & Templeton, 1996). Επί του παρόντος δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ακτιβίνης και GnSAF, αν και όπως με τη φολλιστατίνη, μπορεί να υπάρχει μία παρακρινική επίδραση της ακτιβίνης στη βιοδραστικότητα του GnSAF.

#### B). GnRH υποδοχείς και GnRH self-priming

Το φυσικό και ακατέργαστο hFF, που περιέχει σημαντική βιοδραστικότητα GnSAF, δεν έχει καμία επίδραση στη σύνδεση της GnRH στους υποδοχείς της στην υπόφυση ή στον πλακούντα τόσο στον επίμου όσο και στον άνθρωπο (Fowler & Templeton, 1996). Επομένως, ο GnSAF δεν μπορεί να ασκεί τη δράση του με δέσμευση του υποδοχέα της GnRH. Είναι ωστόσο ασαφές, εάν ο GnSAF έχει κάποια επίδραση στον αριθμό των υποδοχέων της GnRH ή στην ενεργοποίησή τους. Ασφαλώς, υπάρχουν άλλοι τρόποι, με τους οποίους ο GnSAF θα μπορούσε να δράσει ώστε να παρέμβει στις επιδράσεις της GnRH πάνω στο γοναδοτρόφο κύτταρο. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με τη φύση και τον αριθμό των υποδοχέων του GnSAF στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης. Όσον αφορά στην υπόθεση ότι ο GnSAF εμποδίζει την αυτοπριμοδότηση της GnRH, δεν υπάρχουν πολλές ενδείξεις σχετικά με τις επιδράσεις του GnSAF στη διέγερση του δεύτερου αγγελιοφόρου *in vitro*. Έχει δειχτεί ότι ο ορός του αίματος ή το hFF γυναικών χωρίς ινχιμπίνη υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, με ή χωρίς αφαίρεση των στεροειδών ορμονών, μειώνει την ευαισθησία των βοείων



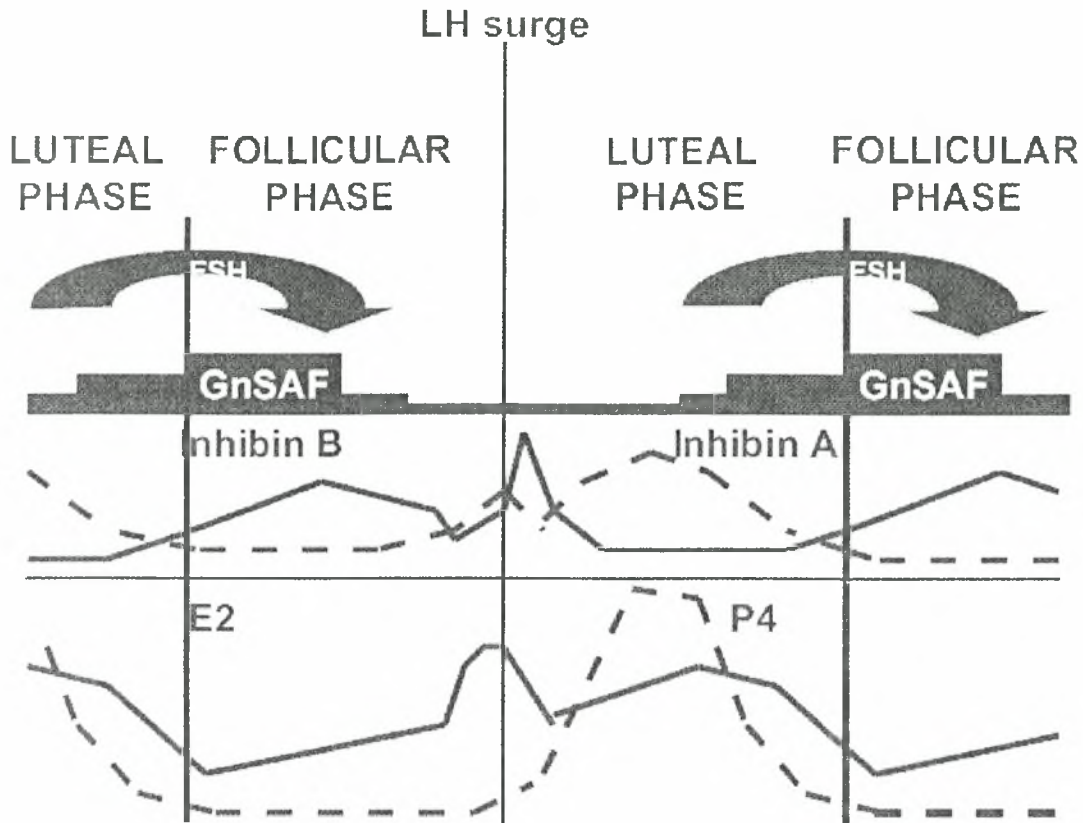
υποφύσεων στη GnRH (Fowler et al., 1994), καταστέλλοντας έτσι την αυτοπριμοδότηση της GnRH. Μία παρόμοια απάντηση, που προκαλούνταν από διεγέρτη της PKC, επίσης καταστέλλονταν από το ελεύθερο από ινχιμπίνη και στεροειδή hFF. Η χορήγηση δύο διαδοχικών ώσεων GnRH, με 60 min χρονική διαφορά μεταξύ τους, προκάλεσε το φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH in vitro σε υποφύσεις επιμύων και η προσθήκη του ελεύθερου από ινχιμπίνη και στεροειδή hFF (από συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης) κατέστειλε σημαντικά το φαινόμενο αυτό, ενώ η προγεστερόνη το ενίσχυσε. Η κατασταλτική επίδραση τόσο του GnSAF όσο και της μιφεπριστόνης διεγερμένη έκκριση της LH δεν αντιστρέφονταν με τη χορήγηση της προγεστερόνης, υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός που οδηγεί στον πλήρη ανταγωνισμό μεταξύ του GnSAF και του κύματος της LH μπορεί να περιλαμβάνει τον υποδοχέα της προγεστερόνης (Fowler & Templeton, 1996).

### ***Ο φυσιολογικός ρόλος του GnSAF στο γεννητικό κύκλο***

Βάσει των δεδομένων, που έχουν συσσωρευθεί μέχρι σήμερα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση για το φυσιολογικό ρόλο του GnSAF (Messinis, 2000, 2006), σύμφωνα με την οποία η βιοδραστικότητα του GnSAF στην κυκλοφορία κατά το πρώτο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης διατηρεί την υπόφυση σε μία κατάσταση χαμηλής ευαισθησίας στη GnRH. Η μείωση της παραγωγής του GnSAF κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο απελευθερώνει την υπόφυση από την καταστολή αυτή και επιτρέπει την ευαισθητοποιό επίδραση των αυξανόμενων επιπέδων της E2 στα

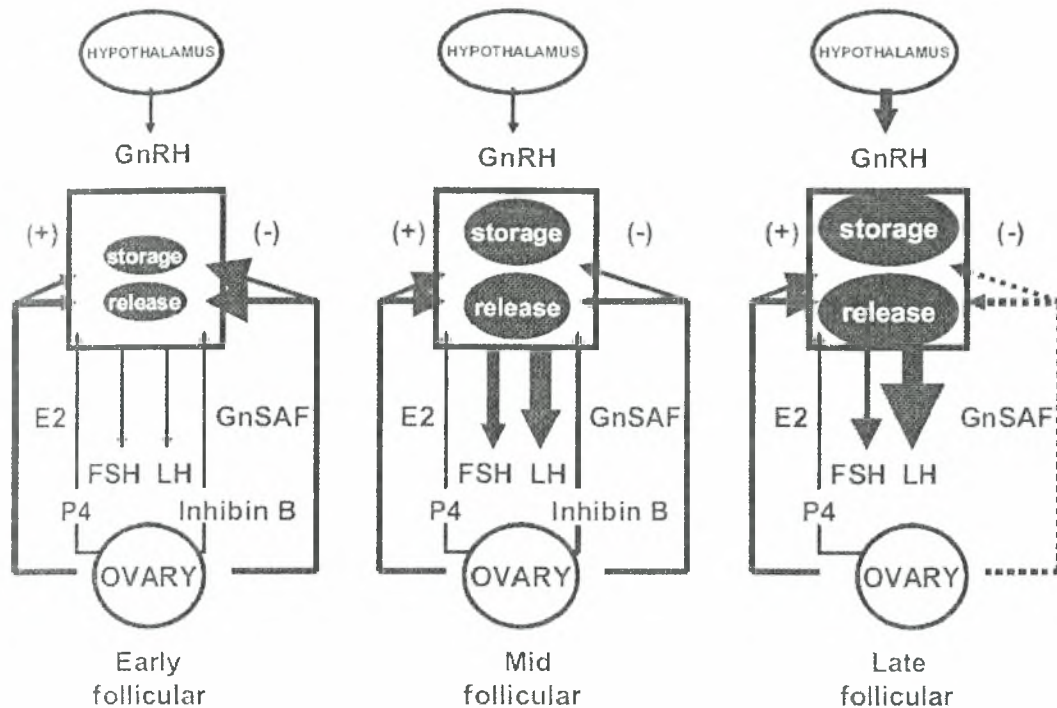
γοναδοτρόφα κύτταρα. Κατά τον τρόπο αυτό, η μέγιστη ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH λαμβάνει χώρα σε αυτό το στάδιο, έχοντας ως αποτέλεσμα την πλήρη έκφραση του ενδογενούς μεσοκύκλιου κύματος της LH (Messinis, 2000; 2006). Ο GnSAF ελέγχει με αρνητικό μηχανισμό feedback το εύρος του κύματος της LH και όχι το χρόνο έναρξης του, καθώς το κύμα της LH εκδηλώνεται σε οποιοδήποτε χρόνο της ωοθυλακικής φάσης, εφόσον οι συγκεντρώσεις της E2 του ορού υπερβούν τον ουδό του θετικού feedback, ενώ αυτό είναι αμβλυμένο στην πρώιμη και φυσιολογικό στην όψιμη ωοθυλακική φάση (Messinis, 2000; 2006).

Ο φυσιολογικός ρόλος του GnSAF στο γεννητικό κύκλο παρουσιάζεται στα Σχήματα 2 και 3.



Σχήμα 1.

Η δραστηριότητα του GnSAF κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου σε σχέση με τις μεταβολές των inhibin A, inhibin B, E2 και προγεστερόνης (P4). Θεωρείται ότι ο GnSAF παράγεται κατά την ωχρινική-ωοθυλακική μετάβαση, υπό την επίδραση της διακυκλικής αύξησης της FSH (Messinis, 2006).



Σχήμα 2.

Η υπόθεση για το φυσιολογικό ρόλο του GnSAF κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Ο GnSAF αλληλεπιδρά με την E2 στην υπόφυση για να μειώσει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH. Ο παράγοντας αυτός παράγεται κυρίως από τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και επομένως η δραστηκότητα του είναι υψηλή κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση. Η δραστηκότητα του GnSAF μειώνεται κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση και στο μέσον του κύκλου, υποβοηθώντας επομένως την ευαισθητοποιό επίδραση της E2 στην υπόφυση και την πλήρη έκφραση του ενδογενούς κύματος της LH. Η προγεστερόνη (P4) μπορεί να ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, ενώ η inhibin B μπορεί να μειώνει την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της FSH κατά την πρώιμη και τη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (Messinis, 2006).

---

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

**A. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

**B. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

**Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

**ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**Z. SUMMARY**

**H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## Α. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο κύριος σκοπός της μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των ωοθηκών στην έκκριση των γοναδοτροφινών ορμονών στις γυναίκες. Ειδικότερα, η μελέτη διεξήχθη για τους παρακάτω λόγους:

1. τη διερεύνηση του ρόλου της ωοθήκης στον τερματισμό του από την E2 προκαλούμενου κύματος της LH, ώστε να αποσαφηνισθούν περαιτέρω οι μηχανισμοί που ελέγχουν την έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες.
2. τη διερεύνηση του μηχανισμού, με τον οποίο οι ωοθήκες ελέγχουν την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση των LH και FSH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου.



## B. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη μελέτη περιλήφθηκαν συνολικά 26 γυναίκες, οι οποίες μελετήθηκαν σε δύο χωριστές ομάδες, ώστε να ελεγχθούν οι στόχοι της εργασίας. Έτσι, το υλικό χωρίζεται σε δύο μέρη καθώς επίσης οι μέθοδοι, τα αποτελέσματα και η συζήτηση.

### 1<sup>ο</sup> μέρος

#### Υλικό και Μέθοδοι

Στο 1<sup>ο</sup> μέρος της μελέτης περιλήφθηκαν 8 υγιείς γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους και χωρίς κλινικές ενδείξεις κλιμακτηρίου, ηλικίας 42-48 ετών. Τα χαρακτηριστικά των γυναικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι γυναίκες επιλέχθηκαν από εκείνες που υποβάλλονται σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων για καλοήθεις παθήσεις της μήτρας. Η ωοθυλακιορρηξία είχε επιβεβαιωθεί σε όλες τις γυναίκες με τη μέτρηση της προγεστερόνης του ορού και υπερηχογραφικό έλεγχο των ωοθηκών πριν από την είσοδο των γυναικών στη μελέτη.

Κάθε γυναίκα διερευνήθηκε σε δύο κύκλους, δηλαδή στον κύκλο-1 (ο οποίος χρησίμευσε ως control) και στον κύκλο-2, κατά τον οποίο υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων (σαλπγγγοωθηκεκτομία) υπό γενική αναισθησία. Οι ενδείξεις για την επέμβαση ήταν καλοήθεις παθήσεις της μήτρας, ενώ οι ωοθήκες ήταν φυσιολογικές, όπως επιβεβαιώθηκε με την ιστολογική εξέταση. Σε κάθε γυναίκα, η επέμβαση

διενεργήθηκε την ημέρα 3 του κύκλου (0900 h). Μεταξύ των δύο κύκλων υπήρξε διάστημα ενός μηνός. Και στους δύο κύκλους, στις γυναίκες χορηγήθηκε E2 μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων (Estraderm TTS; Novartis, Athens, Greece) στη δόση των 100 µg την ημέρα 3 (0900 h) και των 150 µg τις ημέρες 4 και 5.

Κατά τον κύκλο-2, το πρώτο αυτοκόλλητο της E2 χορηγήθηκε αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση. Ο σκοπός ήταν η επίτευξη συγκεντρώσεων E2 στην κυκλοφορία του αίματος παρόμοιων με εκείνες, που παρατηρούνται κατά την προωθυλακιορρηκτική περίοδο του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Η δόση της E2 επιλέχθηκε με βάση προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα (Messinis et al., 2001).

Δείγματα αίματος λαμβάνονταν από τις γυναίκες και στους δύο κύκλους κάθε 12 ώρες από τις ημέρες 3 έως 5 (0900 και 2100 h) και κάθε 6 ώρες (0900, 1500, 2100 and 0300 h) στη συνέχεια μέχρι την ημέρα 9 (0900 h). Η FSH, η LH και η E2 μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα αίματος. Η προγεστερόνη μετρήθηκε μόνο στα πρωινά δείγματα. Πριν από την επέμβαση, όλες οι γυναίκες ήταν σε καλή γενική κατάσταση με επίπεδα αιμοσφαιρίνης >12 g/dl. Δεν υπήρχαν διεγχειρητικές επιπλοκές και η διάρκεια της επέμβασης ήταν μικρότερη των 90 min. Η εκτιμώμενη απώλεια αίματος σε κάθε περίπτωση ήταν <300 ml. Η μετεγχειρητική περίοδος ήταν επίσης χωρίς επιπλοκές.

## Πίνακας 1.

Χαρακτηριστικά των γυναικών πριν από την έναρξη των πειραμάτων την ημέρα 3 του κύκλου-1 (control).

	Mean±SEM	Εύρος τιμών
<b>Ηλικία (έτη)</b>	44.7±0.6	42-48
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.7±1.7	21.3-34.2
<b>FSH (IU/l)</b>	12.1±2.4	3.2-23.3
<b>LH (IU/l)</b>	6.2±0.9	1.8-9.1
<b>Οιστραδιόλη (pmol/l)</b>	311.2±71.2	157.8-778.0
<b>Διάρκεια κύκλου (ημέρες)</b>	28.1±0.4	26-30

## 2<sup>ο</sup> μέρος

### Υλικό και Μέθοδοι

Η μελέτη περιέλαβε 18 υγιείς γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους, ηλικίας 42-48 ετών και φυσιολογικές συγκεντρώσεις FSH ορού κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση (<10 IU/l). Επίσης, τα επίπεδα προγεστερόνης του ορού κατά την 21<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου (>20 nmol/l) ήταν ενδεικτικά ωοθυλακιορρηξίας. Τα χαρακτηριστικά των γυναικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι γυναίκες επιλέχθηκαν από εκείνες, που υποβάλλονται σε

κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων για καλοήθεις παθήσεις της μήτρας.

Όλες οι γυναίκες διερευνήθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων (σαλπιγγωοθηκεκτομία) υπό γενική αναισθησία (0900 h). Οι γυναίκες χωρίσθηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με το αν τους χορηγήθηκαν ή όχι ωοθηκικά στεροειδή.

Στην ομάδα 1 (n=6), δεν χορηγήθηκε ορμονική θεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση.

Στην ομάδα 2 (n=6), στις γυναίκες χορηγήθηκε E2 μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων (Estraderm TTS; Novartis, Athens, Greece). Το πρώτο αυτοκόλλητο χορηγήθηκε την ημέρα της επέμβασης αμέσως μετά το πέρας της στη δόση των 100 µg/24 h. Περαιτέρω αυτοκόλλητα χορηγήθηκαν τις μετεγχειρητικές ημέρες 3 και 6.

Στην ομάδα 3 (n=6), στις γυναίκες χορηγήθηκε E2, όπως και στην ομάδα 2 και επιπλέον προγεστερόνη (Utrogestan capsules 100 mg/capsule; Faran, Athens, Greece) ενδοκολπικά στη δόση των 300 mg ημερησίως (100 mg ανά οκτάωρο). Η πρώτη δόση της προγεστερόνης χορηγήθηκε την ημέρα της επέμβασης αμέσως μετά το πέρας της και η τελευταία τη μετεγχειρητική ημέρα 6.

Στις γυναίκες, που χορηγήθηκαν τα στεροειδή, δεν υπήρχαν αντενδείξεις για

τη χορήγηση τους. Η χειρουργική επέμβαση πραγματοποιήθηκε μεταξύ της πρώιμης και της μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου, δηλαδή 5 ημέρες μετά την ανίχνευση του ενδογενούς κύματος της LH, η οποία γίνονταν με μετρήσεις της LH σε καθημερινά δείγματα αίματος, τα οποία λαμβάνονταν από τη στιγμή που το μέγεθος του ωοθυλακίου στον υπερηχογραφικό έλεγχο ήταν 16 mm σε διάμετρο.

Σε όλες τις γυναίκες, διερευνήθηκε η απάντηση της υπόφυσης στη GnRH σε εφ' άπαξ ενδοφλέβια δόση 10 µg (Relefact LH-RH, 0.1 mg/ml; Hoechst, Germany) καθημερινά, αρχίζοντας το πρωί λίγο πριν τη χειρουργική επέμβαση και τελειώνοντας τη μετεγχειρητική ημέρα 7, δηλαδή την ημέρα της εξόδου από την Κλινική. Δείγματα αίματος σε σχέση με κάθε ένεση GnRH (χρόνος 0) λαμβάνονταν στα -15, 0 και 30 min. Το χρονικό σημείο των 30 min επιλέχθηκε γιατί σε αυτό παρατηρείται η μέγιστη απάντηση της υπόφυσης στη GnRH, αντιπροσωπεύοντας την ευαισθησία της υπόφυσης στην ορμόνη αυτή (Wang et al., 1976, Messinis and Templeton, 1991a). Σε όλα τα δείγματα αίματος, μετρήθηκαν οι FSH και LH, ενώ η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη μετρήθηκαν στα δείγματα που είχαν ληφθεί στα -15 και 0 min. Κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης επιβεβαιώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις η παρουσία ωχρού σωματίου στη μία από τις δύο ωοθήκες. Πριν από την επέμβαση, όλες οι γυναίκες ήταν σε καλή κατάσταση γενική με επίπεδα αιμοσφαιρίνης >12 g/dl. Δεν υπήρχαν διεγχειρητικές επιπλοκές και η εκτιμώμενη απώλεια αίματος σε κάθε περίπτωση ήταν <300 ml. Η μετεγχειρητική περίοδος ήταν επίσης χωρίς επιπλοκές.

## Πίνακας 2.

Χαρακτηριστικά των γυναικών πριν από την έναρξη των πειραμάτων την ημέρα 3 του κύκλου.

	Mean±SEM	Εύρος τιμών
Ηλικία (έτη)	44.2±0.5	42-46
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26.4±1.8	22.6-32.9
FSH (IU/l)	7.2±1.9	3.1-9.3
LH (IU/l)	5.8±0.8	1.2-7.6
Οιστραδιόλη (pmol/l)	293.2±89.6	143.8-706.5
Διάρκεια κύκλου (ημέρες)	28.0±0.5	26-31

### Ορμονικές μετρήσεις

#### 1<sup>ο</sup> μέρος

Όλα τα δείγματα αίματος αμέσως μετά τη λήψη τους φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 15 min και ο ορός αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι τη μέτρηση των ορμονών. Οι FSH, LH και E2 μετρήθηκαν στον ορό χρησιμοποιώντας μία μικροσωματιδιακή ανοσολογική μέθοδο χημειοφωταύγειας (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) (Architect FSH, Architect LH και Architect Estradiol αντίστοιχα, Abbott Laboratories). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IU/l για τις FSH και LH, και ως pmol/l για την E2. Η



προγεστερόνη του ορού μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μία μικροσωματιδιακή ανοσοενζυμική μέθοδο (Microparticle Enzyme Immunoassay) (AxSYM Progesterone, Abbott Laboratories, USA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol/l. Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης των FSH, LH, E2 και προγεστερόνης ήταν 0.05 IU/l, 0.07 IU/l, 65.7 pmol/l και 0.6 nmol/l αντίστοιχα. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ και εντός των μεθόδων (inter- and intra-assay coefficients of variation) ήταν 3.1 και 3.4%, 2.0 και 3.4%, 4.5 και 6.0% και 6.0 και 6.7% αντίστοιχα.

## 2<sup>ο</sup> μέρος

Για τη μέτρηση των FSH και LH στον ορό, χρησιμοποιήθηκε μία μικροσωματιδιακή ανοσολογική μέθοδος (microparticle enzyme immunoassay -MEIA) (AxSYM FSH και AxSYM LH αντίστοιχα; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης των FSH και LH ήταν 0.37 και 0.50 IU/l αντίστοιχα. Η οιστραδιόλη μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MEIA (AxSYM Estradiol; Abbott Laboratories). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης της οιστραδιόλης ήταν 73 pmol/l. Για τη μέτρηση της προγεστερόνης χρησιμοποιήθηκε μία ανοσολογική μέθοδο χημειοφωταύγειας (Immulite progesterone; DPC, Los Angeles, CA, USA). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης της προγεστερόνης ήταν 0.6 nmol/l. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ και εντός των μεθόδων (inter- and intra-assay coefficients of variation) για τις FSH, LH, οιστραδιόλη και προγεστερόνη ήταν 3.2 και 4.1, 2.6 και 4.2, 2.3 και 5.5, και 8.0 και 4.1% αντίστοιχα.

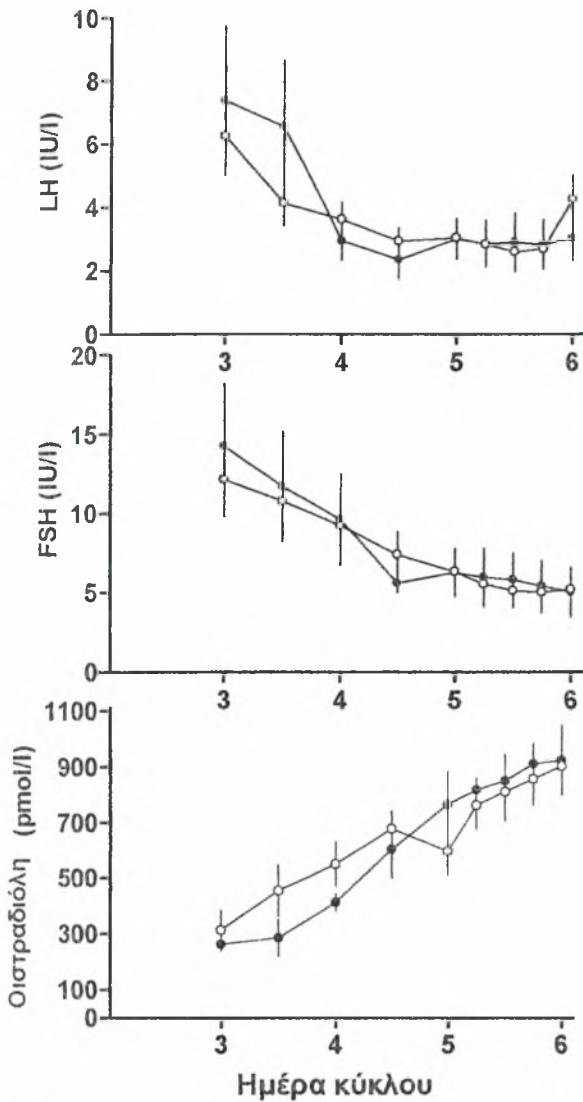
### *Στατιστική ανάλυση των δεδομένων*

Οι τιμές των ορμονικών μετρήσεων είχαν κανονική κατανομή (one sample Kolmogorov-Smirnov test). Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε το paired t-test, την two-way analysis of variance (ANOVA), την repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA), ακολουθούμενη από το Bonferroni post hoc testing και την one-way analysis of variance (ANOVA), ακολουθούμενη από το Dunnet's post hoc testing. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως mean±SEM. Η τιμή του  $\alpha$  για τον καθορισμό της στατιστικής σημαντικότητας ήταν 0.05. Το στατιστικό πρόγραμμα, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν το SPSS 10.0.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1ο μέρος

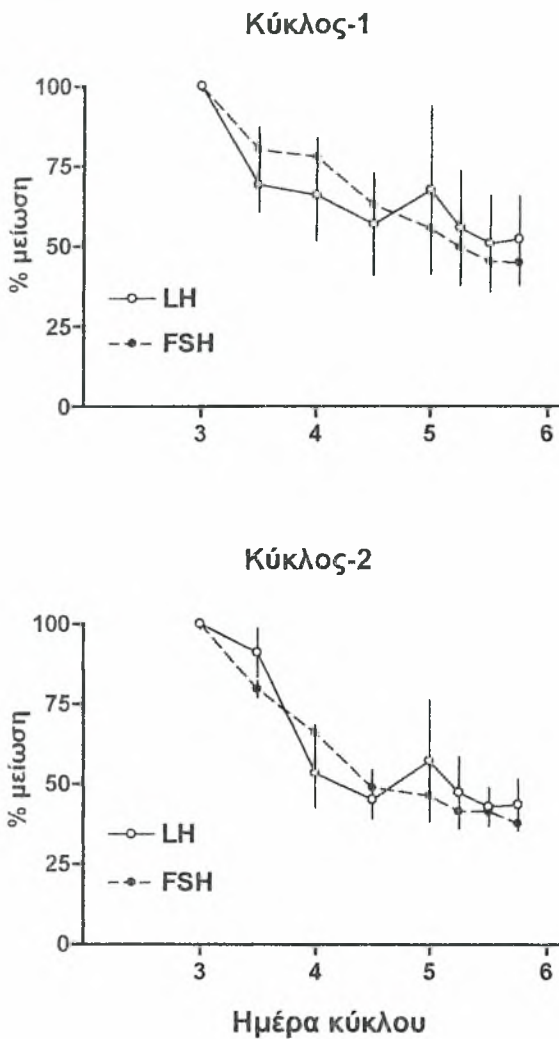
Οι βασικές τιμές των LH, FSH και E2 πριν από την έναρξη των πειραμάτων κατά την ημέρα 3 του κύκλου δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων (Σχήμα 1). Ως αποτέλεσμα της χορήγησης της E2, οι τιμές της E2 στον ορό του αίματος αυξήθηκαν σημαντικά και παρόμοια στους δύο κύκλους, δηλαδή στον κύκλο-1 από  $311.2 \pm 71.2$  σε  $894.7 \pm 85.8$  pmol/l στις 72 ώρες ( $p < 0.001$ ) και στον κύκλο -2 από  $260.9 \pm 22.0$  σε  $914.9 \pm 124.1$  pmol/l στις 72 ώρες ( $p < 0.001$ ). Η αύξηση των τιμών της E2 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων της LH και της FSH και στους δύο κύκλους. Πιο συγκεκριμένα, στις 66 ώρες μετά την έναρξη της χορήγησης της E2, οι τιμές της LH και της FSH στον ορό μειώθηκαν στον κύκλο-1 από  $6.2 \pm 0.9$  σε  $2.6 \pm 0.3$  IU/l ( $p < 0.001$ ) και από  $12.1 \pm 2.4$  σε  $5.0 \pm 0.9$  IU/l αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ) και στον κύκλο-2 από  $7.3 \pm 2.3$  σε  $2.8 \pm 0.7$  IU/l ( $p < 0.001$ ) και από  $14.3 \pm 3.9$  σε  $5.4 \pm 1.6$  IU/l αντίστοιχα ( $p < 0.05$ ).



Σχήμα 1.

Συγκεντρώσεις των LH, FSH και οιστραδιόλης στον ορό (mean $\pm$ SEM) κατά τη χορήγηση οιστραδιόλης σε φυσιολογικές γυναίκες (n=8) σε έναν (○) κύκλο control (κύκλος-1) και έναν επακόλουθο (●) κύκλο (κύκλος-2), στον οποίο διενεργήθηκε κοιλιακή ολική υστερεκτομία με αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία (ημέρα 3). Η οιστραδιόλη χορηγήθηκε με διαδερμικά αυτοκόλλητα στις δόσεις των 100  $\mu$ g την ημέρα 3 και 150  $\mu$ g τις ημέρες 4 και 5.

Το ποσοστό μείωσης της LH ήταν παρόμοιο με αυτό της FSH σε κάθε χρονικό σημείο και στους δύο κύκλους (Σχήμα 2).



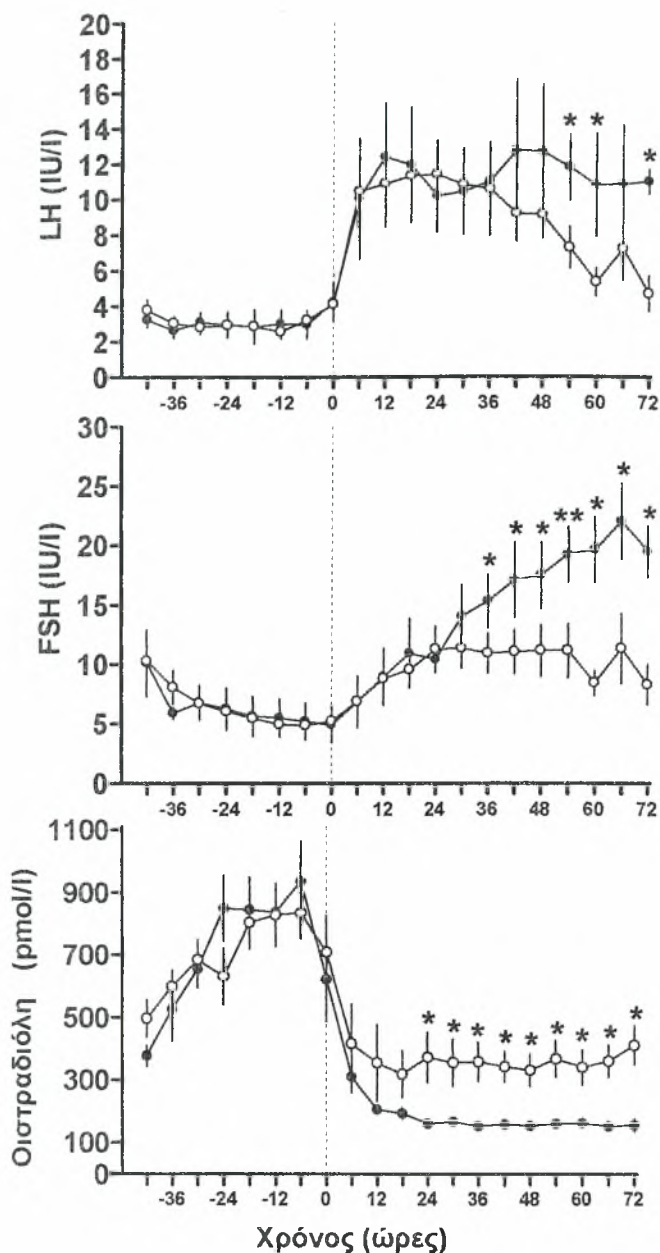
Σχήμα 2.

Ποσοστό μείωσης των τιμών της (○) LH και της (●) FSH (mean±SEM) κατά τη χορήγηση οιστραδιόλης σε φυσιολογικές γυναίκες (n=8) σε έναν κύκλο control (κύκλος-1) και έναν επακόλουθο κύκλο (κύκλος-2), στον οποίο διενεργήθηκε κοιλιακή ολική υστερεκτομία με αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία (ημέρα 3). Η οιστραδιόλη χορηγήθηκε με διαδερμικά αυτοκόλλητα στις δόσεις των 100 μg την ημέρα 3 και 150 μg τις ημέρες 4 και 5.

πρώτου διαδερμικού αυτοκόλλητου της E2 μέχρι την έναρξη του κύματος της LH ήταν στον κύκλο-1 ( $73.5 \pm 1.5$  ώρες) παρόμοιο με αυτό στον κύκλο-2 ( $76.5 \pm 2.5$  ώρες). Ο τύπος των μεταβολών των τιμών της E2 πριν από την έναρξη του κύματος της LH ήταν παρόμοιος και στους δύο κύκλους χωρίς διαφορές μεταξύ τους. Το κύμα της LH άρχισε 6 ώρες κατά μέσο όρο μετά από τη μέγιστη τιμή της E2. Μετά από την έναρξη του κύματος της LH, οι τιμές της E2 μειώθηκαν και στους δύο κύκλους χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους για τις πρώτες 18 ώρες. Ο τύπος αυτός μεταβολών των συγκεντρώσεων της E2 πριν και κατά τη διάρκεια του κύματος της LH είναι παρόμοιος με αυτόν που παρατηρείται πριν και κατά τη διάρκεια του μεσοκύκλιου κύματος της LH στο φυσιολογικό κύκλο γυναικών (Messinis & Templeton, 1988). Ωστόσο, οι τιμές της E2 από τις 24 ώρες μετά την έναρξη του κύματος της LH μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας ήταν σημαντικά χαμηλότερες στον κύκλο-2 σε σύγκριση με τον κύκλο-1 (Σχήμα 3).



Μετά την καταστολή των συγκεντρώσεων των LH και FSH, όλες οι γυναίκες εκδήλωσαν ένα ενδογενές κύμα της LH. Τα χαρακτηριστικά του κύματος παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Η πρώτη τιμή της LH, που ήταν μεγαλύτερη από το 180% της μέσης τιμής των προηγούμενων τεσσάρων δειγμάτων θεωρήθηκε ως ένδειξη ότι το κύμα της LH είχε αρχίσει και το χρονικό σημείο του προηγούμενου δείγματος θεωρήθηκε ως ο χρόνος της έναρξης του



Σχήμα 3.

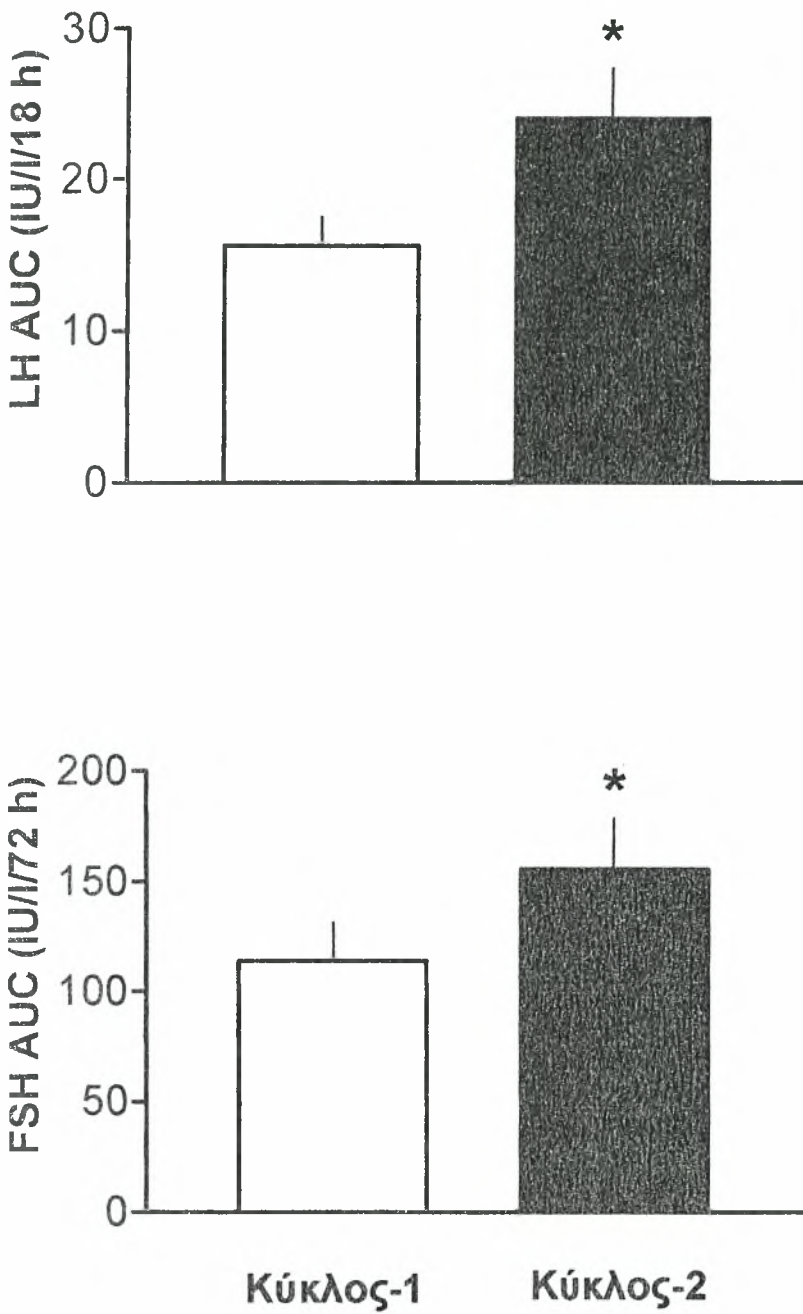
Συγκεντρώσεις των LH, FSH και οιστραδιόλης στον ορό (mean±SEM) πριν και κατά τη διάρκεια κύματος της LH που προκλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης σε φυσιολογικές γυναίκες (n=8) σε έναν (○) κύκλο control (κύκλος-1) και έναν επακόλουθο (●) κύκλο (κύκλος-2), στον οποίο διενεργήθηκε κοιλιακή ολική υστερεκτομία με αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοσωθηκεκτομία (ημέρα 3). Η οιστραδιόλη χορηγήθηκε με διαδερμικά αυτοκόλλητα στις δόσεις των 100 μg την ημέρα 3 και 150 μg τις ημέρες 4 και 5. Τα δεδομένα παρουσιάζονται αναφορικά με το χρόνο έναρξης του κύματος της LH (χρόνος 0). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

Οι τιμές της LH πριν από την έναρξη του κύματος δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων σε κάθε χρονικό σημείο (Σχήμα 3). Και στους δυο κύκλους, διαπιστώθηκε ένα ανιόν σκέλος των τιμών της LH, το οποίο έφθασε τη μέγιστη τιμή στις 18 ώρες από την έναρξη του κύματος στον κύκλο-1 ( $11.4 \pm 1.9$  IU/l,  $p < 0.05$ ) και στις 12 ώρες στον κύκλο-2 ( $12.4 \pm 3.1$  IU/l,  $p < 0.05$ ). Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο χρονικό διάστημα από την έναρξη του κύματος της LH μέχρι τη μέγιστη τιμή της LH μεταξύ των δύο κύκλων. Επίσης και στους δύο κύκλους, οι τιμές της LH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 12 και 18 ωρών. Στη συνέχεια, στον κύκλο-1 οι τιμές της LH μειώθηκαν βαθμιαία και σημαντικά μέχρι τις 72 ώρες ( $4.7 \pm 1.0$  IU/l) από την έναρξη του κύματος ( $p < 0.05$ ). Αντίθετα, στον κύκλο-2 μετά την επίτευξη της μέγιστης τιμής, οι τιμές της LH παρέμειναν σταθερές, χωρίς τάση μείωσης μέχρι τις 72 ώρες ( $11.0 \pm 0.7$  IU/l) από την έναρξη του κύματος. Κατά τη διάρκεια του κύματος, οι τιμές της LH ήταν παρόμοιες μεταξύ των δύο κύκλων για τις πρώτες 36 ώρες και στη συνέχεια ήταν υψηλότερες στον κύκλο-2 σε σύγκριση με τον κύκλο-1 (Σχήμα 3). Η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική στις 54, 60 και 72 ώρες ( $p < 0.05$ ). Στις 72 ώρες από την έναρξη του κύματος, η τιμή της LH στον κύκλο-1 ( $4.7 \pm 1.0$  IU/l) ήταν παρόμοια με αυτή κατά το χρόνο της έναρξης του κύματος ( $4.1 \pm 0.7$  IU/l).

Μετά την αρχική καταστολή, οι τιμές της FSH έδειξαν ένα τύπο μεταβολών που έμοιαζε με κύμα στον κύκλο-1, αλλά το κύμα ήταν μικρότερο του κύματος της LH. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ένα ανιόν σκέλος των τιμών της FSH με μέγιστη τιμή στις 24 ώρες ( $11.3 \pm 1.9$  IU/l,  $p < 0.05$ ) (Σχήμα 3). Στη συνέχεια, οι τιμές της FSH παρέμειναν σταθερές μέχρι το τέλος της πειραματικής

περιόδου. Αντίθετα, στον κύκλο-2, οι τιμές της FSH στον ορό παρουσίασαν συνεχόμενη αύξηση από την έναρξη του κύματος μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Οι τιμές της FSH ήταν παρόμοιες μεταξύ των δύο κύκλων πριν από την έναρξη του κύματος και για τις πρώτες 30 ώρες από την έναρξη του κύματος, αλλά στη συνέχεια ήταν σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο-2 σε σύγκριση με τον κύκλο-1 σε όλα τα χρονικά σημεία (Σχήμα 3).

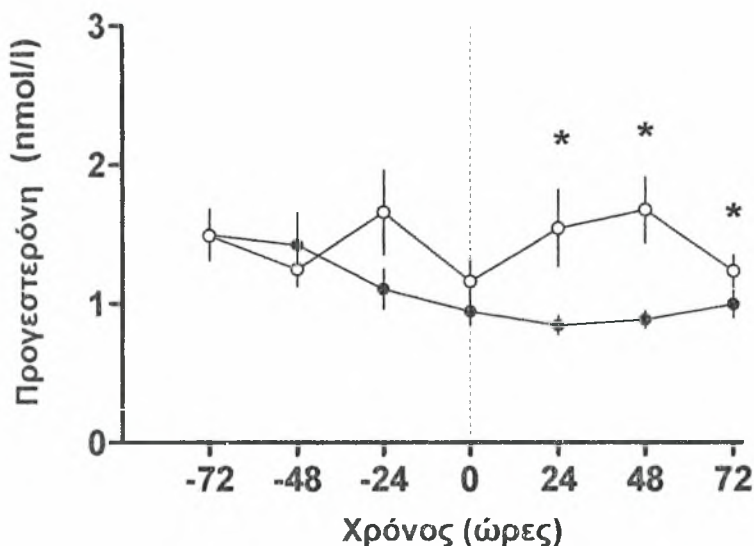
Όταν υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve - AUC) των συγκεντρώσεων της LH, βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του κύκλου-1 ( $15.6 \pm 1.9$  IU/l ανά 18 ώρες) και του κύκλου-2 ( $24 \pm 3.3$  IU/l ανά 18 ώρες) από το χρονικό σημείο των 54 ωρών μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 4). Η AUC της FSH ήταν σημαντικά υψηλότερη στον κύκλο-2 ( $155.5 \pm 23$  IU/l ανά 72 ώρες) από εκείνη στον κύκλο-1 ( $113.9 \pm 17.5$  IU/l ανά 72 ώρες) από την έναρξη του κύματος της LH μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4.

Οι περιοχές κάτω από την καμπύλη (AUC) των συγκεντρώσεων των LH και FSH αντίστοιχα (mean±SEM) στους δύο κύκλους. \* $p < 0.05$

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό του αίματος δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων πριν από την έναρξη του κύματος της LH (Σχήμα 5). Ωστόσο, οι τιμές της προγεστερόνης στον κύκλο-2 παρουσίασαν μία βαθμιαία μείωση από την ημέρα της αμφοτερόπλευρης ωθηκεκτομίας ( $1.4 \pm 0.13$  nmol/l) μέχρι το τέλος του πειράματος ( $0.89 \pm 0.09$  nmol/l) ( $p < 0.05$ ). Μετά την έναρξη του κύματος της LH, οι τιμές της προγεστερόνης ήταν στον κύκλο-2 σημαντικά χαμηλότερες από ό,τι στον κύκλο-1 ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 5).



Σχήμα 5.

Συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό (mean $\pm$ SEM) πριν και κατά τη διάρκεια κύματος της LH που προκλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης σε φυσιολογικές γυναίκες (n=8) σε έναν (○) κύκλο control (κύκλος-1) και έναν επακόλουθο (●) κύκλο (κύκλος-2), στον οποίο διενεργήθηκε κοιλιακή ολική υστερεκτομία με αμφοτερόπλευρη σαλπιγγωοθηκεκτομία (ημέρα 3). Η οιστραδιόλη χορηγήθηκε με διαδερμικά αυτοκόλλητα στις δόσεις των 100  $\mu$ g την ημέρα 3 και 150  $\mu$ g τις ημέρες 4 και 5. Τα δεδομένα παρουσιάζονται αναφορικά με το χρόνο έναρξης του κύματος της LH (χρόνος 0). \*  $p < 0.05$ .

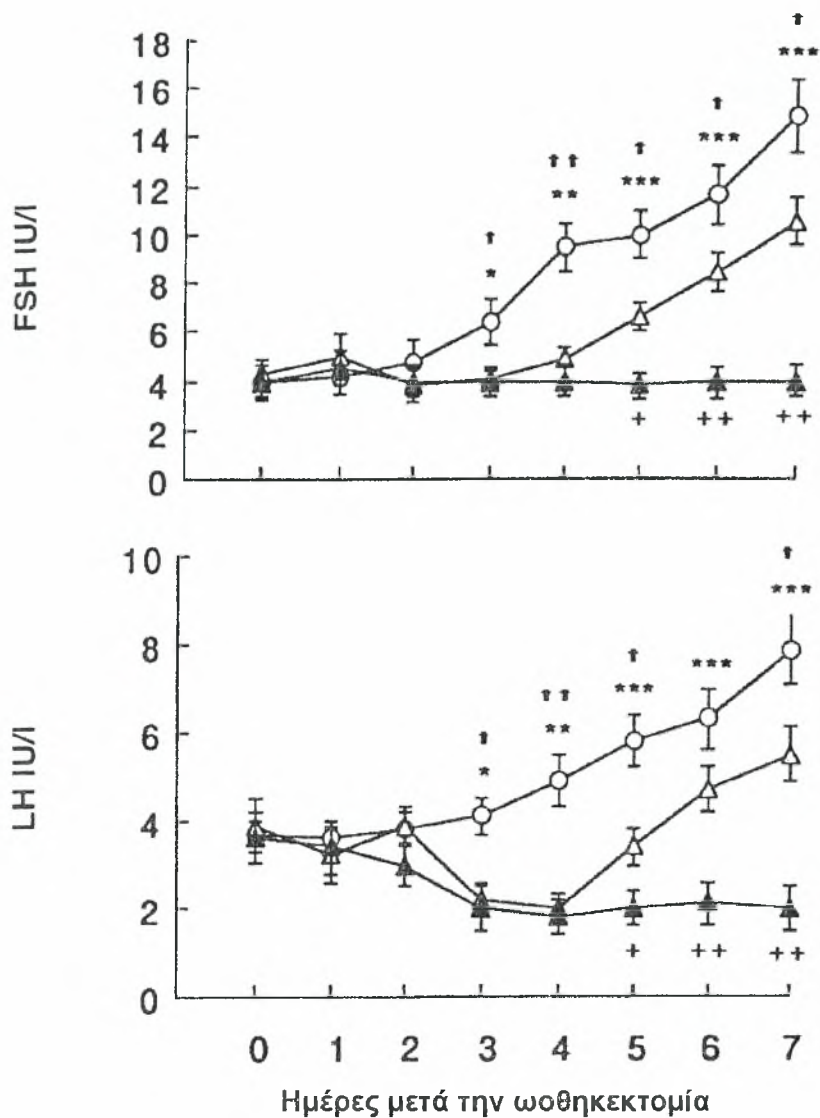


Όλες οι γυναίκες στον κύκλο-1 εμφάνισαν αιμορραγία εκ διακοπής μετά το τέλος του πειράματος. Στον κύκλο αυτό, σε όλες τις γυναίκες η ωοθυλακιορρηξία επιβεβαιώθηκε με υπερηχογραφία στις 12-16 ημέρες μετά το τέλος του πειράματος και οι γυναίκες είχαν έμμηνο ρύση 12-14 ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία.

## 2<sup>ο</sup> μέρος

Για κάθε ορμόνη, η βασική τιμή της υπολογίσθηκε από το μέσο όρο των τιμών στα -15 και 0 min. Στο Σχήμα 6, παρουσιάζονται οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων των FSH και LH πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση στις τρεις ομάδες των γυναικών. Οι προεγχειρητικές βασικές τιμές των ορμονών αυτών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων. Μετά την επέμβαση, οι τιμές της FSH στον ορό στην ομάδα 1 αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι την ημέρα 7 ( $p < 0.01$ ). Στην ομάδα 2, οι τιμές της FSH στον ορό αρχικά παρέμειναν σταθερές μέχρι την μετεγχειρητική ημέρα 4, αλλά άρχισαν να αυξάνουν σημαντικά στη συνέχεια μέχρι την ημέρα 7 ( $p < 0.01$ ). Τέλος, στην ομάδα 3 οι τιμές της FSH δεν αυξήθηκαν αλλά παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη μετεγχειρητική περίοδο. Οι τιμές της FSH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα 1 από ό,τι στις άλλες δύο ομάδες κατά τις ημέρες 3-7 και στην ομάδα 2 σημαντικά υψηλότερες από ό,τι στην ομάδα 3 κατά τις ημέρες 5-7 (Σχήμα 6). Οι τιμές της LH στον ορό, στην ομάδα 1 παρουσίασαν σταδιακή αύξηση μέχρι τη μετεγχειρητική ημέρα 7 ( $p < 0.01$ ). Στην ομάδα 2, οι τιμές της LH παρέμειναν αμετάβλητες μέχρι την ημέρα 4 και αυξήθηκαν σημαντικά στη συνέχεια ( $p < 0.05$ ), ενώ στην ομάδα 3 όχι μόνο δεν αυξήθηκαν μετεγχειρητικά αλλά

παρουσίασαν και τάση μείωσης (Σχήμα 6). Οι τιμές της LH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα 1 από ό,τι στις άλλες δύο ομάδες κατά τις ημέρες 3-7 και στην ομάδα 2 σημαντικά υψηλότερες από ό,τι στην ομάδα 3 κατά τις ημέρες 5-7 (Σχήμα 6). Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (ημέρα 7) στην ομάδα 1, οι τιμές της FSH αυξήθηκαν 3.5 φορές και οι τιμές της LH 2 φορές.

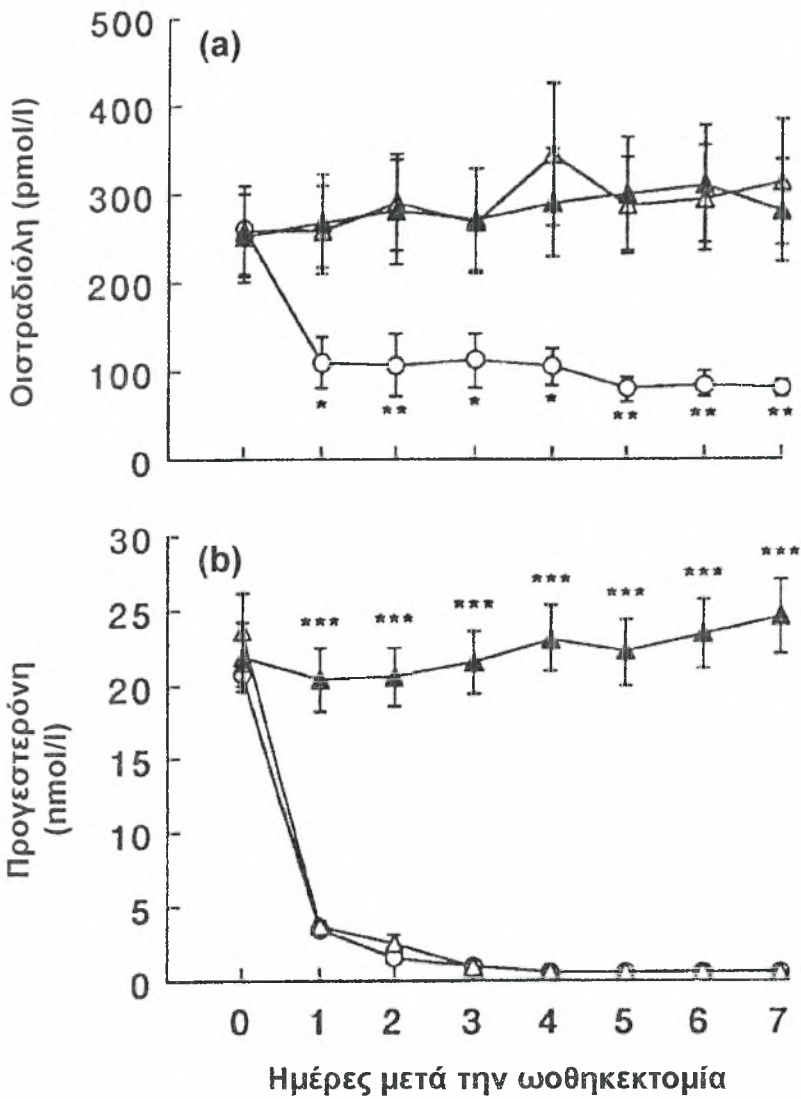


Σχήμα 6.

Συγκεντρώσεις των FSH και LH στον ορό πριν και μετά την υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία, η οποία διενεργήθηκε κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση (ημέρα 0) σε 18 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Από τις γυναίκες αυτές, οι 6 (O) δεν έλαβαν ορμονική αγωγή μετεγχειρητικά (ομάδα 1), οι 6 (Δ) έλαβαν οιστραδιόλη μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων τις ημέρες 0, 3 και 6 (ομάδα 2) και οι υπόλοιπες 6 (▲) έλαβαν οιστραδιόλη, όπως στην ομάδα 2 και προγεστερόνη διακολλητικά τις ημέρες 0-6 (ομάδα 3). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (διαφορά από την ομάδα 3). †  $p < 0.05$ ; ††  $p < 0.01$  (διαφορά από την ομάδα 2). +  $p < 0.05$ ; ++  $p < 0.01$  (διαφορά από την ομάδα 2).

Στο σχήμα 7 παρουσιάζονται οι τιμές της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης πριν και μετά τη χειρουργική επέμβαση στις 3 ομάδες των γυναικών. Οι προεγχειρητικές βασικές τιμές των ορμονών αυτών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 3 ομάδων. Οι συγκεντρώσεις της E2 στον ορό, στην ομάδα 1 μειώθηκαν σημαντικά μετά την επέμβαση ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 7). Αντίθετα, στις ομάδες 2 και 3 οι τιμές της E2 του ορού δεν μειώθηκαν μετά την ωοθηκεκτομία, αλλά παρέμειναν σε επίπεδα (μεταξύ  $247 \pm 45$  και  $345 \pm 69$  pmol/l), τα οποία δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά από αυτά πριν από την επέμβαση ( $251 \pm 51$  και  $250 \pm 49$  pmol/l αντίστοιχα). Τα επίπεδα της οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερα στις ομάδες 2 και 3 από ό,τι στην ομάδα 1 κατά τις ημέρες 1-7 (Σχήμα 7).

Οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης παρουσίασαν απότομη μείωση στις ομάδες 1 και 2 μετά την επέμβαση ( $p < 0.001$ ). Στην ομάδα 3, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης του ορού δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά την επέμβαση, παραμένοντας σε επίπεδα (μεταξύ  $20.3 \pm 2.1$  και  $24.6 \pm 2.5$  nmol/l), τα οποία δεν ήταν διέφεραν σημαντικά από αυτά πριν την επέμβαση ( $21.8 \pm 4.3$  nmol/l). Τα επίπεδα της προγεστερόνης στην ομάδα 3 ήταν σημαντικά υψηλότερα από ό,τι στις ομάδες 1 και 2 κατά τις ημέρες 1-7 (Σχήμα 7).

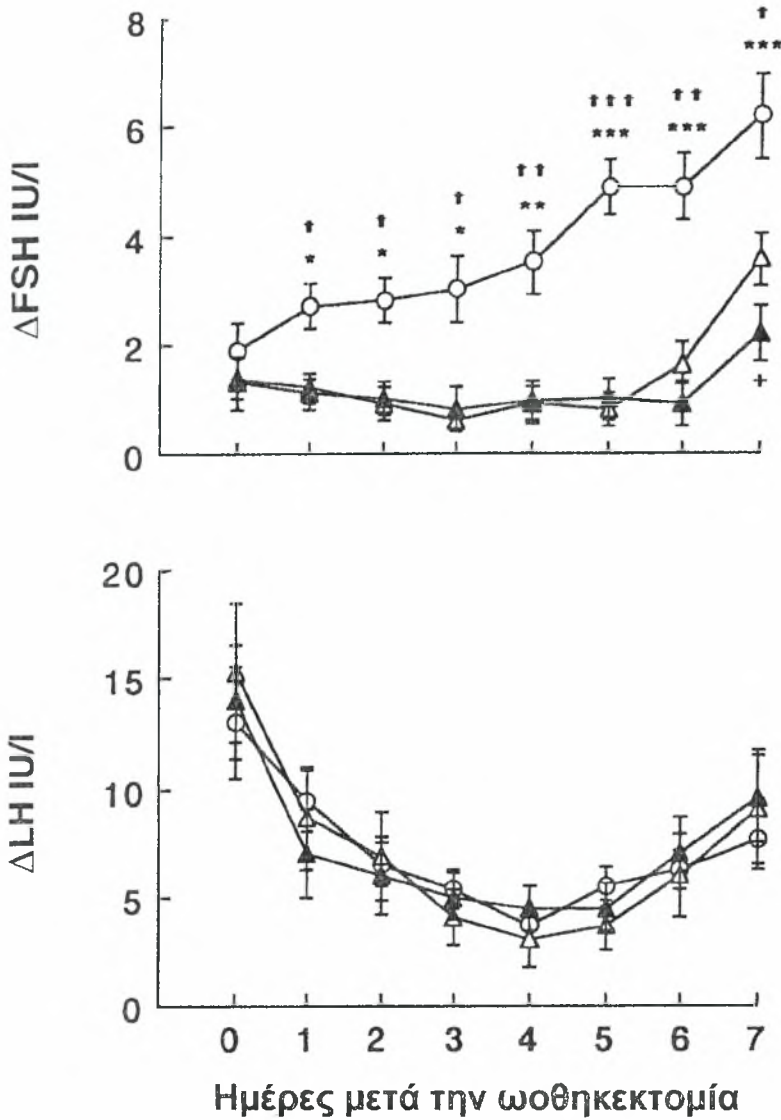


Σχήμα 7.

Συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στον ορό πριν και μετά την υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία, η οποία διενεργήθηκε κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση (ημέρα 0) σε 18 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Από τις γυναίκες αυτές, οι 6 (O) δεν έλαβαν ορμονική αγωγή μετεγχειρητικά (ομάδα 1), οι 6 (Δ) έλαβαν οιστραδιόλη μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων τις ημέρες 0, 3 και 6 (ομάδα 2) και οι υπόλοιπες 6 (▲) έλαβαν οιστραδιόλη, όπως στην ομάδα 2 και προγεστερόνη διακολλητικά τις ημέρες 0–6 (ομάδα 3). (a) \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (διαφορά από τις ομάδες 2 και 3). (b) \*\*\* $p < 0.001$  (διαφορά από τις ομάδες 1 και 2).

Σε κάθε πείραμα GnRH, η απάντηση των FSH και LH στη GnRH υπολογίσθηκε ως η απόλυτη αύξηση στα 30 min από τη βασική τιμή ( $\Delta$ FSH και  $\Delta$ LH αντίστοιχα). Οι τιμές των  $\Delta$ LH και  $\Delta$ FSH πριν από την επέμβαση δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων (Σχήμα 8). Στην ομάδα 1, οι τιμές της  $\Delta$ FSH μετά την επέμβαση αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι τη μετεγχειρητική ημέρα 7 ( $p < 0.001$ ). Αντίθετα, στις ομάδες 2 και 3, οι τιμές της  $\Delta$ FSH παρέμειναν αμετάβλητες μέχρι τις ημέρες 5 και 6 αντίστοιχα, μετά τις οποίες οι τιμές αυξήθηκαν σημαντικά ( $p < 0.05$ ). Οι τιμές της  $\Delta$ FSH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα 1 από ό,τι στις άλλες δύο ομάδες κατά τις ημέρες 1-7 και στην ομάδα 2 σημαντικά υψηλότερες από ό,τι στην ομάδα 3 κατά την ημέρα 7 (Σχήμα 8). Αντίθετα με τη  $\Delta$ FSH, οι τιμές της  $\Delta$ LH έδειξαν τον ίδιο τύπο μεταβολών και στις τρεις ομάδες καθ' όλη τη μετεγχειρητική περίοδο (Σχήμα 8). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές της  $\Delta$ LH μειώθηκαν σταδιακά μέχρι την ημέρα 4 ( $p < 0.01$ ), αυξανόμενες σημαντικά στη συνέχεια μέχρι τη μετεγχειρητική ημέρα 7 ( $p < 0.05$ ). Σε όλα τα χρονικά σημεία, οι τιμές της  $\Delta$ LH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων.





Σχήμα 8.

Απαντήσεις των FSH ( $\Delta$ FSH) και LH ( $\Delta$ LH) στα 30 min στη GnRH (10  $\mu$ g i.v.) πριν και μετά από υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία, η οποία διενεργήθηκε κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση (ημέρα 0) σε 18 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Από τις γυναίκες αυτές, οι 6 (O) δεν έλαβαν ορμονική αγωγή μετεγχειρητικά (ομάδα 1), οι 6 ( $\Delta$ ) έλαβαν οιστραδιόλη μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων τις ημέρες 0, 3 και 6 (ομάδα 2) και οι υπόλοιπες 6 ( $\blacktriangle$ ) έλαβαν οιστραδιόλη, όπως στην ομάδα 2 και προγεστερόνη διακοπτικά τις ημέρες 0–6 (ομάδα 3). \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 (διαφορά από την ομάδα 3). † $p$ <0.05; †† $p$ <0.01; ††† $p$ <0.001 (διαφορά από την ομάδα 1). + $p$ <0.05 (διαφορά από την ομάδα 2).

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1<sup>ο</sup> μέρος

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε για πρώτη φορά ο μηχανισμός τερματισμού του κύματος της LH σε γυναίκες. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι για τις πρώτες τρεις ημέρες μετά από αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία σε γυναίκες, η υπόφυση λειτούργησε όπως όταν οι ωθήκες είναι άθικτες. Πιο συγκεκριμένα, ο αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των εξωγενών οιστρογόνων στη βασική έκκριση των LH και FSH ήταν εμφανής με ελάττωση των γοναδοτροφινών σε παρόμοιο ποσοστό και στους δύο κύκλους. Επιπλέον, η αύξηση των συγκεντρώσεων των γοναδοτροφινών, που αναμενόταν μετά την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία (Alexandris et al., 1997), αναστάλη. Από την άλλη μεριά, ο θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης ήταν επίσης εμφανής ως αποτέλεσμα της δράσης των ταχέως αυξανόμενων συγκεντρώσεων της E2. Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο η έναρξη όσο και η μέγιστη τιμή της LH στο από την E2 προκαλούμενο κύμα της LH δεν επηρεάστηκαν από την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία, αφού και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά του κύματος ήταν ίδια και στους δύο κύκλους. Αυτό σημαίνει ότι οι παράγοντες, που ενεργούν ως μεσολαβητές της ρυθμιστικής επίδρασης των ωθηκών στην απαντητικότητα της υπόφυσης σε ένα κατάλληλο οιστρογονικό ερέθισμα, εξακολουθούσαν να δρουν κατά την άμεση περίοδο μετά από την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μία μη στεροειδής ουσία, ο GnSAF,

μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον έλεγχο του εύρους του κύματος της LH (Messinis & Templeton, 1989; Messinis & Templeton, 1991a; Pappa et al., 1999). Η ουσία αυτή παράγεται κυρίως από τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Fowler et al., 2001), δηλαδή κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (Daforoulou et al., 2004a), οι οποίες στην παρούσα μελέτη αντιστοιχούσαν στην άμεση μετεγχειρητική περίοδο. Είναι λοιπόν πιθανό ότι κατά την περίοδο αυτή η βιοδραστικότητα του GnSAF ήταν ακόμη παρούσα στην κυκλοφορία του αίματος (Messinis et al., 1996).

Αν και ο από την E2 προκαλούμενος θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης κατά τη διάρκεια του κύκλου-1 (control) είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός σαφούς κύματος της LH με ένα ανιόν και ένα κατιόν σκέλος, στον κύκλο-2 μετά την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία, οι τιμές της LH κατά τη διάρκεια του κύματος μετά από τη μέγιστη τιμή δεν μειώθηκαν, αλλά παρέμειναν σταθερές. Αυτή η διαφορά στην εικόνα του τελικού τμήματος του κύματος της LH μεταξύ των δύο κύκλων, δηλαδή η αδυναμία των τιμών της LH να επανέλθουν στο επίπεδο, που ήταν πριν από την έναρξη του κύματος, σχετίζεται με την απουσία των ωοθηκών. Αυτό σημαίνει ότι ο τερματισμός του κύματος της LH, που προκαλείται από την E2, ελέγχεται από ωοθηκικούς παράγοντες, οι οποίοι στον κύκλο-2 είχαν εξαλειφθεί από την κυκλοφορία του αίματος μετά την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία. Ως τέτοιοι παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν διάφορες μη στεροειδείς και στεροειδείς ωοθηκικές ουσίες.

Ο GnSAF ως παράγοντας αμβλύνσεως θα αναμενόταν με την απουσία του να οδηγήσει στην ενίσχυση του κύματος της LH μετά την αφαίρεση των ωθηκών. Το γεγονός ωστόσο, ότι οι μέγιστες τιμές της LH ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους, υποδηλώνει ότι η βιοδραστικότητα GnSAF κατά τη διάρκεια του κύματος ήταν παρόμοια στους δύο κύκλους. Είναι λιγότερο πιθανό η βαθμιαία εξάλειψη της δραστηριότητας του GnSAF μέχρι το τέλος του κύματος να είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων της LH μετά από την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία, καθώς στο μέσον του φυσιολογικού κύκλου το ενδογενές κύμα της LH τερματίζεται παρά την αναμενόμενη μείωση της δραστηριότητας του παράγοντα αυτού κατά την χρονική αυτή περίοδο (Messinis & Templeton, 1991a; Fowler et al., 2001; Messinis, 2003). Από την άλλη μεριά, ακόμη και σε περιπτώσεις με εκσεσημασμένη άμβλυνση του κύματος της LH, όπως σε γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, το κύμα αυτό είναι καλά χαρακτηρισμένο (Messinis et al., 1985), υποδηλώνοντας ότι ο GnSAF δεν είναι ο κύριος παράγοντας υπεύθυνος για τον τερματισμό του κύματος της LH. Άλλοι μη στεροειδείς ωθηκικοί παράγοντες, όπως οι ινχιμπίνες, δεν μπορεί να θεωρηθούν ως πιθανοί υποψήφιοι για τον τερματισμό του κύματος της LH, καθώς οι ουσίες αυτές είναι εκλεκτικοί αναστολείς της έκκρισης της FSH και όχι της LH (Burger, 1992).

Στην παρούσα μελέτη, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης μετά από την έναρξη του κύματος ήταν σημαντικά χαμηλότερες στους κύκλους με αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία από ό,τι στους κύκλους με ακέραιες ωθήκες. Είναι πιθανό λοιπόν η αδυναμία της LH να επανέλθει στα πριν από την

έναρξη του κύματος επίπεδα να σχετίζεται με τα μειωμένα επίπεδα της προγεστερόνης. Προηγούμενα δεδομένα σε γυναίκες έχουν δείξει ότι η προγεστερόνη πιθανόν ευαισθητοποιεί τα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης στη GnRH ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις της στην κυκλοφορία, όπως συμβαίνει κατά την ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Kazem et al., 1996). Έχει επίσης δειχθεί ότι σε ωοθηκεκτομηθέντα και επινεφριδιεκτομηθέντα ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε τριλοσάνη, η από τα οιστρογόνα προκαλούμενη σύνθεση νευροπρογεστερόνης στον υποθάλαμο είναι σημαντική για την έκφραση του κύματος της LH (Micevych et al., 2003). Από την άλλη μεριά, σε γυναίκες τα αυξανόμενα επίπεδα προγεστερόνης μετά από την εξωγενή χορήγηση της, υποβοηθούν αφ' ενός τη διεύρυνση του κύματος και αφ' ετέρου την επαναφορά της LH στο επίπεδο πριν από το κύμα, όταν το κύμα αυτό έχει προκληθεί από εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων (Messinis & Templeton, 1990a). Είναι λοιπόν πιθανό ότι η ενδογενής προγεστερόνη είναι σημαντική για τον έλεγχο όχι μόνο της έναρξης (Hoff et al., 1983) αλλά και του εύρους του μεσοκύκλιου κύματος της LH εν μέρει μέσω της συμμετοχής των αυξανόμενων επιπέδων της προγεστερόνης στον τερματισμό του κύματος.

Εκτός από την προγεστερόνη, οι τιμές της E2 προς το τέλος του κύματος της LH στην παρούσα μελέτη ήταν επίσης χαμηλότερες στους κύκλους με αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία από ό,τι στους κύκλους με ακέραιες ωοθήκες. Ωστόσο, ο βαθμός στον οποίο το στεροειδές αυτό μπορεί να συμμετέχει στην πτώση των τιμών της LH μετά από τη μέγιστη τιμή της δεν είναι γνωστό. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης φαίνεται να αποκλείουν το

ενδεχόμενο ο τερματισμός του ενδογενούς κύματος της LH στις γυναίκες να οφείλεται στην εξάντληση των εφεδρειών της υπόφυσης, καθώς η έκκριση της LH συνεχιζόταν χωρίς διακοπή σε υψηλό επίπεδο και μετά την αφαίρεση των ωοθηκών.

Οι γυναίκες, που περιλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν όλες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας, καθώς για λόγους βιοηθικής τέτοια πειράματα δεν είναι εφικτά σε νέες γυναίκες. Παρ' όλα αυτά και παρά τις μερικώς επηρεασμένες ωοθηκικές εφεδρείες στις γυναίκες αυτές, τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας είναι αξιόπιστα, γιατί στον κύκλο-1 οι ίδιες γυναίκες χρησιμοποιήθηκαν ως δική τους ομάδα μαρτύρων (control). Η σύγκριση των παρόντων ευρημάτων με αυτά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι δύσκολη για τους παρακάτω λόγους. Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αποτελούν ένα διαφορετικό μοντέλο με πολύ υψηλά βασικά επίπεδα FSH και LH, καθώς ο ωοθηκικός αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης είναι ουσιαστικά απών (Daforoulos et al., 2004b). Επίσης, ενδοκρινολογικές μελέτες, στις οποίες εξωγενή οιστρογόνα και προγεστερόνη χορηγήθηκαν σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν είχαν ως αντικείμενο μελέτης τον τερματισμό του κύματος της LH (Liu & Yen, 1983; Lutjen et al., 1986). Επιπρόσθετα, αυτές οι μελέτες διαφέρουν από την παρούσα μελέτη στο ότι ένας πολύ ισχυρός αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης είχε επιτευχθεί με τη διατήρηση υψηλών συγκεντρώσεων E2 και προγεστερόνης καθ' όλη την πειραματική περίοδο (Liu & Yen, 1983; Lutjen et al., 1986).



Πέραν της υπόφυσης, τα ωθηκικά στεροειδή επιδρούν και στην έκκριση της υποθαλαμικής GnRH (Adams et al., 1994). Αν και στην παρούσα μελέτη μεταβολές στη συχνότητα και το εύρος των ώσεων της GnRH, ως αποτέλεσμα των μεταβολών των συγκεντρώσεων των στεροειδών, δεν μπορούν να αποκλεισθούν μία μελλοντική μελέτη των ώσεων της LH θα μπορούσε να εξετάσει το θέμα αυτό.

## 2<sup>ο</sup> μέρος

Στην παρούσα μελέτη, οι αυξανόμενες βασικές τιμές των FSH και LH μετά την ωθηκεκτομία στις γυναίκες, που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία, είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα (Alexandris et al., 1997). Η μεγαλύτερη αύξηση στις τιμές της FSH του ορού σε σύγκριση με αυτές της LH πιθανόν να σχετίζεται με το χαμηλότερο ρυθμό μεταβολικής κάθαρσης και τον υψηλότερο ρυθμό παραγωγής της FSH (Coble et al., 1969). Στις γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε E2, η αύξηση αυτή μετατέθηκε για λίγες μόνο ημέρες, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η E2 συμμετέχει αλλά δεν είναι ικανή από μόνη της να διατηρήσει την κατασταλτική επίδραση των ωθηκών πάνω στην έκκριση των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου. Υπάρχει μόνο μία μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία, στην οποία οι γυναίκες έλαβαν E2 αμέσως μετά την ωθηκεκτομία και η οποία E2, όπως στην παρούσα μελέτη, ανέστειλε την αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροφινών, αλλά διαδοχικές αιμοληψίες στη μελέτη αυτή έγιναν μόνο τις πρώτες 4 μετεγχειρητικές ημέρες (Kamel et al., 1991). Χαμηλές συγκεντρώσεις της FSH και της LH στο πλάσμα χωρίς αύξηση έχουν επίσης παρατηρηθεί σε γυναίκες

που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση κοιλίας, στις οποίες τα επίπεδα της E2 παρέμειναν υψηλά μετεγχειρητικά όχι με τη χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων αλλά με τη διατήρηση των ωοθηκών (Barlow et al., 1981).

Όταν στην παρούσα μελέτη η χορήγηση της E2 συνδυάστηκε με χορήγηση προγεστερόνης, αύξηση των γοναδοτροφινών δεν παρατηρήθηκε τουλάχιστον για μία εβδομάδα μετά την ωθηκεκτομία. Καθώς με τη χορήγηση των στεροειδών αυτών διατηρήθηκαν μετά από την ωθηκεκτομία υψηλές συγκεντρώσεις της E2 και της προγεστερόνης αντίστοιχες της ωχρινικής φάσης, είναι σαφές ότι και τα δύο αυτά στεροειδή απαιτούνται για να διατηρήσουν χαμηλή την έκκριση των γοναδοτροφινών από την πρώιμη μέχρι τη μέση ωχρινική φάση του κύκλου. Το κατά πόσον η προγεστερόνη από μόνη της είναι ικανή να καταστείλει την έκκριση των FSH και LH δεν είναι γνωστό. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι, αν και η εξωγενής χορήγηση E2 ήταν ικανή να αναστείλει τη διακυκλική αύξηση της FSH (Le Nestour et al., 1993), η προγεστερόνη ελάττωσε τα επίπεδα των FSH και LH στην ωοθυλακική και την ωχρινική φάση ή σε γυναίκες με ανενεργείς ωοθήκες μόνο παρουσία E2 (Soules et al., 1984; Nippoldt et al., 1989; de Ziegler et al., 1992).

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δεν αποκλείουν την πιθανότητα μη στεροειδείς ουσίες, όπως η ινχιμπίνη A, να συμμετέχουν στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροφινών, καθώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής είναι αυξημένα κατά την ωχρινική φάση του κύκλου στις γυναίκες (Groome et al., 1996), ενώ δεδομένα σε πιθήκους έχουν δείξει ότι η ινχιμπίνη A είναι ικανή να

καταστέλλει τα επίπεδα της FSH in vivo (Molskness et al., 1996). Αν και τα επίπεδα της ινχιμπίνης δεν μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, θα ανέμενε κανείς να μειώθηκαν σημαντικά μετά την ωθηκεκτομία (Alexandris et al., 1997).

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που έχει διερευνήσει την επίδραση της E2 και της προγεστερόνης στην ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μετά από ωθηκεκτομία. Όσον αφορά στις μεταβολές στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της FSH στην ομάδα μαρτύρων των γυναικών (αυτές που δεν έλαβαν στεροειδή), ο τύπος των μεταβολών ήταν παρόμοιος με αυτόν που έχει ήδη περιγραφεί, δηλαδή μία συνεχής αύξηση μετά την ωθηκεκτομία (Alexandris et al., 1997), δείχνοντας επομένως την κατασταλτική επίδραση των ωθηκών πάνω στην υπόφυση σε αυτή τη φάση του κύκλου. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η E2 συμμετέχει αλλά δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για αυτή την κατασταλτική επίδραση των ωθηκών, καθώς στις γυναίκες που είχε χορηγηθεί μόνο E2 η αύξηση των τιμών της ΔFSH καθυστέρησε αλλά δεν καταργήθηκε. Αν και η προσθήκη της προγεστερόνης καθυστέρησε περαιτέρω την αύξηση της ΔFSH, το ότι τελικώς οι τιμές της ΔFSH αυξήθηκαν, υποδηλώνει ότι τα δύο αυτά στεροειδή δεν είναι οι μόνοι μεσολαβητές της ωθηκικής κατασταλτικής επίδρασης στην FSH και ότι και άλλοι ωθηκικοί παράγοντες διαδραματίζουν επίσης κάποιο ρόλο. Ένας παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της FSH, τουλάχιστον in vitro, είναι η ινχιμπίνη A (Burger, 1992), τα επίπεδα της οποίας κατά τη μέση ωχρινική φάση του κύκλου είναι υψηλά (Groome et al., 1996).

Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα ότι μετά την ωθηκεκτομία ο τύπος μεταβολών της απάντησης της LH στη GnRH είναι διαφορετικός από την απάντηση της FSH (Alexandris et al., 1997). Οι μειούμενες τιμές της ΔLH στις γυναίκες, που δεν έλαβαν ορμονική αγωγή, θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως δηλωτικές του γεγονότος ότι οι ωθήκες πριν την επέμβαση εξασκούσαν μία ευαισθητοποιήσιμη επίδραση στην έκκριση της LH. Ωστόσο, το γεγονός ότι ο τύπος των μεταβολών των τιμών της ΔLH ήταν ανεπηρέαστος από τη χορήγηση των στεροειδών υποδηλώνει ότι η E2 και η προγεστερόνη δεν είναι μεσολαβητές αυτής της ωθητικής επίδρασης στην απάντηση της LH στη GnRH κατά τη μέση ωχρινική φάση. Είναι λοιπόν πιθανό ότι είτε η ευαισθητοποιήσιμη επίδραση της ωθήκης στην υπόφυση ασκείται μέσω άγνωστων παραγόντων είτε ότι η μείωση των τιμών της ΔLH μετά την ωθηκεκτομία ελέγχεται από εξω-ωθητικούς μηχανισμούς.

Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να σχετίζονται με τις μειωμένες αποθήκες των γοναδοτροφινών της υπόφυσης ως αποτέλεσμα του προηγηθέντος μεσοκύκλιου κύματος της LH, το οποίο επηρέασε τις εφεδρείες της LH περισσότερο από ό,τι της FSH. Η τελευταία πιθανότητα είναι μεγαλύτερη βάσει προηγούμενων δεδομένων, όπου ο τύπος της μειούμενης απάντησης της LH στη GnRH κατά την ωχρινική φάση του κύκλου έχει ήδη περιγραφεί σε γυναίκες με ακέραιες ωθήκες (Messinis et al., 1993). Το γεγονός, ωστόσο, ότι μετά την ωθηκεκτομία η μείωση της ΔLH διακόπηκε σχετικά γρήγορα

μετά την επέμβαση, δηλαδή περίπου 4 ημέρες από τη μέση ωχρινική φάση (Σχήμα 8), ενώ σε γυναίκες με ακέραιες ωθήκες η μείωση συνεχίστηκε μέχρι το τέλος της ωχρινικής φάσης (Messinis *et al.*, 1993), υποδηλώνει μία πρωιμότερη ανάνηψη της υπόφυσης στις ωθηκεκτομηθείσες από ό,τι στις μη ωθηκεκτομηθείσες γυναίκες. Αυτό δείχνει ότι η από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH κατά την ωχρινική φάση δεν είναι ανεπηρέαστη από την παρουσία των ωθικών. Είναι πιθανόν ότι κάποιος παράγοντας, διαφορετικός από την E2 και την προγεστερόνη, διατηρεί μία χαμηλή απαντητικότητα της LH στη GnRH προς το τέλος του κύκλου. Ένας τέτοιος παράγοντας, που ειδικά μειώνει την απάντηση της LH στη GnRH, είναι ο GnSAF (Messinis and Templeton, 1989), αλλά ο ρόλος του σε αυτό το στάδιο του κύκλου χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Μέχρι σήμερα, ο παράγοντας αυτός έχει χαρακτηριστεί από το ανθρώπινο ωθυλακικό υγρό ως μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 12.5 kDa, η οποία παρουσιάζει ομολογία με το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (human serum albumin-HSA) (Pappa *et al.*, 1999). Πιο πρόσφατα, έχειδειχθεί ότι τα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν το mRNA της HSA, υποστηρίζοντας επομένως τον αρχικό χαρακτηρισμό του GnSAF (Karlgiotou *et al.*, 2006). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξωγενής FSH διεγείρει την παραγωγή του GnSAF in vivo τόσο στην ωθυλακική όσο και στην ωχρινική φάση του κύκλου (Messinis *et al.*, 1996, 1998). Η ένδειξη από αυτές τις μελέτες είναι ότι κατά την ωχρινική φάση ο GnSAF παράγεται από τα μικρά κοιλοτικά ωθυλάκια και όχι από το ωχρο σωματίο. Από άποψη φυσιολογίας, είναι πιθανό ότι η δραστηριότητα του

GnSAF αυξάνει κατά την όψιμη ωχρινική φάση του κύκλου ως αποτέλεσμα της επίδρασης της διακυκλικής αύξησης της FSH.

Αν και η E2 και η προγεστερόνη δεν φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση, μία εναλλακτική προσέγγιση στην ερμηνεία των παρόντων δεδομένων, ειδικά αναφορικά με τη βασική έκκριση των γοναδοτροφινών, θα μπορούσε να είναι μέσω της ρυθμιστικής επίδρασης της E2 στους υποδοχείς της προγεστερόνης στην υπόφυση (Sprangers *et al.*, 1991). Μία τέτοια επίδραση μπορεί να ασκείται μέσω του υποδοχέα των οιστρογόνων  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), βάσει δεδομένων σε επίμυες όπου έχει δειχθεί η παρουσία υψηλών επιπέδων mRNA του υποδοχέα  $\alpha$  και η απουσία mRNA του υποδοχέα  $\beta$  (ER $\beta$ ) στην υπόφυση (Couse *et al.*, 1997).



## Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι κατά τη διάρκεια της άμεσης μετεγχειρητικής περιόδου μετά από αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία που διενεργείται στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου σε γυναίκες, η υπόφυση όσον αφορά στην έναρξη και τη μέγιστη τιμή του από την E2 προκαλούμενου κύματος της LH λειτουργεί παρόμοια, όπως σε γυναίκες με ακέραιες ωθήκες. Μετά από την περίοδο αυτή, ωθηκικοί παράγοντες, που εξαλείφονται από την κυκλοφορία, ευθύνονται πιθανότατα για την αδυναμία των μέγιστων τιμών της LH να επανέλθουν στα βασικά επίπεδα. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι ο τερματισμός του ενδογενούς κύματος της LH σχετίζεται με ωθηκικούς παράγοντες παρά με την εξάντληση των εφεδρειών της υπόφυσης.

2. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση του κύκλου, η E2 και η προγεστερόνη είναι σημαντικοί παράγοντες της κατασταλτικής επίδρασης των ωθηκών πάνω στη βασική έκκριση των FSH και LH. Ωστόσο, όσον αφορά στην απάντηση των γοναδοτροφινών στη GnRH, η μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι αυτά τα δύο στεροειδή συμμετέχουν στον έλεγχο της έκκρισης της FSH, αλλά όχι της LH. Είναι πιθανό ότι κατά την ωχρινική φάση του κύκλου η απάντηση της LH στη GnRH ελέγχεται εν μέρει από τον GnSAF.

## ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδογενές κύμα της LH είναι το αποτέλεσμα του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων. Ωστόσο, οι παράγοντες που ευθύνονται για τον τερματισμό του κύματος της LH δεν είναι γνωστοί. Αφ' ετέρου είναι γνωστό ότι κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH.

### **Σκοποί της μελέτης:**

*1<sup>ο</sup> μέρος.* Η διερεύνηση του μηχανισμού τερματισμού του κύματος της LH στις γυναίκες.

*2<sup>ο</sup> μέρος.* Ο προσδιορισμός του ρόλου των ωοθηκικών στεροειδών στον έλεγχο της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης των γοναδοτροφινών κατά την ωχρινική φάση του κύκλου.

### **Υλικά και μέθοδοι:**

*1<sup>ο</sup> μέρος.* Οκτώ γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (ηλικίας 42-48 ετών) μελετήθηκαν σε δύο κύκλους, τον κύκλο-1 (control) και τον κύκλο-2. Στο κύκλο-2, οι γυναίκες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου. Και στους δύο κύκλους, χορηγήθηκε διαδερμικώς οιστραδιόλη στις γυναίκες στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 και 150 μg τις ημέρες 4 και 5. Δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε 12 ώρες τις ημέρες 3 και 4 και στη συνέχεια κάθε 6 ώρες μέχρι την ημέρα 9.

*2<sup>ο</sup> μέρος.* Δεκαοκτώ γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους μελετήθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία με αμφοτερόπλευρη σαλπινγγοωθηκεκτομία, η οποία

διενεργήθηκε κατά την πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση του κύκλου. Οι 6 από τις γυναίκες δεν έλαβαν καμία ορμονική θεραπεία μετεγχειρητικά (ομάδα 1, control), 6 έλαβαν οιστραδιόλη μέσω διαδερμικών αυτοκόλλητων (ομάδα 2) και οι υπόλοιπες 6 έλαβαν οιστραδιόλη και προγεστερόνη (ομάδα 3). Σε όλες τις γυναίκες διερευνήθηκε, σε καθημερινή βάση, η απάντηση στα 30 min της LH (ΔLH) και της FSH (ΔFSH) στη GnRH (10 μg i.v.).

#### **Αποτελέσματα:**

*1<sup>ο</sup> μέρος.* Και στους δύο κύκλους μετά την καταστολή των επιπέδων των γοναδοτροφινών σε όλες τις γυναίκες εκδηλώθηκε ενδογενές κύμα της LH. Τα χρονικά διαστήματα από την έναρξη της χορήγησης της οιστραδιόλης μέχρι την έναρξη του κύματος της LH ( $73.5 \pm 1.5$  vs  $76.5 \pm 2.5$  ώρες) και οι μέγιστες τιμές της LH ( $11.4 \pm 1.9$  vs  $12.4 \pm 3.1$  IU/l) ήταν παρόμοια και στους δύο κύκλους (mean $\pm$ SEM). Μετά την επίτευξη των μέγιστων επιπέδων της LH οι τιμές της μειώθηκαν σταδιακά στον κύκλο-1, ενώ παρέμειναν σταθερές στον κύκλο-2 και ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του κύκλου-1 ( $p < 0.05$ ). Πριν από την έναρξη του κύματος της LH, οι τιμές της οιστραδιόλης παρουσίασαν και στους δύο κύκλους έναν προωοθυλακιορρηκτικό τύπο μεταβολών, αλλά από το χρονικό σημείο των 24 ωρών μετά την έναρξη του κύματος και στη συνέχεια αυτές ήταν χαμηλότερες στον κύκλο-2 ( $p < 0.05$ ). Οι τιμές της προγεστερόνης ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους μέχρι την ημέρα της έναρξης του κύματος της LH, αλλά στον κύκλο-2 μειώθηκαν στη συνέχεια και ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του κύκλου-1 ( $p < 0.05$ ).

*2<sup>ο</sup> μέρος.* Στην ομάδα 1, οι συγκεντρώσεις της FSH και της LH και οι τιμές της ΔFSH αυξήθηκαν σταδιακά μετά την ωθηκεκτομία, ενώ στις ομάδες 2 και 3 αυτή η αύξηση καθυστέρησε ή δεν παρατηρήθηκε. Σε αντίθεση με την ΔFSH,

οι τιμές της ΔLH έδειξαν τον ίδιο τύπο μεταβολών και στις τρεις ομάδες με μία σημαντική πτώση μέχρι τη μετεγχειρητική ημέρα 4 και μία σταδιακή αύξηση στη συνέχεια.

### **Συμπεράσματα:**

*1<sup>ο</sup> μέρος.* Ωοθηκικοί παράγοντες παρά η εξάντληση των υποφυσιακών εφεδρειών είναι σημαντικοί για τον τερματισμό του ενδογενούς κύματος της LH κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο.

*2ο μέρος.* Στην πρώιμη προς μέση ωχρινική φάση του κύκλου, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη συμμετέχουν στον έλεγχο της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης της FSH, αλλά όχι της LH,. Είναι πιθανόν ότι στην ωχρινική φάση του κύκλου, η απάντηση της LH στη GnRH ρυθμίζεται εν μέρει από τον παράγοντα αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF).

## Z. SUMMARY

**Background:** The endogenous LH surge is the result of the estrogen positive feedback effect. However, the factors that are responsible for the termination of LH surge are not known. Furthermore, it is known that during the follicular phase of the cycle, estradiol sensitizes the pituitary to GnRH.

### **Objectives:**

*Part 1.* To investigate the mechanism that terminates the LH surge in women.

*Part 2.* To determine the role of ovarian steroids in the control of GnRH-induced gonadotrophin secretion in the luteal phase of the cycle.

### **Subjects and methods:**

*Part 1.* Eight normally cycling women (aged 42-48 years) were investigated in two cycles, i.e. cycle-1 (control) and cycle-2. In cycle-2, total abdominal hysterectomy plus bilateral salpingoophorectomy was performed on day 3. In both cycles, estradiol was administered transdermally at the dose of 100 µg on day 3 and 150 µg on days 4 and 5. Blood samples were obtained every 12 hours from days 3 to 5 and every 6 hours thereafter until day 9.

*Part 2.* Eighteen normally cycling women were studied during the week following hysterectomy plus bilateral salpingoovariectomy performed in early to mid-luteal phase. Six of the women received no hormonal treatment post-operatively (group 1, control), 6 received estradiol through skin patches (group 2) and the remaining 6 received estradiol plus progesterone (group 3). In all women, the response at 30 min of LH ( $\Delta$ LH) and FSH ( $\Delta$ FSH) to GnRH (10 µg i.v.) was investigated on a daily basis.

**Results:**

*Part 1.* In both cycles, after suppression of gonadotrophins, the women displayed an endogenous LH surge. The time intervals between the commencement of estradiol treatment and the LH surge onset ( $73.5 \pm 1.5$  vs  $76.5 \pm 2.5$  hours) and peak LH values ( $11.4 \pm 1.9$  vs  $12.4 \pm 3.1$  IU/l) were comparable in the two cycles (mean  $\pm$  SEM). After peaking, LH values decreased gradually in cycle-1 while in cycle-2 they remained stable and were higher than the corresponding values in cycle-1 ( $p < 0.05$ ). Before the LH surge onset, estradiol values showed in both cycles a preovulatory pattern of changes, but starting 24 hours after the onset of the LH surge they were lower in cycle-2 ( $p < 0.05$ ). Progesterone levels were similar in both cycles until the day of the LH surge onset, but in cycle-2 they declined thereafter and were lower than in cycle-1 ( $p < 0.05$ ).

*Part 2.* In group 1, serum FSH, LH and  $\Delta$ FSH values increased progressively following ovariectomy, while in groups 2 and 3 this increase was postponed or abolished. In contrast to  $\Delta$ FSH,  $\Delta$ LH values showed the same pattern of changes in all three groups with a significant decline up to post-operative day 4 and a gradual increase thereafter.

**Conclusions:**

*Part 1.* It is suggested that ovarian factors rather than exhaustion of pituitary reserves are important for termination of the endogenous LH surge during the normal menstrual cycle.

*Part 2.* In the early to mid-luteal phase of the cycle, estradiol and progesterone participate in the control of GnRH-induced FSH, but not LH,



secretion. It is possible that in the luteal phase, the response of LH to GnRH is partly regulated by GnSAF.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams JM, Taylor AE, Schoenfeld DA, Crowley WF Jr, Hall JE (1994) The midcycle gonadotropin surge in normal women occurs in the face of an unchanging gonadotropin-releasing hormone pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab* 79:858-864.

Ahima RS, Harlan RE (1992) Glucocorticoid receptors in LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 56:845-850.

Alexandris E, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, Lolis D, Messinis IE (1997) Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:721-726.

Anderson L (1996) Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev Reprod* 1:193-202

Attardi B, Keeping HS, Winters SJ, Kotsuji F, Troen P (1989) Effect of inhibin from primate sertoli cells and GnRH on gonadotrophin subunit mRNA in rat pituitary cell cultures. *Mol Endocrinol* 3:1236-1242.

Barlow, D.H., Macnaughton, M.C., Mowat, J., Coutts, J.R.T. (1981) Hormonal profiles in the menopause. In Coutts, J.R.T. (ed.) *The Functional Morphology of the Human Ovary*. MTP Press, Lancaster, UK, pp 223–234.

Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978) Hypophyseal responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202:631-633.

Blake CA (1978) Changes in plasma luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropin concentrations during constant rate intravenous

infusion of luteinizing hormone-releasing hormone in cyclic rats. *Endocrinology* 102:1043-1052.

Braden TD, Famworth PG, Burger HG, Conn PM (1990) Regulation of the synthetic rate of gonadotrophin-releasing hormone receptors in rat pituitary cell cultures by inhibin. *Endocrinology* 127:2387-2392.

Braden TD, Conn PM (1992) Activin-a stimulates the synthesis of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 130:2101-2105.

Brooks J, Crow WJ, McNeilly JR (1992) Relationship between gonadotrophin subunit gene expression, gonadotrophin-releasing hormone receptor content and pituitary and plasma gonadotrophin concentrations during the rebound release of FSH after treatment of ewes with bovine follicular fluid during the luteal phase of the cycle. *J Mol Endocrinol* 8:109-118.

Brooks J, McNeilly AS (1994) Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor mRNA expression in the sheep. *J Endocrinol* 143:175-182.

Burger HG (1992) Inhibin. *Reprod Med Rev* 1:1-20.

Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. (1972) Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 69:278-282.

Busbridge NJ, Buckley DM, Cornish M, Whitehead SA (1988) Effects of ovarian hyperstimulation and isolated preovulatory follicles on LH responses to GnRH in rats. *J Reprod Fertil* 82:329-336.

Busbridge NJ, Chamberlain GV, Griffiths A, Whitehead SA (1990) Non-steroidal follicular factors attenuate the self-priming action of gonadotropin-

releasing hormone on the pituitary gonadotroph. *Neuroendocrinology* 51:493-499.

Byrne B, Fowler PA, Messinis IE, Templeton A (1993) Gonadotrophin surge-attenuating factor secretion varies during the follicular phase of the menstrual cycle of spontaneously cycling women. *J Endocrinol* 139 [Suppl]:P53.

Byrne B, Fowler PA, Templeton A (1996) Role of progesterone and non-steroidal ovarian factors in regulating GnRH self-priming in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1454-1459.

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R (1998) Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *J Endocrinol* 156:269-274.

Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW (1994) Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134:799-808.

Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW (1989) Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Mol Endocrinol* 3:1969-1976.

Chang RJ, Jaffe RB (1978) Progesterone effects on gonadotropin release in women pretreated with estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 47:119-125.

Clarke IJ, Cummins JT (1982) The temporal relationship between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737-1739.

Clarke IJ (1995) Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe. *J Endocrinol* 145:271-282.

Coble, Y.D. Jr, Kohler, P.O., Cargille, C.M., Ross, G.T. (1969) Production rates and metabolic clearance rates of human follicle-stimulating hormone in premenopausal and postmenopausal women. *J. Clin. Invest.*, 48, 359–363.

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., Korach, K.S. (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*, 138, 4613–4621.

Culler MD, Negro-Vilar A (1989) Endogenous inhibin suppresses only basal follicle-stimulating hormone secretion but suppresses all parameters of pulsatile luteinising hormone secretion in the diestrous female rat. *Endocrinology* 124:2944-2953.

Culler MD (1992) In vivo evidence that inhibin is a gonadotropin surge-inhibiting/attenuating factor. *Endocrinology* 131:1556-1558.

Currie RJW, McNeilly AS (1995) Mobilization of LH secretory granules in gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH during the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J Endocrinol* 147:1-11.

Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, Kallitsaris A, Galazios G, Zintzaras E, Sotiros P, Messinis IE (2004a) Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen-treated post-menopausal women: evidence that

gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum Reprod* 19, 1985–1992.

Dafopoulos KC, Kotsovassilis CP, Milingos SD, Kallitsaris AT, Georgadakis GS, Sotiros PG, Messinis IE (2004b) FSH and LH responses to GnRH after ovariectomy in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60, 120–124.

Danforth DR, Sinosich MJ, Anderson TL, Cheng CY, Bardin CW, Hodgen GD (1987) Identification of gonadotropin surge-inhibiting factor (GnSIF) in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol Reprod* 37:1075-1082.

Danforth DR, Elkind-Hirsch K, Hodgen GD (1990) In vivo and in vitro modulation of gonadotrophin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 127:319-324.

Danforth DR, Cheng CY (1995) Purification of a candidate gonadotrophin surge inhibiting factor from porcine follicular fluid. *Endocrinology* 136:1658-1665.

de Greef WJ, Eilers GA, de Koning J, Karels B, de Jong FH (1987) Effects of ovarian inhibin on pulsatile release of gonadotrophins and secretion of LHRH in ovariectomized rats: evidence against a central action of inhibin. *J Endocrinol* 113:449-455.

de Koning J, Tijssen AMI, van Rees GP (1987) The involvement of ovarian factors in maintaining the pituitary glands of female rats in a state of low LH responsiveness to LHRH. *J Endocrinol* 112:265-273.



de Koning J, Tijssen AMI, van Rens GP (1989) The self-priming action of LHRH increases the low pituitary LH and FSH response caused by ovarian factors: observations in vitro. *J Endocrinol* 120:439-447.

de Koning J, Westhoff WE, Koppelaar DW, van Dielen JAMJ (1994) On the dynamics between gonadotrophin surge-inhibiting factor and gonadotrophin releasing hormone (GnRH): role of self-priming and desensitization in the luteinising hormone response to GnRH after follicle stimulating hormone treatment. *Hum Reprod* 9:1600-1606.

De Ziegler, D., Bergeron, C., Cornel, C., Medalie, D.A., Massai, M.R., Milgrom, E., Frydman, R., Bouchard, P. (1992) Effects of luteal estradiol on the secretory transformation of human endometrium and plasma gonadotropins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74, 322-331.

Dufau ML, Veldhuis JD (1987) Pathophysiological relationships between the biological and immunological activities of luteinizing hormone. In: Burger HG (ed) *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. Philadelphia, Saunders, pp 153-176.

Evans WS, Boykin BJ, Kaiser DL, Borges JLC, Thorner MO (1983) Biphasic LH secretion in response to GnRH during continuous perfusion of dispersed rat anterior pituitary cell: changes in total release and the phasic components during the estrous cycle. *Endocrinology* 112:535-542.

Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ (1994) Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 134:1806-1811.

Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ (1997) Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138, 5408–5414.

Farnworth PG (1995) Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J Endocrinol* 145:387-395.

Ferin M, Rosenblatt H, Carmel PW, Antunes JL, Vande Wiele RL (1979) Estrogen-induced gonadotropin surges in female rhesus monkeys after pituitary stalk section. *Endocrinology* 104,50–52.

Fink G (1995) The self-priming effect of LHRH: a unique servomechanism and possible cellular model for memory. *Front Neuroendocrinol* 16:183-190.

Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF Jr (1986) Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 62:1136-1144.

Fowler PA, Messinis IE, Templeton AA (1990) Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. *J Reprod Fertil* 90:587-594.

Fowler PA, Townsend C, Messinis IE, Cunningham P, Templeton A (1992) Gonadotrophin surge-attenuating factor attenuates in-vitro LH secretion induced by gonadotrophin-releasing hormone from cultured ovine pituitary cells only during the breeding season. *J Endocrinol* 135:221-227.

Fowler PA, Messinis IE, Cunningham P, Fraser M, Templeton AA (1993) Effects of gonadotrophin surge attenuating factor on the two pools of GnRH-induced LH secretion. *Hum Reprod* 8:822-828.

Fowler PA, Cunningham P, Fraser M, McGregor F, Byrne B, Pappas A, Messinis IE, Templeton A (1994) Circulating gonadotrophin surge-attenuating factor from superovulated women suppresses in-vitro gonadotrophin releasing-hormone self-priming. *J Endocrinol* 143:45-54.

Fowler PA, Knight PG, Templeton A (1995a) Evidence for gonadotropin surge-attenuating factor (GnSAF) in serum from pregnant women. *Biol Reprod* 52[Suppl 1]:87-80.

Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, Cunningham P, Fraser M, Hull MGR, Templeton A (1995b) GnSAF bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod* 10:68-74.

Fowler PA, Templeton AA (1996) The nature and function of putative gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor (GnSAF/IF). *Endocr Rev* 17:103-120.

Fowler PA, Sorsa T, Harris WJ, Knight PG, Mason HD (2001) Relationship between follicle size and gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women. *Hum Reprod* 16:1353-1358.

Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Cash P, Dunbar B, Melvin W, Wilson Y, Mason HD, Harris W (2002) A 60-66 kDa protein with gonadotrophin surge attenuating factor bioactivity is produced by human ovarian granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 8:823-832.

Genazzani AD, Rodbard D, Forti G, Petraglia F, Baraghini GF, Genazzani AR (1990) Estimation of instantaneous secretory rate of luteinizing hormone in women during the menstrual cycle and in men. *Clin Endocrinol* 32:573-581.

Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W (1991) Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 54:373-377.

Gregg DW, Allen MC, Nett TM (1990) Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 43:1032-1036.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, McNeilly AS (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 40:717-723.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1401-1405.

Hall JE, Lavoie HB, Marsh EE, Martin KA (2000) Decrease in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency with aging in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1794-1800.

Hartwig JH, Theien M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (1992) A MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-622.

Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC (1993) Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57: 751-759.

Herbison AE (1998) Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330.

Hoff JD, Lasley CL, Wang CF, Yen SSC (1977) The two pools of the pituitary gonadotropin: regulation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 44:302-313.

Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC (1983) Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 57:792-796.

Huang ES, Miller WL (1980) Effects of estradiol-17 $\beta$  on basal and luteinising hormone releasing hormone-induced secretion of luteinising hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture. *Biol Reprod* 23:124-134.

Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW (2001) Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 13:741-748.

Kalra SP (1993) Mandatory neuropeptide signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507-538.

Kamel, E.M., Maurer, S.A., Hochler, M.G., Hoffman, D.I. and Rebar, R.W. (1991) Gonadotropin dynamics in women receiving immediate or delayed transdermal estradiol after oophorectomy. *Obstet. Gynecol.*, 78, 98–102.

Karande VC, Scott RT, Archer DF (1990) The relationship between serum estradiol-17 $\beta$  concentrations and induced pituitary luteinizing hormone surges in postmenopausal women. *Fertil Steril* 54:217-221.

Karligiotou EA, Kollia P, Kallitsaris A., Messinis IE (2006) Expression of human serum albumin (HSA) mRNA in human granulosa cells: potential correlation of the 95 amino acid long carboxyl terminal of HSA to gonadotrophin surge-attenuating factor. *Hum Reprod*, 21, 645-50.

Karsch FJ, Weick RF, Butler WR, Dierschke DJ, Krey LC, Weiss G, Hotchkiss J, Yamasi T, Knobil E. (1973) Induced LH surges in the rhesus monkey: strength-duration characteristics of the estrogen stimulus. *Endocrinology* 92:1740-1747.

Karsch FJ (1987) Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Ann Rev Physiol* 49:365-382.

Kazem R, Messinis IE, Fowler P, Groome NP, Knight PG, Templeton AA (1996) Effect of mifepristone (RU486) on the pituitary response to gonadotrophin releasing hormone in women. *Hum Reprod* 11:2585-2590.

Kesner JS, Kaufman JM, Wilson RC, Kuroda G, Knobil E (1986) On the short loop feedback regulation of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone "pulse generator" in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 42:109-111.

Kettel LM, DePaolo LV, Morales AJ, Apter D, Ling N, Yen SS (1996) Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertil Steril* 65:472-476.



Keye WR Jr, Jaffe RB (1975) Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. I. Effects of varying duration of estradiol administration. *J Clin Endocrinol Metab* 41:1003–1008.

King JC, Tai DW, Hanna IK, Pfeiffer A, Haas P, Ronsheim PM, Mitchell SC, Turcotte JC, Blaustein JD (1995) A subgroup of LHRH neurons in guinea pigs with progesterin receptors is centrally positioned within the total population of LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 61:265-275.

Klungland H, Andersen O, Kisen G, Alestrom P, Tora L (1993) Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Mol Cell Endocrinol* 95:147-54.

Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36:53-88.

Knobil E (1988) The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod* 3, 469–472.

Knight PG, Lacey M, Peter JLT, Whitehead SA (1990) Demonstration of a nonsteroidal factor in human follicular fluid that attenuates the self-priming action of gonadotrophin-releasing hormone on pituitary gonadotropes. *Biol Reprod* 42:613-618.

Kogawa K, Nakamura T, Sugino K, Takio K, Titani K, Sugino H (1991) Activin binding protein is present in the pituitary. *Endocrinology* 128:1434-1440.

Koppelaar DW, Tijssen AMI, van Dielen JAMJ, de Koning J (1991) The self-priming action of LHRH is under negative FSH control through a

factor released by the ovary: observations in female rats in vivo. *J Endocrinol* 129:205-211.

Koppenaar DW, Tijssen AMI, de Koning J (1992) The effect of gonadotrophin surge-inhibiting factor on the self-priming action of gonadotrophin-releasing hormone in female rats in vitro. *J Endocrinol* 134:427-436.

Koppenaar DW, van Dielen JAMJ, Tijssen AMI, de Koning J (1993) Induction of the gonadotrophin surge-inhibiting factor by FSH and its elimination: a sex difference in the efficacy of the priming effect of gonadotrophin-releasing hormone on the rat pituitary gland. *J Endocrinol* 138:191-201.

Kourides IA, Re RN, Weintraub BD, Ridgway EC, Maloof F (1977) Metabolic clearance and secretion rates of subunits of human thyrotropin. *J Clin Invest* 59:508-516.

Lagrange AH, Rønnekleiv OK, Kelly MJ (1995) Estradiol-17 $\beta$  and  $\mu$ -opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback. *Endocrinology* 136:2341-2344.

Lasley BL, Wang CF, Yen SS (1975) The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophs. *J Clin Endocrinol Metab* 41:820-826.

Laws SC, Begg MJ, Webster JC, Miller WL (1990) Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotrophin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* 127:373-380.

Le Nestour, E., Marraoui, J., Lahlou, N., Roger, M., De Jiegler, D., Bouchard, P. (1993) Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone

levels during the luteal–follicular transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 439–442.

Legan SJ, Tsai HW (2003) Oestrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone neurones after ovariectomy and chronic exposure to oestradiol. *J Neuroendocrinol* 15, 1164–1170.

Leong D, Thorner MD (1991) A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotrophs. *J Biol Chem* 266:9016-9022.

Leranth C, MacLusky NJ, Brown TJ, Chen EC, Redmond DE, Naftolin F (1992) Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive progesterin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 55:667-682.

Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogelsong KM, Wolfe AM (1991) Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the rat. *Recent Prog Horm Res* 47:97-151.

Lewis CE, Morris JF, Fink G (1985) The role of microfilaments in the priming effect of LH-releasing hormone: an ultrastructural study using cytochalasin B. *J Endocrinol* 106:211-218.

Leyendecker G, Wardlaw S, Nocke W (1972) Experimental studies on the endocrine regulations during the periovulatory phase of the human menstrual cycle. The effects of exogenous 17 -oestradiol and progesterone on the release of pituitary luteinizing and follicle stimulating hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* 71:160-178

Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Esch F, Denoroy L, Guillemin R (1985) Isolation and partial characterization of a Mr 32 000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7217-7221.

Littman BA, Hodgen GD (1984) Human menopausal gonadotrophin stimulation in monkeys: blockade of the luteinising hormone surge by a highly transient ovarian factor. *Fertil Steril* 41:440-447.

Liu JH, Yen SSC (1983) Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 57:797-802.

Loughlin JS, Naddaff PG, Badger TM (1984) LH responses to LHRH in perfused pituitary cell culture: sex differences in the rat. *Am J Physiol* 246:E145-E152

Lutjen PJ, Findlay JK, Trounson AO, Leeton JF, Chan LK (1986) Effect on plasma gonadotropins of cyclic steroid replacement in women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 62:419-423.

March CM, Goebelsmann U, Nakamura RM, Mishell DR Jr (1979) Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone surges. *J Clin Endocrinol Metab* 49:507-513.

Marshall JC, Case GD, Valk TW (1983) Selective inhibition of follicle stimulating hormone secretion by estradiol – a mechanism for modulating gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin releasing hormone. *J Clin Invest* 71:248-257.

Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339.

McArdle CA, Schomerus E, Groner I, Poch A (1992) Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in aT3-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 87:95-103.

McEwen BS (1991) Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12:141-147.

McIntosh RP, McIntosh JE (1985) Amplitude of episodic release of LH as a measure of pituitary function analyzed from the time-course of hormone levels in the blood: comparison of 4 menstrual cycles in an individual. *J Endocrinol* 107:231-239.

Messinis IE (2000) Ovarian regulators of gonadotropin secretion. *Ann N Y Acad Sci* 900:10-15.

Messinis IE (2003) Modulatory effect of the ovary on LH secretion. *Ann N Y Acad Sci* 997:35-41

Messinis IE (2006) Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Update* 12, 557-571

Messinis IE, Templeton AA (1986) The effect of pulsatile follicle stimulating hormone on endogenous luteinizing hormone surge in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 25:633-640.

Messinis IE, Templeton AA (1988) The endocrine consequences of multiple folliculogenesis. *J Reprod Fertil, Suppl* 36:27-37

Messinis IE, Templeton AA (1989) Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. *J Reprod Fertil* 87:633-639

Messinis IE, Templeton AA (1990a) Effects of supraphysiological concentrations of progesterone on the characteristics of the oestradiol-induced gonadotrophin surge in women. *J Reprod Fertil* 88:513-519.

Messinis IE, Templeton AA (1990b) In vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol (Oxf)* 33:213-218.

Messinis IE, Templeton AA (1990c) Superovulation induction in women suppresses luteinising hormone secretion at the pituitary level. *Clin Endocrinol (Oxf)* 32:107-114.

Messinis IE, Templeton AA (1991a) Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol (Oxf)* 34:259-263.

Messinis IE, Templeton AA (1991b) Evidence that gonadotrophin surge-attenuation factor exists in man. *J Reprod Fert* 92:217-223.

Messinis IE, Templeton A, Baird DT (1985) Endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with sequential use of clomiphene citrate and pulsatile human menopausal gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 61:1076-1080

Messinis IE, Hirsch P, Templeton AA (1991) Follicle stimulating hormone stimulates the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf)* 35:403-407.

Messinis IE, Mademtzis I, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Tsolas O, Templeton AA (1992) Positive feedback effect of oestradiol in superovulated women. *Hum Reprod* 7:469-474.

Messinis IE, Koutsoyiannis D, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Lolis D, Templeton AA (1993a) Changes in pituitary response to GnRH during



the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38:159-163.

Messinis IE, Lolis D, Papadopoulos L, Tsahalina T, Papanikolaou N, Seferiadis K, Templeton AA (1993b) Effect of varying concentrations of follicle stimulating hormone on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39:45-50.

Messinis IE, MacTavish A, Templeton AA (1993c) Activity of gonadotrophin surge-attenuating factor during the luteal phase in superovulated women. *J Reprod Fertil* 97:271-275.

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA (1994a) Effect of an increase in FSH on the production of gonadotrophin-surge-attenuating factor in women. *J Reprod Fertil* 101:689-695.

Messinis IE, Lolis D, Papastergiopoulou L, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA (1994b) Effect of follicle stimulating hormone treatment on the pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in post-menopausal women. *Hum Reprod* 9:241-244.

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA (1994c) Modulation of the action of gonadotrophin surge-attenuating factor by gonadotrophin-releasing hormone. *Hum Reprod* 9:1437-1441.

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, Templeton AA (1996) Effect of follicle stimulating hormone or human chorionic gonadotrophin treatment on the production of gonadotrophin surge

attenuating factor (GnSAF) during the luteal phase of the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:169-175

Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K, Hasiotis G, Seferiadis K, Lolis D (1998) Luteinizing hormone response to gonadotrophin-releasing hormone in normal women undergoing ovulation induction with urinary or recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13:2415-2420.

Messinis IE, Papageorgiou I, Milingos S, Asproдини E, Kollios G, Seferiadis K (2001) Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Hum Reprod* 16:1827-1832

Mizumachi M, Voglmayr JK, Washington DW, Chen C-LC, Bardin CW (1990) Superovulation of ewes immunized against human recombinant inhibin a-subunit associated with increased preand postovulatory follicle-stimulating hormone levels. *Endocrinology* 126:1058-1063.

Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ (1991) Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 129:1175-1182.

Molskness, T.A., Woodruff, T.K., Hess, D.L., Dahl, K.D., Stouffer, R.L. (1996) Recombinant human inhibin-A administered early in the menstrual cycle alters concurrent pituitary and follicular, plus subsequent luteal, function in rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 4002–4006.

Micevych P, Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolit P, Lu JK (2003) The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 78:29-35

Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139, 3976–3983.

Miyake A, Tasaka K, Sakumoto T, Kawamura Y, Aono T (1983) Estrogen induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in normal cyclic women. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 1100–1102.

Muttukrishna S, Knight PG (1990) Effects of crude and highly purified bovine inhibin ( $M_r$  32 000) form on gonadotrophin production by ovine pituitary cells in vitro: inhibin enhances gonadotrophin-releasing hormone-induced release of LH. *J Endocrinol* 127:149-159.

Muttukrishna S, Knight PG (1991) Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J Mol Endocrinol* 6:171-178.

Muttukrishna S, Fowler PA, George L, Groome NP, Knight PG (1996) Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3328-3334.

Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E (1978) On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102: 1008-1014.

Nippoldt B, Reame NE, Kelch RP, Marshall JC (1989) The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69:67-76.

Ortmann O, Merelli F, Stojilkovic S, Schulz K, Emons G, Catt K (1994) Modulation of calcium signalling and LH secretion by progesterone in pituitary gonadotropes and clonal pituitary cells. *J Ster Biochem Mol Biol* 48:47–54.

Padmanabhan V, McNeilly AS (2001) Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 121:21-30.

Pappa A, Seferiadis K, Fotsis T, Shevchenko A, Marselos M, Tsolas O, Messinis IE (1999) Purification of a candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid. *Hum Reprod* 14:1449-1456.

Pickering AJ-MC, Fink G (1979) Variation in size of the "readily releasable pool" of luteinizing hormone during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 83:53-59.

Plant TM (1986) Gonadal regulation of hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone release in primates. *Endocr Rev* 7:75-88.

Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L (1994) Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinology* 135:2623-2628.

Radovick S, Wray S, Muglia L, Westphal H, Olsen B, Smith E, Patriquin E, Wondisford FE (1994) Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals. *Horm Behav* 28:520-529.

Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR (1997) Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-neuron signaling pathway. *J Neurosci* 17:9145-9156.

Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger WW, Baldwin DM (1987) The effects of gonadotropin-releasing hormone and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1503-1513.

Reame N, Sauder SE, Kelch RP, Marshall JC (1984) Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 59:328-337.

Rivier J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W (1985) Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochim Biophys Res Commun* 133:120-127.

Rivier C, Vale W (1991) Effects of recombinant activin-A on gonadotrophin secretion in the female rat. *Endocrinology* 129:2463-2465.

Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS (1993) Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1402-1410.

Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, Yen SS (1989) Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1033-1039.

Roy D, Angelini NL, Belsham DD (1999) Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ )- and ER $\beta$ -expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140: 5045- 5053.

Rush ME, Ashiru OA, Lipner H, Williams AT, McRae C, Blake CA (1981) The actions of porcine follicular fluid and estradiol on periovulatory secretion of gonadotropic hormones in rats. *Endocrinology* 108:2316-2323.

Savoy-Moore RT, Schwartz NB, Duncan JA, Marshall JC (1980) Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the estrous cycle. *Science* 209:942-944.

Schally AV, Arimura A, Baba Y (1971) Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43:393-399.

Schenken RS, Anderson WH, Hodgen GD (1984) Follicle-stimulating hormone increases ovarian vein nonsteroidal factors with gonadotropin-inhibiting activity. *Fertil Steril* 42:785-790.

Schneyer AL, O'Neil DA, Crowley Jr WF (1992) Activin-binding proteins in human serum and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1320-1324.

Schreihofler DA, Stoler MH, Shupnik MA (2000) Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 141, 2174–2184.

Schreihofler DA, Rowe DF, Rissman EF, Scordalakes EM, Gustafsson JJA, Shupnik MA (2002) Estrogen receptor-alpha (ERalpha), but not ERbeta, modulates estrogen stimulation of the ERalpha-truncated variant, TERP-1. *Endocrinology* 143, 4196–4202.

Schumacher M (1990) Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci* 13: 359–361.

Schwall RH, Nikolics K, Szonyi E, Gorman C, Mason AJ (1988) Recombinant expression and characterization of human activin A. *Mol Endocrinol* 2:1237-1242.



Scott CJ, Tilbrook AJ, Rawson JA, Clarke IJ (2000) Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci* 60-61:313-326.

Sharpless JL, Supko JG, Martin KA, Hall JE (1999) Disappearance of endogenous luteinizing hormone is prolonged in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:688-694.

Shen ES, Meade EH, Pe´rez MC, Deecher DC, Negro-Vilar A, Lopez FJ (1998) Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology* 139:939-948.

Shoham Z, Schachter M, Loumaye E, Weissman A, MacNamee M, Insler V (1995) The luteinizing hormone surge-the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering. *Fertil Steril* 64:237-251.

Sim JA, Skynner MJ, Herbison AE (2001) Direct regulation of postnatal GnRH neurons by the progesterone derivative allopregnanolone in the mouse. *Endocrinology* 142:4448-4453.

Simon JA, Bustillo M, Thorneycroft IH, Cohen SW, Buster JE (1987) Variability of midcycle estradiol positive feedback: evidence for unique pituitary responses in individual women. *J Clin Endocrinol Metab* 1987,789-793.

Skinner DC, Evans NP, Delaleu B, Goodman RL, Bouchard P, Caraty A (1998) The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10978-10983.

Skinner DC, Caraty A, Allingham R (2001) Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* 142:573-579.

Skyenner MJ, Sim JA, Herbison AE (1999) Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140: 5195-5201.

Smith MJ, Jennes L (2001) Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122:1-10.

Sollenberger MJ, Carlsen EC, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS (1990a) Specific physiological regulation of LH secretory events throughout the human menstrual cycle: new insights into the pulsatile mode of gonadotropin release. *J Neuroendocrinol* 2:845-852.

Sollenberger MJ, Carlsen EC, Booth RA Jr, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS (1990b) Nature of gonadotropin-releasing hormone self-priming of luteinizing hormone secretion during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 163:1529-1534.

Sopelak VM, Hodgen GD (1984) Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys: a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertil Steril* 41:108-113.

Soules, M.R., Steiner, R.A., Clifton, D.K., Cohen, N.L., Aksel, S., Bremner, W.J. (1984) Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 378–383.

Southworth MB, Matsumoto AM, Gross KM, Soules MR, Bremner WJ (1991) The importance of signal pattern in the transmission of endocrine information: pituitary gonadotropin response to continuous and pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1286-1289.

Speight A, Fink G (1981a) Changes in responsiveness of dispersed pituitary cells to luteinizing hormone releasing hormone at different times of the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 89:129-134.

Speight A, Fink G (1981b) Comparison of steroid and LH-RH effects on the responsiveness of hemipituitary glands and dispersed pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 24:267-281.

Sprangers, S.A., Fahrenbach, W.H. and Bethea, C.L. (1991) Steroid action on estrogen and progestin receptors in monkey pituitary cell cultures. *Endocrinology*, 128, 1907–1917.

Stouffer RL, Woodruff TK, Dahl KD, Hess DL, Mather JP, Molskness TA (1993) Human recombinant activin-a alters pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 77:241-248.

Sullivan K, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ (1995) GnRH neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res* 685:198-200.

Tavoulari S, Frilingos S, Karatza P, Messinis IE, Seferiadis K (2004) The recombinant subdomain IIIB of human serum albumin displays activity of gonadotrophin surge-attenuating factor. *Hum Reprod* 19: 849-858.

Taylor AE, Whitney H, Hall JE, Martin K, Crowley WF (1995) Midcycle levels of sex steroids are sufficient to recreate the follicle-stimulating hormone but not the luteinizing hormone midcycle surge: evidence for the contribution of other ovarian factors to the surge in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1541-1547.

Tio S, Koppelaar D, Bardin CW, Cheng CY (1994) Purification of gonadotrophin surge attenuating factor from Sertoli cell-enriched culture medium. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1229-1236.

Tsai CC, Yen SS (1971) Acute effects of intravenous infusion of 17-beta-estradiol on gonadotropin release in pre- and post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 32:766-771

Tse A, Tse FW, Almers W, Hille B (1993) Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science* 260:82-84.

Turgeon JL, Waring DW (1990) Rapid augmentation by progesterone of agonist-stimulated luteinizing hormone secretion by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 122:773-780.

Turgeon JL, Waring DW (1992) Functional cross-talk between receptors for peptide and steroid hormones. *Trends Endocrinol Metab* 3:360-365.

Turgeon JL, Waring DW (1994) Activation of the progesterone receptor by the gonadotropin-releasing hormone self-priming signaling pathway. *Mol Endocrinol* 8:860-869.

Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J (1986) Purification and characterization of a FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321:776-779.

Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko P, Petraglia F, Yu J, Plotsky P, Spiess J, Rivier J (1988) Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 44:1-34.

van Dielen JAMJ, de Koning J, van Rees GP (1989) Regulation by ovarian factors of the LHRH-induced LH response in pituitary glands in situ or grafted under the kidney capsule in intact and ovariectomised rats. *J Endocrinol* 123:41-45.

Veldhuis JD, Beitins IZ, Johnson ML, Serabian MA, Dufau ML (1984) Biologically active luteinizing hormone is secreted in episodic pulsations that vary in relation to stage of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 58:1050-1058.

Veldhuis JD, Evans WS, Johnson ML, Wills MR, Rogol AD (1986) Physiological properties of the luteinizing hormone pulse signal: impact of intensive and extended venous sampling paradigms on its characterization in healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 62:881-891.

Wallace JM, Martin GB, McNeilly AS (1988) Changes in the secretion of LH pulses, FSH and prolactin during the preovulatory phase of the oestrous cycle of the ewe and the influence of treatment with bovine follicular fluid during the luteal phase. *J Endocrinol* 116:123-135.

Wang CF, Lasley BL, Lein A, Yen SSC (1976) The functional changes of the pituitary gonadotrophs during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 42:718-728.

Wang QF, Famworth PG, Findlay JK, Burger HG (1988) Effects of purified 31 kDa bovine inhibin on the specific binding of GnRH to rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 123:2161-2166.

Wang QF, Famworth PG, Findlay JK, Burger HG (1990) Chronic inhibitory effect of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP) or follistatin on activin- and gonadotrophin-releasing hormone-stimulated FSH synthesis and secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 127:1385-1393.

Watson RE, Langub MC, Landis JW (1992) Further evidence that most luteinizing hormone-releasing hormone neurons are not directly estrogen-responsive: simultaneous localization of luteinizing hormone-releasing hormone and estrogen-receptor immunoreactivity in the guinea-pig brain. *J Neuroendocrinol* 4:311-318.

Wildt , Hausler A, Marsall G, Hutchinson JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E (1981) Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109:376-385.

Wilson RC, Kesner JS, Kaufman JM, Uemura T, Akema T, Knobil E (1984) Central electrophysiologic correlates of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 39:256-260.

Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M (1992) A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131, 2812–2820.

Yasin M, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Kerrigan JR, Marshall JC (1995) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol. *Endocrinology* 136:1559-1564.

Yen SSC (1991) The human menstrual cycle. In: Yen SSC, Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology* 3<sup>rd</sup> ed. Saunders Company, Philadelphia, PA: Saunders

Yen SS, Tsai CC (1971) The effect of ovariectomy on gonadotropin release. *J Clin Invest* 50:1149-1153.

Yen SS, Tsai CC (1972) Acute gonadotropin release induced by exogenous estradiol during the mid-follicular phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 34:298-305

Young JR, Jaffe RB (1976) Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 42,432–442.