

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ – ΠΑΙΔΙΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΘΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣ
ΑΛΛΗΛΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΩΝ ΓΥΝΑΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ
ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ (GnSAF)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΝΑ ΑΝ. ΔΗΜΗΤΡΑΚΗ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Στο άπαν, το σύζυγο και το γιο μου

Στους αέναους συμπαραστάτες μου, τους γονείς μου

Στον μέντορά μου, Καθηγητή Ιωάννη Ε. Μεσσήνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ - ΥΠΟΦΥΣΗ – ΓΟΝΑΔΕΣ	
Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (GnRH)	15
Η έκκριση της GnRH	16
Η ρύθμιση της έκκρισης GnRH	18
Γοναδοτροφίνες	24
Η έκκριση των γοναδοτροφινών	24
B. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	
Θετικός και αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης	28
Ωοθυλακική φάση	31
Μέση κύκλου	36
Ωχρινική φάση	45
Μετάβαση από την ωοθυλακική στην ωχρινική φάση	46
Παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF)	49
Γ. ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	
Ορμονικές μεταβολές στην περιεμμηνόπαυση	60
Ορμονικές μεταβολές στην εμμηνόπαυση	61
Οιστρογόνα	61
Ανδρογόνα	62
Μεταβολές στην έκκριση των γοναδοτροφινών	65
Δράση γοναδοτροφινών στην ωοθήκη	66
Ο μεταβολισμός των γοναδοτροφινών μετά την εμμηνόπαυση	67
Η επίδραση της ηλικίας	68
Υποθαλαμικές μεταβολές με την ηλικία	68
Μεταβολές στην έκκριση των γοναδοτροφινών- υπόφυση με την ηλικία	70
Η επίδραση της ηλικίας στον αρνητικό μηχανισμό των οιστρογόνων και της προγεστερόνης	71
Η επίδραση της ηλικίας στον θετικό μηχανισμό των οιστρογόνων και της προγεστερόνης	73
Αναπάντητα ερωτήματα	76
Σκοπός της εργασίας	79

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	90
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	91
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	92
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	114
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	122
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	125
SUMMARY	128
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι γνωστό ότι κατά την αναπαραγωγική ηλικία, οι μηχανισμοί παλίνδρομης αλληλορρύθμισης καθορίζουν τις σχέσεις των ωοθηκών με το υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα και τη φυσιολογική λειτουργία του γεννητικού άξονα (Messinis, 2006). Μετά την εμμηνόπαυση ο αρνητικός μηχανισμός καταργείται, με αποτέλεσμα η στάθμη των γοναδοτροφινών, FSH και LH, στο αίμα να αυξάνει σε επίπεδα δεκαπλάσια του φυσιολογικού. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη έκκριση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση με παράλληλη αύξηση της υποθαλαμικής ορμόνης GnRH (Hall, 2004). Η υπόφυση και ο υποθάλαμος διατηρούν την ικανότητα να απαντούν στον αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, εφόσον η στάθμη των οιστρογόνων στο αίμα αυξηθεί μετά την εξωγενή χορήγησή τους (Gill et al., 2002). Παρόλα αυτά, αν και η έκκριση των γοναδοτροφινών, αυξάνει σταδιακά μέχρι την εμμηνόπαυση (Landgren et al., 2004), με την πάροδο των ετών μετά την εμμηνόπαυση παρατηρείται μία σταδιακή μείωση της έκκρισης, έτσι ώστε στις δεκαετίες των '80 και '90 ετών τα επίπεδα της FSH και της LH να έχουν καμφθεί σημαντικά (Lambalk et al., 1997; Baccarelli et al., 2001). Η μείωση αυτή ωστόσο δεν φαίνεται να οφείλεται στη στην ελάττωση της διεγερτικής επίδρασης του υποθαλάμου στην υπόφυση, καθώς η υποθαλαμική παραγωγή της GnRH φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας (Gill et al., 2002b). Εντούτοις η *in vivo* απάντηση των δύο γοναδοτροφινών στη διεγερτική επίδραση της GnRH αμβλύνεται κατά τα όψιμα μετεμμηνόπαυσιακά έτη (Shaw et al., 2009). Είναι επομένως πιθανόν ότι η ελάττωση της παραγωγής των γοναδοτροφινών οφείλεται στην ηλικία και

τη γήρανση, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία διαφόρων οργάνων του σώματος συμπεριλαμβανομένης της υπόφυσης. Δεν είναι γνωστό εάν η παραπάνω διαδικασία αφορά και μεταβολές στο θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης των οιστρογόνων με την ηλικία. Εώς σήμερα η επίδραση της ηλικίας στο θετικό μηχανισμό των οιστρογόνων διερευνήθηκε σε μια μελέτη (Shaw et al., 2011), όπου παρατηρήθηκε ένα ενδογενές κύμα της LH αν και ελαττωμένο ακόμη και σε γυναίκες άνω των 70 ετών, σαν απάντηση στην εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων και προγεστερόνης. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ τη διατήρησης του θετικού μηχανισμού στην εμμηνόπαυση (Shaw et al., 2011). Ωστόσο στη μελέτη αυτή ήταν ο θετικός μηχανισμός της προγεστερόνης, που μελετήθηκε, ενώ δεν έχει αξιολογηθεί η επίδραση μόνο των οιστρογόνων.

Στον φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του θετικού μηχανισμού στη μέση του κύκλου είναι η οιστραδιόλη, η οποία αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκκρισης των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου. Το στεροειδές αυτό διαμεσολαβεί και για την αρνητική επίδραση των ωοθηκών στην υπόφυση. Αν και αυτές οι αλληλεπιδράσεις εξηγούν γιατί τα επίπεδα ορού της LH παραμένουν σταθερά χαμηλά κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης και αυξάνονται σημαντικά μόνο στη μέση του κύκλου, η όλη διαδικασία δεν είναι ακόμη πολύ καλά κατανοητή.

Ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί την υπόφυση στην GnRH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Κατά τη διάρκεια ενός αυτόματου γεννητικού κύκλου η ευαισθητοποιός επίδραση της οιστραδιόλης εκδηλώνεται μόνο κατά

την προωθυλακιωρηκτική περίοδο, δηλαδή πριν την έναρξη του μεσοκυκλικού κύματος της LH ενώ κατά τη διάρκεια μιας προσομοιωμένης ωθυλακικής φάσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η αυξητική επίδραση της οιστραδιόλης στην απάντηση της LH στην GnRH είναι εμφανής σε όλη τη διάρκεια της ωθυλακικής φάσης και αυξάνεται παράλληλα με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης .

Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι οι ωθήκες παράγουν μια ουσία, η οποία ανταγωνίζεται την ευαισθητοποιό δράση της οιστραδιόλης στην υπόφυση κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους της ωθυλακικής φάσης. Η ουσία αυτή είναι ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο GnSAF συμμετέχει στους φυσιολογικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την έκκριση της LH κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου. Δεδομένα δείχνουν ότι ο GnSAF παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες από μικρά παρά από μεγάλα κοιλотικά ωθυλάκια (Fowler et al., 2001). Από τα υπάρχοντα in vivo και in vitro δεδομένα έχει αναπτυχθεί η υπόθεση ότι ο GnSAF παράγεται κυρίως κατά το πρώτο ήμισυ της ωθυλακικής φάσης του κύκλου από το ωριμάζον ωθυλάκιο, ενώ η δραστηριότητά του ελαττώνεται στη συνέχεια κατά το υπόλοιπο ήμισυ της ωθυλακικής φάσης (Messinis, 2006). Ωστόσο στη βιβλιογραφία απουσιάζουν παρόμοια δεδομένα in vivo.

Μετά την ενδελεχή και τεκμηριωμένη μελέτη της βιβλιογραφίας, καταλήξαμε στην ανάπτυξη δύο ερευνητικών πρωτοκόλλων, με σκοπό να διερευνήσουμε αφενός τους μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των ωθηκικών στεροειδών στην εμμηνόπαυση και σε συσχέτιση με τη μετεμμηνοπαυσιακή

ηλικία και αφετέρου τη βιολογική δραστικότητα του παράγοντα αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF) κατά την ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, Διευθυντή της Παν. Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής και επιβλέποντα στην τριμελή Επιτροπή, για την εμπιστοσύνη του κατά την ανάθεση της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, την ουσιαστική του καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του στην ολοκλήρωση της. Επίσης, επιθυμώ ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της Επιτροπής, Αναπληρωτές Καθηγητές Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη και κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο. Θέλω επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θράκης, κα Νικολέτα Κουτλάκη, για την πολύτιμη βοήθειά της στην εξεύρεση εθελοντριών γυναικών και στην διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την κα Θεοδώρα Γκιοκά, Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Παναγιώτη Γεωργούλια για τις ορμονικές μετρήσεις.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ – ΥΠΟΦΥΣΗ - ΓΟΝΑΔΕΣ

Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (GnRH)

Η φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία στις γυναίκες περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ωοθυλακικής ανάπτυξης, ωοθυλακιορρηξίας, σχηματισμού και εκφύλισης του ωχρού σωματίου. Η κανονικότητα των κύκλων αυτών επιτυγχάνεται μέσα από τον συγχρονισμό της υποθαλαμικής, υποφυσιακής και ωθηκικής λειτουργίας. Αφετηρία του αναπαραγωγικού άξονα αποτελεί η παλμική έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροφινών (gonadotrophin releasing hormone - GnRH) από τους υποθαλαμικούς νευρώνες, η οποία επάγει την έκκριση της ωοθυλακιότροπου (follicle stimulating hormone - FSH) και ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone - LH) από τα γοναδοτρόφα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Οι FSH και LH επάγουν την έκκριση οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τις ωοθήκες. Τα στεροειδή αυτά ασκούν τη δράση τους στο επίπεδο τόσο του υποθαλάμου όσο και της υπόφυσης και ρυθμίζουν την έκκριση των γοναδοτροφινών, στα πλαίσια θετικών και αρνητικών μηχανισμών παλίνδρομης αλληλορρύθμισης.

Η GnRH, που στη φυσική της μορφή είναι ένα ευέλικτο μόριο το οποίο σχηματίζει μια τύπου 2 β στροφή στις θέσεις Gly⁶ - Leu⁷, αποτελεί δεκαπεπτίδιο, που ελέγχει τη βιοσύνθεση τόσο της LH όσο και της FSH στην υπόφυση (Seeburg et al., 1987). Στα πρωτεύοντα θηλαστικά το κύριο δίκτυο GnRH νευρικών κυτταρικών σωμάτων εντοπίζεται στον πρόσθιο (προοπτική περιοχή), οπίσθιο και μέσο (τοξοειδή και υπερκοιλιακό πυρήνα)

βασικό υποθάλαμο, το οσφρητικό φύμα, τον πυρήνα της διαγώνιας δέσμης, το αγγειώδες σπείραμα του τελικού πετάλου. Υπάρχουν περίπου 7000 νευρώνες GnRH υπεύθυνοι για τη ρύθμιση των γοναδοτροφινών στον άνθρωπο, διάσπαρτοι στον υποθάλαμο (De La Iglesia et al., 2006).

Περισσότερες από είκοσι ισομορφές της GnRH έχουν εντοπιστεί στα διάφορα είδη (Kauffman, 2004). Με συχνότερη την GnRH I, σχεδόν όλα τα ζώα, που έχουν μελετηθεί εκφράζουν τις GnRH I (χρωμόσωμα 8p) και II (χρωμόσωμα 20p13). Σε αντιστοιχία με τις ισομορφές GnRH, έχουν προσδιοριστεί δύο κύριοι τύποι GnRH υποδοχέων, οι τύπου 1 (χρωμόσωμα 4) και 2 (Cheng, 2005).

Η έκκριση της GnRH

Η παλμική έκκριση της GnRH στο πυλαίο υποφυσιακό σύστημα αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του αναπαραγωγικού συστήματος. Για την εκτίμηση της παλμικής έκκρισης της GnRH χρησιμοποιούνται οι περιφερικές εκκρινικές ώσεις της LH (Clarke & Cummins, 1982; Wilson et al., 1984; Levine et al., 1991; Moenter et al., 1991) και της ελεύθερης α-υπομονάδας των γοναδοτροφινών (FAS), καθώς αυτή έχει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής από την LH (Kourides et al., 1977; Sharpless et al., 1999) και η κάθαρσή της στο πλάσμα παραμένει αμετάβλητη στην εμμηνόπασση (Sharpless et al., 1999).

Οι πρώτες παρατηρήσεις για αυτή τη μορφή έκκρισης και την αναγκαιότητά της για τη φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροφινών προήλθαν από πειράματα σε ωθηκεκτομηθέντες πιθήκους, στους οποίους είχε καταστραφεί ο μέσος βασικός υποθάλαμος (Knobil, 1980), με αποτέλεσμα την κατάργηση της κατά ώσεις έκκρισης της LH και FSH. Η χορήγηση σ'αυτούς GnRH έδειξε ότι η διαλείπουσα διέγερση της υπόφυσης με ρυθμό μιας ώσης ανά 60

έως 90 min προκαλεί την έκκριση της LH και FSH (Belchetz et al., 1978; Nakai et al., 1978). Ωστόσο η αύξηση της συχνότητας χορήγησης της GnRH από τον φυσιολογικό ρυθμό της μίας ώσης ανά ώρα σε δύο ή περισσότερες δόσεις είχε ως αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων των γοναδοτροφινών σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Wildt et al., 1981). Οι παραπάνω παρατηρήσεις δείχνουν ότι προκαλείται ένα είδος αντίστασης της υποφύσεως, η οποία κάθε φορά βρίσκεται σε ανερέθιστη περίοδο (Palkovits, 2003; Μεσσήνης, 2005). Από την άλλη πλευρά, η ελάττωση των ώσεων της GnRH ευνοεί κυρίως τη σύνθεση FSH (Pohl et al., 1983; Gross et al., 1987; Spratt et al., 1987; Adams et al., 1988; Finkelstein et al. 1988; Filicori et al., 1989; Crowley et al., 1991) αυξάνοντας τη σχέση FSH : LH στην κυκλοφορία, λόγω της αύξησης της άμεσης προς έκκριση (πρώτης) δεξαμενής των γοναδοτρόφων κυττάρων (θα αναλυθεί παρακάτω) και του μικρότερου χρόνου ημίσειας ζωής της LH σε σχέση με της FSH (47 min έναντι 240 min) (Veldhuis et al., 1987; Urban et al., 1991). Η σταθερή χορήγηση GnRH συνδέεται με μια παροδική μόνο έκκριση της FSH και της LH (Plant et al., 1978) και τελικά με την καταστολή των επιπέδων των γοναδοτροφινών (Southworth et al., 1991).

Αναφορικά με τη δόση της GnRH που απαιτείται, έχει αποδειχθεί *in vitro* ότι πρέπει αυτή να διακυμαίνεται μεταξύ συγκεκριμένων τιμών ώστε να είναι αποτελεσματική για την έκκριση των γοναδοτροφινών, την έκφραση των γονιδίων των υπομονάδων τους και την προς τα άνω ρύθμιση (*up-regulation*) των υποδοχέων της GnRH (Garcia et al., 1984; Haisenleder et al., 1990; Iliff-Sizemore et al., 1990).

Η ρύθμιση της έκκρισης της GnRH

Η έκκριση της GnRH εξαρτάται από περίπλοκους μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (feedback), τόσο θετικούς (διεγερτικούς) όσο και αρνητικούς (ανασταλτικούς) μεταξύ του δεκαπεπτιδίου με άλλες νευροορμόνες, τις γοναδοτροφίνες και τις ορμόνες των ωθηκών. Σχηματικά, οι μηχανισμοί αυτοί είναι οι ακόλουθοι:

- Ο μακρύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (long feedback loop) που αναφέρεται στην feedback επίδραση των κυκλοφορούντων 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 το αρνητικό feedback των υποφυσιακών ορμονών πάνω στην έκκρισή τους, κυρίως μέσω αρνητικών επιδράσεων στην έκκριση της GnRH.
- Ο υπερβραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (ultrashort feedback), που αναφέρεται στην αναστολή της σύνθεσης της GnRH από αυτή την ίδια (Μεσσήνης, 2005).

Ο ρόλος των νευροδιαβιβαστών

Παρά το γεγονός ότι ένας σημαντικός αριθμός νευροδιαβιβαστών εμπλέκονται στον έλεγχο της έκκρισης GnRH σε διάφορα είδη ζώων, μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτούς φαίνεται να έχει επίδραση στον άνθρωπο. Έτσι το α αδρενεργικό σύστημα, που ασκεί διεγερτική δράση σε έναν αριθμό ζωικών ειδών - η νοραδρεναλίνη ή ένας α_1 - αδρενεργικός αγωνιστής διεγείρουν την έκκριση της GnRH σε ωθηκεκτομηθέντες πιθήκους - εντούτοις

δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στον έλεγχο του εμμηνορρυσιακού κύκλου στον άνθρωπο. Ο ρόλος του ντοπαμινεργικού συστήματος παραμένει αμφιλεγόμενος αν και σε μελέτες έχει διαπιστωθεί αύξηση στη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH μετά τη χορήγηση ενός ανταγωνιστή ντοπαμίνης σε γυναίκες με υποθαλαμική αμηνόρροια (Saper et al., 2001; Osterlund et al., 2001). Οι ενδορφίνες φαίνεται ότι διαδραματίζουν ανασταλτικό ρόλο τόσο στη λειτουργία του GnRH βηματοδότη όσο και στον αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της προγεστερόνης στην παλμική έκκριση της GnRH (Marks et al., 1990; Scott et al., 2000) ενώ δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο στον αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της οιστραδιόλης στον υποθάλαμο, όπου φαίνεται να εμπλέκεται το γ-αμινοβουτυρικού οξύ (GABA). Επιπλέον, η ουσία P, η σεροτονίνη, η νευροτενσίνη, το νευροπεπτίδιο Y, η νευροκινίνη B, το γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ, οι αυξητικοί παράγοντες FGF, TGF α και IGF-I (insulin-like growth factor), το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η οξυτοκίνη και το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (vasoactive intestinal polypeptide – VIP) ασκούν ευοδωτική δράση στην έκκριση GnRH ενώ η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροφίνης (corticotrophin releasing hormone-CRH) ασκεί ανασταλτική δράση εμποδίζοντας με τη μεσολάβηση των ενδογενών οπιοειδών.

Πρόσφατα έχει αναδειχθεί ο κεντρικός ρόλος της κισσπεπτίνης (kisspeptin) στον έλεγχο της έκκρισης GnRH. Η κισσπεπτίνη (γνωστή ως μεταστατίνη (metastatin)) είναι μια G-πρωτεΐνη, που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το Kiss1 γονίδιο, το οποίο ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένα ανθρώπινο κατασταλτικό της μετάστασης γονίδιο. Έχει φανεί ότι η κισσπεπτίνη και ο υποδοχέας της (GPR54) είναι απαραίτητοι για την έναρξη της ήβης (Teles et

al., 2008). Η χορήγηση κισπεπτίνης, τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά, προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη έκκριση της LH μέσω της διέγερσης GnRH, και μάλιστα σε δόσεις σημαντικά χαμηλότερες από οποιαδήποτε άλλη ουσία διεγερτική της LH, που έχει μέχρι τώρα μελετηθεί (Gottsh et al., 2004, Thompson et al., 2004, Navarro et al., 2005; Messenger et al., 2005; Dhillo et al., 2005). Με ραδιοσήμανση έχει αποδειχθεί ότι ένα υψηλό ποσοστό (77%) των GnRH νευρώνων συνεκφράζουν GPR54 mRNA ενώ με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας τεκμηριώθηκε η αύξηση της νευρωνικής ενεργοποίησης των GnRH νευρώνων 2 ώρες μετά τη χορήγηση κισπεπτίνης κατά 86% (Irwig et al., 2004). Επιπλέον το γονίδιο Kiss1 εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου που είναι γνωστό ότι είναι σημαντικές στη ρύθμιση της GnRH, όπως ο τοξοειδής και προοπτικός πυρήνας (Greives et al., 2007; Revel et al., 2007). Η χορήγηση κισπεπτίνης στον εγκέφαλο θηλυκών πειραματοζώων φαίνεται ότι επάγει την ωορρηξία και επιταχύνει την έναρξη της εφηβείας (Matsui et al 2004). Έτσι, έχει προταθεί ότι το σύστημα Kiss1/GPR54 ελέγχει τον ωοθηκικό κύκλο ρυθμίζοντας με δύο τρόπους την έκκριση της GnRH: νευρώνες κισπεπτίνης στον προοπτικό πυρήνα φέρονται να επάγουν την αιχμή της LH και έτσι να μεσολαβούν στο θετικό feedback των οιστρογόνων στην απελευθέρωση της GnRH, ενώ νευρώνες κισπεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα φέρονται να προκαλούν τις ώσεις GnRH μεσολαβώντας έτσι στον αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων (Maeda et al., 2007). Φαίνεται ότι η κισπεπτίνη είναι επίσης ευαίσθητη στα επίπεδα των κυκλοφορούντων στεροειδών φύλου, καθώς οι νευρώνες που εκφράζουν Kiss1 mRNA έχουν υποδοχείς φυλετικών στεροειδών τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά ποντίκια. Επιπλέον, και άλλοι ρυθμιστές του

γοναδοτροφικού άξονα (λεπτίνη) επάγουν τις δράσεις τους μέσω του συστήματος της κισπεπτίνης.

Ο ρόλος της υποφύσεως

Οι γοναδοτροφίνες, FSH και LH δρουν ανασταλτικά στην έκλυση της GnRH (βραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης – short feedback). Η δράση της PRL είναι επίσης ανασταλτική στην έκκριση της GnRH. Έχει πιθανολογηθεί αναστολή της έκκρισης της GnRH τοπικά μέσα στον υποθάλαμο από την ίδια την GnRH (υπερβραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης – ultrashort feedback) (Μεσσήνης, 2005).

Ο ρόλος των στεροειδών ορμονών

Έχει αποδειχτεί ότι η δράση των οιστρογόνων στους GnRH νευρώνες μπορεί να ασκείται άμεσα αλλά και έμμεσα. Ο προωθητής του γονιδίου της GnRH έχει δείχτεί ότι περιέχει λειτουργικά τμήματα που απαντούν στα οιστρογόνα (Klungland et al., 1993; Radovick et al., 1994) ενώ έχει αποδειχτεί σε GnRH νευρώνες επίμυος η ύπαρξη και η κυκλική έκφραση mRNA τόσο για τους ER α όσο και για τους ER β (Skynner et al., 1999). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα οιστρογόνα ασκούν ταχεία μη γονιδιακή δράση σε διάφορους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Schumacher, 1990; McEwen, 1991; Lagrange et al., 1995).

Η προγεστερόνη 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 (Leranth et al., 1992; King et al.,

1995; Skinner et al., 2001). Πιθανόν η προγεστερόνη να έχει 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 σε αλλοπρεγνενολόνη, η οποία αποτελεί τον κύριο νευροεκκριτικό μεταβολίτη της στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ασκεί άμεση επίδραση μέσω της αλλοστεροειδικής τροποποίησης των υποδοχέων GABA-A (Sim et al., 2001).

Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη επηρεάζουν την έκκριση της GnRH με θετική και αρνητική επίδραση στον υποθάλαμο. Πρόκειται για τον μακρύ μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (long feedback), ο οποίος θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω.

Όσον αφορά τα ανδρογόνα, στον υποθάλαμο προβάτου έχουν εντοπισθεί υποδοχείς ανδρογόνων (Scott et al., 2000).

Τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών ασκούν ανασταλτική δράση στην αναπαραγωγική λειτουργία και πιθανολογείται η άμεση επίδρασή τους στους GnRH νευρώνες (Ahima & Harlan, 1992).

Μη στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών

Η ανακάλυψη νευρώνων στον υποθάλαμο που περιείχαν β_A και β_B υπομονάδες των ακτιβίνων έκανε πιθανή την εμπλοκή τους στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH (Vale et al. 1988). Επιπλέον, ο υποδοχέας της ακτιβίνης (ActRII) βρέθηκε ότι εκφράζεται σε κύτταρα του υπερχιασματικού, υπεροπτικού, παρακοιλιακού και τοξοειδή πυρήνα (Cameron et al. 1994).

Φαίνεται ότι η ακτιβίνη δρα ευοδωτικά στις δράσεις της GnRH μέσω της προώθησης της μεταγραφής των δύο FSH β και του γονιδίου του υποδοχέα της GnRH (GNRHR)(Kramer et al., 2000).

Οι ινχιμπίνες δρουν ως ειδικοί ανταγωνιστές των διεγερτικών δράσεων της ακτιβίνης στην FSH μέσω πρόσδεσης στη β-γλυκάνη και απομόνωσης του τύπου II υποδοχέων ακτιβίνης χωρίς όμως από μόνες τους να έχουν κάποια επίδραση στην έκκριση της GnRH (Wray et al.,1996; Calogero et al., 1998).

Η φολλιστατίνη είναι αυξημένη με την παρουσία ταχέων συχνοτήτων διεγερτικών ώσεων GnRH και μειώνεται με βραδύτερες συχνότητες (Fueshko et al.,1998), πράγμα που υποδεικνύει ένα ρόλο για το σύστημα ακτιβίνης / φολλιστατίνης στη μεταγωγή του σήματος της συχνότητας ώσεων της GnRH στην FSH.

Κιρκαδιανοί ρυθμοί-ύπνος

Υπάρχουν πλέον σημαντικές ενδείξεις ότι ο ύπνος επηρεάζει άμεσα την παλμική έκκριση της LH και πιθανώς εκείνη της GnRH, παρόλο που ο υποκείμενος μηχανισμός είναι άγνωστος. Έχει φανεί ότι η εφηβεία στα αγόρια και κορίτσια χαρακτηρίζεται από ένα διεγερτικό ρόλο του ύπνου στην παλμική έκκριση της LH (Jennes et al.,1985). Αντιθέτως, με την ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος και την έναρξη των ωοθυλακιορρηκτικών κύκλων, υπάρχει μια αξιοσημείωτη επιβράδυνση της παλμικής έκκρισης της LH τη νύχτα στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου (Witkin et al., 1990; Campell et al., 2005). Μελέτες έχουν δείξει όχι μόνο ότι η επιβράδυνση της παλμικής έκκρισης της LH οφείλεται στον ύπνο παρά στην ώρα της ημέρας, αλλά επίσης, ότι κατά τη διάρκεια του ύπνου, σύντομες περίοδοι εγρήγορσης

συνδέονται με την έναρξη των ώσεων της LH (Witkin et al., 1996) και η αιχμή της LH συμβαίνει συχνότερα τη νύχτα στις γυναίκες (Kauffman, 2004). Αντίθετα δεν έχει διαπιστωθεί κάποιος ενδογενής κίρκαδιανός ρυθμός στην έκκριση της LH ή FSH σε νέες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, παρά την παρουσία ισχυρών κίρκαδιανών ρυθμών στην έκκριση της κορτιζόλης και της εκλυτικής των θυρεοειδικών ορμονών (TSH) (Cheng, 2005).

Γοναδοτροφίνες

Η έκκριση των FSH και LH από τα γοναδοτρόφα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης βρίσκεται υπό την ευοδωτική επίδραση του υποθαλάμου μέσω της GnRH. Η GnRH ασκεί τη δράση της μέσω ειδικών υποδοχέων, που υπάρχουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των γοναδοτρόφων κυττάρων.

Η έκκριση των γοναδοτροφινών

Η έκκριση των γοναδοτροφινών εμφανίζει τρεις τύπους 1) την τονική ή βασική έκκριση (πρόκειται για συνεχή έκκριση γοναδοτροφινών, ο βαθμός της οποίας ρυθμίζεται από την αρνητική επίδραση των στεροειδών) 2) την κυκλική έκκριση (αφορά στην εκκριτική αιχμή των γοναδοτροφινών στο μέσο του γεννητικού κύκλου λόγω της θετικής επίδρασης των οιστρογόνων) 3) την κατά ώσεις ή επεισοδιακή έκκριση (γίνεται ανά 1-2 ώρες ανεξάρτητα αν υπάρχει τονική ή κυκλική έκκριση και θεωρείται αποτέλεσμα των αντίστοιχων ώσεων του GnRH βηματοδότη). Το εύρος των ώσεων καθορίζεται από την ποσότητα της GnRH που φθάνει στα γοναδοτρόφα και την ευαισθησία αυτών

(ορμονικό περιβάλλον-ωοθηκικά στεροειδή) και ο τύπος των ώσεων επηρεάζεται επίσης από την έκκριση των ωοθηκικών στεροειδών. Παρουσία οιστρογόνων αυξάνει το εύρος και η συχνότητα των ώσεων, ενώ η προγεστερόνη ελαττώνει τη συχνότητα και αυξάνει το εύρος τους. Έτσι η συχνότητα των ώσεων της *in vitro* βιολογικά δραστικής LH φάνηκε ότι είναι μεγαλύτερη στην όψιμη ωοθυλακική, ελάχιστη στην ωχρινική και ενδιάμεση στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου (Veldhuis et al., 1984).

Έχει αποδειχθεί πως στον άνθρωπο η αποθήκευση των γοναδοτροφινών στα γοναδοτρόφα κύτταρα γίνεται με τη μορφή δύο δεξαμενών. Πρόκειται για τη λεγόμενη πρώτη δεξαμενή ή άμεσα ελευθερώσιμη, που 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 η δεύτερη δεξαμενή, που αντιπροσωπεύει μία μορφή αποθήκευσης της LH, η οποία απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία πριν γίνει προσιτή για έκκριση, και παριστά τις εφεδρείες των γοναδοτρόφων κυττάρων (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976; Blake, 1978; Pickering & Fink, 1979). Τα ωοθηκικά στεροειδή και κυρίως η οιστραδιόλη μεταβάλλουν την ικανότητα των γοναδοτρόφων να απαντούν στο σήμα της GnRH (Messinis, 2000), με αποτέλεσμα τόσο η ευαισθησία όσο και η εφεδρική δεξαμενή να είναι ελάχιστες κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, μεγαλύτερες κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, μέγιστες κατά το μέσο και κάπως μικρότερες (αν και ακόμη αυξημένες) κατά την ωχρινική φάση του κύκλου. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό για την εκδήλωση του ενδογενούς κύματος της LH (Messinis, 2000) κατά το μέσον του κύκλου, οπότε η πρώτη δεξαμενή

αυξάνει σημαντικά, ίσως μέσω μιας ενδοκυττάριας μετατόπισης της ορμόνης από την εφεδρική δεξαμενή, με αποτέλεσμα την εκδήλωση του κύματος της LH χωρίς μεγάλες μεταβολές της υποθαλαμικής έκκρισης της GnRH.

Το φαινόμενο της αυξημένης δεύτερης απάντησης της LH στη GnRH σε σύγκριση με την πρώτη, ονομάζεται αυτοπριμοδότηση της GnRH (GnRH self-priming) και αντιπροσωπεύει τη μετατροπή της λειτουργικά εφεδρικής δεξαμενής των γοναδοτροφινών (second-reserve pool) στη λειτουργικά άμεσα εκκρινόμενη δεξαμενή (first-releasable pool)(Fink, 1995). Το φαινόμενο αυτό είναι εξαρτώμενο από τις ωθητικές ορμόνες. Έτσι, όταν αυξάνεται η στάθμη των οιστρογόνων στο αίμα, αυξάνει η διεγερσιμότητα του γοναδοτρόφου κυττάρου από την GnRH με αποτέλεσμα την αύξηση των υποδοχέων της (μεταβολές στον αριθμό των υποδοχέων (Savoy-Moore et al., 1980) ή στην έκφραση των γονιδίων που τους κωδικοποιούν (Brooks & McNeilly, 1994)) στην υπόφυση (προς τα άνω ρύθμιση των υποδεχέων, up regulation). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται πιο έντονα κατά την όψιμη ωοθυλακική και την ωχρινική φάση του κύκλου (Hoff et al., 1977; Sollenberger et al., 1990b). Φαίνεται επίσης ότι παρατηρείται όχι μόνο ποιοτική αλλά και ποσοτική μεταβολή της ευαισθησίας των γοναδοτρόφων από το γοναδικό ορμονικό περιβάλλον, 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 (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976).

Η ύπαρξη του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης της GnRH στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την

εκδήλωση του θετικού μηχανισμού επίδρασης των οιστρογόνων στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα.

B. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ

Θετικός και αρνητικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης

Κατά την αναπαραγωγική ηλικία η έκκριση των γοναδοτροφινών και η φυσιολογική λειτουργία του γεννητικού άξονα ρυθμίζονται από θετικούς και αρνητικούς μηχανισμούς αλληλορρύθμισης (feedback) των ωοθηκικών ορμονών, κυρίως της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης.

Η παρουσία των μηχανισμών αυτών τεκμηριώνεται από πολύ νωρίς, αφού ο αρνητικός μηχανισμός παρατηρείται ήδη από την ενδομήτρια ζωή, όπου ήδη από τη 10^η εβδομάδα της κύησης η GnRH ανευρίσκεται στον υποθάλαμο ανθρώπινων εμβρύων. Μεταξύ 10^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας κύησης οι δύο γοναδοτροφίνες αυξάνουν και στη συνέχεια ελαττώνονται σε χαμηλά επίπεδα, λόγω ανάπτυξης ευαισθησίας του υποθαλάμου στα κυκλοφορούντα πλακουντιακά οιστρογόνα. Απότομη ελάττωση των παραπάνω οιστρογόνων μετά τον τοκετό αίρει τον αρνητικό μηχανισμό και οδηγεί σε αύξηση των γοναδοτροφινών (Μεσσήνης, 2005). Πριν την εφηβεία ο υποθάλαμος είναι εξαιρετικά ευαίσθητος στην κατασταλτική επίδραση των χαμηλών επιπέδων των κυκλοφορούντων οιστρογόνων (Winter and Faiman, 1973; Plant and Shahab, 2002). Προοδευτικά, η ευαισθησία αυτή του υποθαλάμου ελαττώνεται και καταστέλλεται ο κεντρικός μηχανισμός (Foster and Ryan, 1979). Αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση του γοναδοστάτη, σε αύξηση της έκκρισης γοναδοτροφινών και με την εμφάνιση του θετικού μηχανισμού εξασφαλίζεται η κανονικότητα των εμμηνορρυσιακών κύκλων.

Η οιστραδιόλη, η οποία εκκρίνεται από το ωθυλάκιο κατά τη ωθυλακική φάση του κύκλου, αποτελεί την κύρια ορμόνη που με την κατάληψη των υποδοχέων προκαλεί τόσο τον αρνητικό όσο και τον θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Ειδικότερα, υποδοχείς οιστρογόνων, ER α και ER β είναι παρόντες τόσο στα γοναδοτρόφα κύτταρα (Couse and Korach, 1999), όσο και στον υποθάλαμο, όπου διαμεσολαβητικό ρόλο στην άσκηση αρνητικής ανατροφοδότησης διαδραματίζουν και οι νευρώνες GABA, οι οποίοι προσλαμβάνουν οιστρογόνα, εντός της προοπτικής περιοχής. Έτσι τα οιστρογόνα μεταβάλλουν την απάντηση της υπόφυσης στην GnRH και τον αριθμό των υποδοχέων GnRH, επηρεάζουν τη δράση των ιοντικών διαύλων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ρυθμίζουν τόσο την γονιδιακή έκφραση όσο και τα δευτερεύοντα αγγελιοφόρα συστήματα εντός των γοναδοτρόφων κυττάρων (Turzillo et al., 1998; Clarke, 1998; Bedecarrats and Kaiser, 2003). Επίσης φαίνεται πως επηρεάζουν τον μεταβολισμό της GnRH (Danforth et al., 1990). Η ανατροφοδότηση της οιστραδιόλης στον υποθάλαμο αφορά αλλαγές του εύρους των εκκριτικών ώσεων της GnRH (Hall and Gill, 2001). Έχει φανεί πως η συνεχής παρουσία οιστραδιόλης προκαλεί χρόνια καταστολή των γοναδοτροφινών (Karsch, 1987), η βραχυπρόθεσμη (<12 ώρες) αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της GnRH (Gregg et al., 1990) και της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης της LH (Huang & Miller, 1980) ενώ η μακροπρόθεσμη (24-48 ώρες) έχει μικρή επίδραση στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Speight & Fink, 1981b; Fowler et al., 1992; 1993).

Ενώ η οιστραδιόλη είναι το κύριο στοιχείο των μηχανισμών, με τους οποίους οι ωθήκες ελέγχουν τη βασική έκκριση των γοναδοτροφινών, σημαντική είναι

και η επίδραση της προγεστερόνης κυρίως κατά την ωχρινική φάση (Alexandris et al., 1997). Η προγεστερόνη ενισχύει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH επιδρώντας στην έκκριση γοναδοτροφινών σε επίπεδο υποθαλάμου με την επιβράδυνση της συχνότητας της παλμικής έκκρισης της GnRH (Filicori & Crowley, 1984; Soules et al., 1984) και τη μείωση του συνολικού ποσού της εκκρινόμενης GnRH (Gill et al., 2002) αλλά η συμμετοχή των οιστρογόνων φαίνεται να είναι ουσιαστική για την επίδραση αυτή (Nippoldt et al., 1989). Ο ρόλος της πιθανόν ασκείται μέσω της προς τα άνω ρύθμισης (up regulation) των υποδοχέων της στον υποθάλαμο (Scott et al., 2000). Η προγεστερόνη επίσης μεταβάλλει τη μορφή και το μέγεθος των από την GnRH προκαλούμενων σημάτων του ασβεστίου στα γοναδοτρόφα (Ortmann et al., 1994) και πιθανολογείται η άμεση επίδρασή της στην υπόφυση, καθώς χαμηλές δόσεις προγεστερόνης αυξάνουν το εύρος των εκκριτικών ώσεων της LH (Couzinet et al., 1992).

Πέραν της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, που αποτελούν τις βασικές ορμόνες, στην εκδήλωση του αρνητικού και θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου συμμετέχουν και άλλοι μη στεροειδείς ωθητικοί παράγοντες, όπως ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor (GnSAF)), η ινχιμπίνη, η ακτιβίνη και η φολλιστατίνη. Από τους παράγοντες αυτούς οι ινχιμπίνες (η ινχιμπίνη Β παράγεται από το ωοθυλάκιο, που προορίζεται να γίνει κυρίαρχο-παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά την ωοθυλακική φάση - και η ινχιμπίνη Α παράγεται από το ωχρο σωματίο-παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις κατά την ωχρινική φάση (Groome et al., 1996)) επηρεάζουν κυρίως τα

επίπεδα FSH ενώ η LH είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη στις ορμόνες αυτές (Farnworth et al., 1988; Attardi et al., 1991). Επίσης πειραματικά δεδομένα σε ζώα δείχνουν πως οι ινχιμπίνες συμμετέχουν στον έλεγχο της έκκρισης FSH in vivo (Rivier et al., 1991; Attardi et al., 1992; Tilbrook et al., 1993; Stouffer et al., 1994; Molskness et al., 1996).

Οι παραπάνω ορμόνες, στεροειδείς και μη, συμμετέχουν στην εκδήλωση του θετικού και αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, με την εξής σειρά ενδοκρινικών γεγονότων κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου:

Ωοθυλακική φάση

Αρνητικός μηχανισμός

Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων να μειώνουν τα επίπεδα FSH και LH κατά την ωοθυλακική φάση (Tsai and Yen, 1971; Monroe et al., 1972a; Young and Jaffe, 1976). Οι Messinis & Templeton (1990) έδειξαν ότι η εξωγενής χορήγηση βενζοϊκής οιστραδιόλης σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, η οποία προκάλεσε την αύξηση της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία σε προωοθυλακιορρηκτικές συγκεντρώσεις, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των επιπέδων των FSH και LH. Αποδείχθηκε έτσι η ικανότητα των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων να καταστέλλουν τις ενδογενείς γοναδοτροφίνες. 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 κεκαθαυμένης FSH σε φυσιολογικές γυναίκες, σε δόσεις 225 IU ημερησίως, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της FSH και της οιστραδιόλης στον ορό. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της οιστραδιόλης 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 οιστραδιόλης και της LH σε αυτή τη μελέτη ήταν ακόμη πιο ξεκάθαρη σε μία άλλη μελέτη, στην οποία οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία αυξήθηκαν για μία μόνο συγκεκριμένη χρονική περίοδο (Messinis et al., 1994). Ειδικότερα, 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 οιστραδιόλης 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 διήρκεσε όσο η αύξηση της οιστραδιόλης. Αντίθετα η χορήγηση κιτρικής κλομιφένης προκάλεσε μεγάλη αύξηση των επιπέδων οιστραδιόλης αλλά τα επίπεδα LH αυξήθηκαν σημαντικά (καθώς η οιστραδιόλη δεν μπορούσε να δράσει λόγω της κατάληψης των υποδοχέων οιστρογόνων) (Messinis and Templeton, 1989). Οι Messinis και συν. έδειξαν επομένως, ότι η αύξηση της ενδογενούς οιστραδιόλης 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 οιστραδιόλης 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).

Ωστόσο οι δύο γοναδοτροφίνες, αντίθετα απ'ότι πιστευόταν αρχικά, δεν είναι το ίδιο ευαίσθητες στην κατασταλτική δράση των οιστρογόνων (Messinis and Templeton, 1990). Συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί πως η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη επηρεάζουν κατά ένα μέρος μόνο την έκκριση της FSH ενώ είναι σημαντικός ο ρόλος άλλων γνωστών ωθηκικών παραγόντων. Ότι η οιστραδιόλη ασκεί διαφορετική δράση στις δύο γοναδοτροφίνες αποδεικνύεται από σειρά πειραμάτων όπου με την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων και προγεστερόνης σε μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες, δημιουργήθηκαν δύο ωοθυλακικές και μια ωχρινική φάση ανάμεσά τους. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μεγαλύτερη καταστολή των τιμών LH στο τέλος της εξομοιούμενης ωχρινικής φάσης σε σχέση με την FSH ενώ κατά την δεύτερη ωοθυλακική φάση τα υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης δεν κατάφεραν να διατηρήσουν χαμηλά επίπεδα LH απουσία των ωθηκών, δείχνοντας πως η οιστραδιόλη δεν είναι ο μοναδικός μεσολαβητής του ωθηκικού αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης στην έκκριση της LH και ότι είναι πολύ πιθανό να συμμετέχει η ενδογενής προγεστερόνη (Dafopoulos et al., 2004a). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη σημαντική αύξηση των επιπέδων LH, που παρατηρείται κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση εάν στη φάση

αυτή χορηγηθεί το αντιπρογεσταγόνο μifeπριστόνη (Kazem et al., 1996). Επίσης η εξωγενής χορήγηση προγεστερόνης σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών οδηγεί σε σημαντική μείωση των επιπέδων LH (Buckler et al., 1992). Η προγεστερόνη κατά την ωοθυλακική φάση παράγεται τις ωοθήκες, καθώς η ωοθηκεκτομή κατά τη μέση ωοθυλακική φάση προκαλεί μεγάλη πτώση των επιπέδων προγεστερόνης σε μη μετρήσιμα επίπεδα (Alexandris et al., 1997).

Ωστόσο, αν και η οιστραδιόλη παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροφινών κατά την ωοθυλακική φάση, κάτι τέτοιο δεν ισχύει προς το τέλος της αναπαραγωγικής ζωής, όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα FSH ενώ τα επίπεδα της οιστραδιόλης παραμένουν στα φυσιολογικά πλαίσια (Lee et al., 1988). Σε μια μελέτη γυναικών 40-50 ετών τα επίπεδα οιστραδιόλης στις ημέρες 3-5 του κύκλου συσχετίστηκαν αρνητικά με την FSH (Burger et al., 2000).

Η ινχιμπίνη Β συμμετέχει στον αρνητικό μηχανισμό κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου (Koning et al., 2008) και συγκεκριμένα στον έλεγχο της έκκρισης FSH ενώ ο φυσιολογικός ρόλος των περιορισμένων επιδράσεων της πάνω στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH in vivo παραμένει ασαφής. Αυτό φαίνεται σε σύγκριση περιεμμηνοπαυσιακών γυναικών με φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους και αυξημένα επίπεδα FSH με νεώτερες με φυσιολογικά επίπεδα FSH, όπου βρέθηκαν ότι χαμηλότερα επίπεδα ινχιμπίνης Β στις μεγαλύτερες αλλά όμοια ινχιμπίνης Α (Klein et al., 1996; Burger et al., 1998; Klein et al., 2004). Μειωμένες συγκεντρώσεις ινχιμπίνης Α και Β παρατηρήθηκαν επίσης σε γυναίκες με επικείμενη πρώιμη ωοθηκική ανεπάρκεια αλλά με ωοθυλακιορρηκτικούς κύκλους (Welt et al,

2005a). Επίσης σε μελέτη η χορήγηση κιτρικής κλομιφένης για 15 ημέρες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης είχε ως αποτέλεσμα τη βαθμιαία αύξηση της LH κατά τη διάρκεια της θεραπείας ενώ τα επίπεδα της FSH μετά από μια αρχική αύξηση μειώθηκαν σε επίπεδα προ αγωγής (Messinis and Templeton, 1988b). Ότι η ινχιμπίνη Β πιθανόν να εμπλέκεται στη φυσιολογία του εμμηνορρυσιακού κύκλου υποστηρίχθηκε και από πρόσφατα δημοσιευμένα ερευνητικά δεδομένα (Donovan et al., 2010; van Liempt et al., 2012; Messinis et al., 2014).

Αναφορικά με τις ακτιβίνες, η ακτιβίνη Α φαίνεται να παρουσιάζει διακυμάνσεις στον κύκλο, με τα υψηλότερα επίπεδά της στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, τη μέση του κύκλου και την όψιμη ωχρινική φάση (Muttukrishna et al., 2002) και είναι πιθανό ότι σχετίζεται με την αύξηση της FSH στις συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου.

Σχετικά με τη φολλιστατίνη, μελέτες σε ζώα, όπου χορηγήθηκε ανθρώπινη ανασυνδυασμένη φολλιστατίνη - 288 έδειξαν μείωση των επιπέδων της FSH αλλά όχι της LH (Tilbrook et al., 1995) και μάλιστα χωρίς να επηρεάζεται η συχνότητα ή το εύρος των εκκριτικών ώσεων της GnRH (Padmanabhan et al., 2002). Πιθανολογείται η συσχέτιση της δράσης αυτής με τη βιοδιαθεσιμότητα της ακτιβίνης (Padmanabhan et al., 2002).

Ο ρόλος της αντιμυλλεριανής ορμόνης (Antimullerian Hormone (AMH)), η οποία είναι επίσης μη στεροειδής, είναι λιγότερο ευκρινής. Οι συγκεντρώσεις της στο αίμα παραμένουν σταθερές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (La Marca et al., 2006). Εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα ωοθυλακίων 4-6mm (Weenen et al., 2004) και τα επίπεδά της την τρίτη

ημέρα του κύκλου σε γυναίκες με φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους μειώνονται καθώς αυξάνεται η ηλικία, παρουσιάζοντας αρνητική συσχέτιση με την FSH (La Marca et al., 2005). Παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχθεί η συμμετοχή της στον αρνητικό μηχανισμό κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης (de Vet et al. 2002; van Rooij et al., 2002; Makanji et al., 2010).

Συνοψίζοντας, φαίνεται πως η ωοθυλακική φάση του κύκλου χαρακτηρίζεται από την εκδήλωση του αρνητικού μηχανισμού feedback, με την οιστραδιόλη και την ινχιμπίνη Β να είναι οι δύο σημαντικότεροι διαμεσολαβητές του αρνητικού μηχανισμού κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση και με την προγεστερόνη να προστίθεται στην οιστρογονική επίδραση κατά την λοιπή ωοθυλακική φάση (Messinis , 2006b; Messinis et al., 2014) .

Μέση κύκλου

Θετικός μηχανισμός

Πέραν της καταστολής της έκκρισης των γοναδοτροφινών, τα οιστρογόνα ασκούν διεγερτική δράση αποτελώντας το πιο σημαντικό στοιχείο του θετικού μηχανισμού feedback των ωοθηκών στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα, κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση (Ferin et al.,1974). Η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH και αυξάνει την δράση αυτοπριμοδότησης της GnRH στα υποφυσιακά γοναδοτρόφα κύτταρα (Lasley et al., 1975). Έτσι ο θετικός μηχανισμός μπορεί να επιτευχθεί μέσω υποφυσιακών μηχανισμών και μόνο, χωρίς αύξηση της συμμετοχής του υποθαλάμου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ οιστραδιόλης και GnRH είναι σημαντική για την εκδήλωση του μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών (Hoff et al., 1977). Κατά την έναρξη τόσο του αυτόματου όσο και του

επαγόμενου κύματος της LH, πλήρης αποκλεισμός των υποδοχέων GnRH οδηγεί σε τερματισμό του κύματος (Hall et al., 1994) κάτι που καταδεικνύει ότι η συνεχής έκκριση GnRH είναι απαραίτητη για την παραγωγή του κύματος των γοναδοτροφινών. Ωστόσο, ούτε η συχνότητα ούτε η συνολική ποσότητα της GnRH είναι αυξημένες σε σχέση με την έναρξη του κύματος (Hall et al., 1994; Adams et al., 1994).

Σε πειραματικές διαδικασίες, που περιλάμβαναν την *in vivo* χορήγηση GnRH κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού αναπαραγωγικού κύκλου σε γυναίκες, φάνηκε πως η ευαισθησία της υπόφυσης και οι εφεδρείες καθώς και το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH αυξήθηκαν στην όψιμη ωοθυλακική φάση σε σχέση με την πρώιμη (Wang et al., 1976; Hoff et al., 1977). Επίσης αυξημένη είναι η διάρκεια των εκκριτικών γεγονότων της LH και συνεπώς και η συνολική ποσότητα LH (Sollenberger et al., 1990 ; Quyyumi et al., 1993) ενώ φαίνεται πως η αύξηση της έκκρισης της LH ως απάντηση σε επαναλαμβανόμενες δόσεις GnRH σε οιστρογονικό περιβάλλον συσχετίζεται με το βαθμό έκκρισης των μορίων LH από την υπόφυση. Επίσης, είναι χαρακτηριστικό ότι η ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH δεν μεταβάλλεται κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση παρά την ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων οιστραδιόλης αλλά αυξάνεται σημαντικά κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, όπως αποδεικνύουν πειραματικά δεδομένα των Μεσσίνη και συν. (Messinis et al., 1994; Messinis et al., 1998), όπου η ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, αξιολογήθηκε μετά τη χορήγηση μιας δόσης 10μg GnRH. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν πως η ευαισθητοποίησης δράση της οιστραδιόλης στην υπόφυση παρεμποδίζεται στην πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση και διευκολύνεται κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση του

κύκλου, πιθανότατα επειδή οι ωθήκες κατά τη διάρκεια της πρώιμης και μέσης ωθυλακικής φάσης παράγουν μια ουσία η οποία μπορεί να ανταγωνιστεί την ευαισθητοποιό δράση της οιστραδιόλης στα υποφυσιακά γοναδοτρόφα κύτταρα. Η ωθητική αυτή ουσία είναι ο GnSAF, ο οποίος μειώνει της αποκρισιμότητα της υπόφυσης στη GnRH και αμβλύνει το ενδογενές κύμα της LH (Messinis et al., 1985; Messinis and Templeton, 1989) και αναλύεται εκτενώς στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, και που την ύπαρξη του GnSAF, ο οποίος σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες απουσιάζει λόγω της απουσίας λειτουργικών ωθηκών, επιβεβαιώνουν πειραματικά δεδομένα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις οποίες έγινε προσομοίωση δύο ωθυλακικών και μιας ωχρινικής φάσης με την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης και προγεστερόνης (Daforoulos et al., 2004a) και παρατηρήθηκε ότι μετά το τέλος της ωχρινικής φάσης η απάντηση της LH στη GnRH ήταν όμοια με αυτή της πρώιμης ωθυλακικής φάσης του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου ενώ στην όψιμη ωθυλακική φάση σημειώθηκε μια συνεχής αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH, η οποία διέφερε από την αντίστοιχη του φυσιολογικού κύκλου.

Αρχικά, οι παραπάνω δράσεις του GnSAF αποδόθηκαν στην προγεστερόνη. Εντούτοις φαίνεται πως η προγεστερόνη κατά την ωθυλακική φάση του φυσιολογικού κύκλου, αν και βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH διευκολύνοντας τη θετική επίδραση της οιστραδιόλης (Messinis, 2006b) και η εξουδετέρωση της δράσης της μειώνει την ευαισθησία της υπόφυσης. Αυτό αποδείχτηκε όταν χορηγήθηκε αντιπρογεσταγόνο (μιφεπριστόνη) σε γυναίκες με φυσιολογικούς

εμμηνορρυσιακούς κύκλους, στις οποίες άμβλυνε την ευαισθησία και τις εφεδρείες της υπόφυσης (Kazem et al., 1996).

Κύμα LH

Σε απάντηση προς την εκθετική αύξηση της έκκρισης οιστραδιόλης κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, αυξάνουν κατά δέκα φορές τα επίπεδα της LH για μια περίοδο 2 - 3 ημερών, ενώ τα επίπεδα της FSH τετραπλασιάζονται. Αυτή η μεσοκυκλική αύξηση της LH είναι απολύτως απαραίτητη για την τελική ωρίμανση του ωοκυττάρου και την έναρξη της ωοθυλακιορρηξίας, η οποία συμβαίνει 36 ώρες μετά. Η εκδήλωση του κύματος LH προϋποθέτει επίπεδα οιστραδιόλης πάνω από 200 pg/ml για τουλάχιστον 48h (Karsch et al., 1973; Keye and Jaffe, 1975; Young and Jaffe, 1976; March et al., 1979; Liu and Yen, 1983; Simon et al., 1987; Karande et al., 1990) ενώ φαίνεται ότι εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης ακόμη και σε επίπεδα πάνω από τα φυσιολογικά μπορεί να προκαλέσει κύμα της LH (Messinis et al., 1992).

Η μετατόπιση στη στεροειδογένεση στη μέση του κύκλου αφορά την ικανότητα του προωοθυλακιορρηκτικού ωοθυλακίου να παράγει περισσότερη προγεστερόνη παρά οιστραδιόλη (McNatty et al., 1979a,b). Φαίνεται πως τα επίπεδα της προγεστερόνης αυξάνουν πριν την έναρξη του κύματος της LH (Hoff et al., 1983), ωστόσο δεν ξεκάθαρος ο βαθμός συμμετοχής της στην εκδήλωση του θετικού μηχανισμού στη μέση του κύκλου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η προγεστερόνη μπορεί να εκδηλώσει θετικό μηχανισμό feedback αλλά μόνο μετά από προηγούμενη χορήγηση οιστρογόνων, ακόμη και όταν δεν έχει επιτευχθεί το απαιτούμενο όριο στις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης (Chang and Jaffe, 1978; March et al., 1979) και η χορήγησή της λειτουργεί ευοδωτικά στην έναρξη ενός προκαλούμενου από την οιστραδιόλη

μεσοκυκλικού κύματος LH (Chang and Jaffe, 1978; Liu and Yen, 1983; Messinis and Templeton, 1990). Επίσης ερευνητικά δεδομένα σε επίμυες δείχνουν πως η νευροπρογεστερόνη, η οποία συντίθεται στον υποθάλαμο κάτω από την επίδραση της οιστραδιόλης, είναι απαραίτητος μεσολαβητής για την εκδήλωση του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (Micevych et al., 2003) και πως απαιτείται η ενεργοποίηση των υποδοχέων προγεστερόνης για την εκδήλωση του φαινομένου της GnRH αυτοπριμοδότησης και την παραγωγή από την οιστραδιόλη του κύματος των γοναδοτροφινών (Chappel I et al., 1999). Επιπλέον, πάλι από μελέτες σε επίμυες, φάνηκε ότι τα οιστρογόνα προκαλούν *de novo* σύνθεση προγεστερόνης από χοληστερόλη στον υποθάλαμο, η οποία συμμετέχει στον θετικό μηχανισμό feedback ρυθμίζοντας την έναρξη του κύματος της LH (Soma et al., 2005).

Το σημείο δράσης των οιστρογόνων για την εκδήλωση του κύματος LH είναι τόσο η υπόφυση όσο και ο υποθάλαμος. Πιθανόν το πρωταρχικό σημείο για τον θετικό μηχανισμό είναι η υπόφυση και η GnRH να παίζει ευοδωτικό ρόλο (Knobil, 1988). Αποδείχθηκε πειραματικά από μια μελέτη σε επίμυες πως μια άμεση δράση των οιστρογόνων στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης είναι απαραίτητη και την άσκηση θετικής επίδρασης στην έκκριση LH (Yin et al., 2002). Η προγεστερόνη φαίνεται επίσης πως ασκεί θετικό feedback μέσω του υποθαλάμου (Terasawa et al., 1982). Η εκδήλωση του θετικού μηχανισμού feedback των οιστρογόνων γίνεται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (ER), χωρίς να είναι ξεκάθαρο εάν αυτό αφορά τους ER α , τους ER β ή και τους δύο (Mitchner et al., 1998). Ωστόσο ερευνητικά δεδομένα σε επίμυες δείχνουν πως τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τόσο τους υποδοχείς τους όσο και την

απαντητικότητα της υπόφυσης σ'αυτά (Schreihof et al., 2000). Η επίδραση της οιστραδιόλης επίσης διαμεσολαβείται από μεταβολές στη δράση των νευροδιαβιβαστών στον υποθάλαμο , όπως είναι η β- ενδορφίνη, της οποίας οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα αυξάνονται δύο ημέρες πριν το κύμα της LH.

Για να διαπιστωθεί κατά πόσον συνδέεται με αύξηση του εύρους των εκκριτικών ώσεων της GnRH η παραγωγή του κύματος των γοναδοτροφινών, χρησιμοποιήθηκε υπομέγιστος αποκλεισμός GnRH υποδοχέων με στόχο μια ημι-ποσοτική εκτίμηση του συνολικού ποσού της ενδογενώς εκκρινόμενης GnRH (Hall et al.,1994), όπου όχι μόνο δεν διαπιστώθηκε αύξηση του συνολικού ποσού της εκκρινόμενης GnRH αλλά επιπλέον φάνηκε ότι η συνολική ποσότητα της GnRH κατά τη διάρκεια του κύματος είναι μικρότερη από ό,τι στην πρόιμη και την μέση ωοθυλακική φάση (Martin et al., 1998).

Επιπλέον, μελέτες νευροαπεικόνισης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες το κύμα των γοναδοτροφινών προκλήθηκε με χορήγηση μιας διαβαθμισμένης δόσης οιστραδιόλης, δείχνουν μια σημαντική αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητα στην υπόφυση, αλλά όχι στον υποθάλαμο, σε συνδυασμό με το θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων (Ottowitz et al., 2008).

Όπως συνάγεται από τα ερευνητικά δεδομένα , η εκδήλωση του κύματος της LH στη μέση του κύκλου απαιτεί τη συμμετοχή και την εξισορροπημένη δράση τριών ορμονικών παραγόντων, δηλαδή, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης, οι οποίες ευαισθητοποιούν την υπόφυση στην GnRH, και του GnSAF, ο οποίος ανταγωνίζεται τη δράση των παραπάνω ορμονών (Messinis et al., 2014). Επιπλέον είναι πιθανό ο GnSAF να συμμετέχει στο χρόνο της έναρξης του μεσοκυκλικού κύματος της LH, ως ένα από τα σήματα που

στέλνει καθώς γίνεται ωοθυλακιορρηκτικό το κυρίαρχο ωοθυλάκιο στον εγκέφαλο (Messinis et al., 2014).

Τερματισμός του κύματος LH

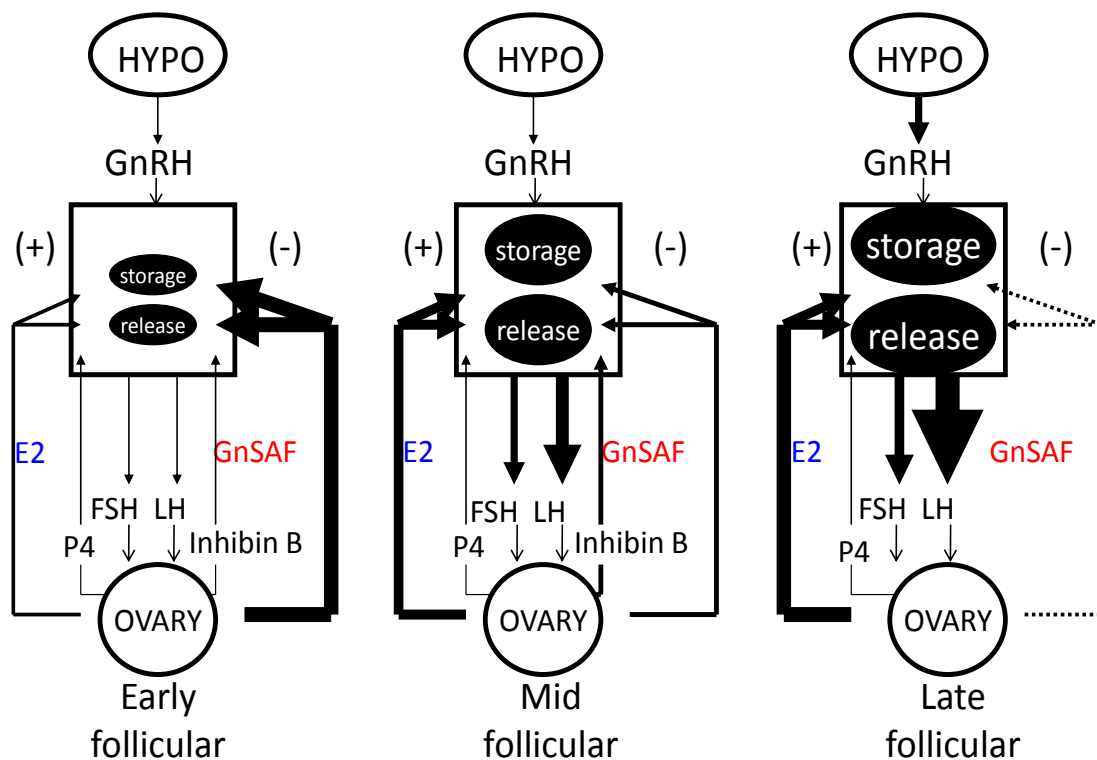
Η φυσιολογική διάρκεια του κύματος LH είναι 48-72h (Hoff et al., 1983; Messinis and Templeton, 1988a; Shoham et al., 1995). Δεν είναι ξεκάθαρο ποιοι παράγοντες ενέχονται στον τερματισμό του ενδογενούς κύματος της LH. Μετά την έναρξη του κύματος LH τα επίπεδα των οιστρογόνων πέφτουν αλλά αυτό δεν αποτελεί αιτία για τον τερματισμό του κύματος καθώς το κύμα τερματίζεται και σε περιπτώσεις όπου διατηρούνται υψηλά επίπεδα οιστρογόνων κατά τη διάρκειά του (Liu and Yen, 1983) και από μελέτες φάνηκε πως ενώ η οιστραδιόλη απαιτείται για την έναρξη του κύματος της LH, δεν είναι απαραίτητη μετά από αυτή (Evans et al., 1997). Διαπιστώθηκε από μελέτες σε επίμυες πως τα οιστρογόνα μπορούν να μειώσουν τις ERα και ERβ πρωτεΐνες και να προκαλέσουν καταστολή της δραστηριότητας και των δύο τύπων υποδοχέων in vivo και in vitro (Schreihof et al., 2000, 2002) και ίσως αυτό αποτελεί έναν μηχανισμό, μέσω του οποίου τα οιστρογόνα μπορούν να περιορίσουν το θετικό μηχανισμό feedback. Ωστόσο τα παραπάνω δεν αποδείχθηκαν σε άλλες μελέτες (Legan and Tsai, 2003).

Τα επίπεδα της προγεστερόνης, που αυξάνουν βαθμιαία από την αρχή έως το τέλος του κύματος LH και κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (Hoff et al., 1983) ίσως να συμβάλουν στο τερματισμό του κύματος μέσω ενός αρνητικού μηχανισμού feedback. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν πως μετά την πρόκληση ενός κύματος LH με την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης τα επίπεδα της LH έπεσαν στις τιμές που είχαν προ κύματος μόνο μετά τη

χορήγηση προγεστερόνης (Messinis and Templeton, 1990). Σε μια μελέτη των Νταφόπουλος και συν (Daforoulos et al., 2006), όπου μελετήθηκε ο θετικός μηχανισμός σε δύο κύκλους γυναικών με φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους, στις οποίες χορηγήθηκε εξωγενώς οιστραδιόλη τις ημέρες 3-5 του κύκλου και οι οποίες υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή την ημέρα 3 του δεύτερου κύκλου, παρατηρήθηκε μείωση των γοναδοτροφινών μόνο στον πρώτο κύκλο, όταν οι ωθήκες ήταν ανέπαφες και όχι στον δεύτερο μετά την ωθηκεκτομή. Φαίνεται λοιπόν ότι ωθηκικοί παράγοντες ελέγχουν τον τερματισμό του κύματος της LH και μάλιστα, καθώς οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης μειώθηκαν μετά την ωθηκεκτομή σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που παρατηρήθηκαν στις αντίστοιχες ημέρες του πρώτου κύκλου, φαίνεται πως ίσως η προγεστερόνη παίζει σημαντικό ρόλο στον τερματισμό του κύματος της LH. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται και από πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή (Zavos et al., 2013). Ίσως μέρος του μηχανισμού δράσης της προγεστερόνης στον τερματισμό του μεσοκυκλικού κύματος των γοναδοτροφινών να αποτελεί μια δραματική μείωση του εύρους των εκκριτικών ώσεων της GnRH, που συνοδεύεται από μείωση στη συχνότητα των ώσεων σε περίπου κάθε 70 min (Adams et al., 1994) και παρατηρείται στο τέλος και όχι στην αρχή ή στο μέσο του κύματος της LH.

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από τα ερευνητικά δεδομένα, κατά τον φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο και μετά την έναρξη του κύματος της LH, ο θετικός μηχανισμός της οιστραδιόλης αρχίζει να αμβλύνεται υπό την επίδραση της αύξησης προγεστερόνης και τη μειωμένη βιοδραστικότητα του GnSAF. Αυτό σημαίνει πως η άμβλυνση του κύματος της LH προκύπτει ως

αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της θετικής δράσης της προγεστερόνης και της αρνητικής επίδρασης του GnSAF (Messinis et al., 2014).



Σχήμα 1. Ο αρνητικός και ο θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο. Ο GnSAF παράγεται κυρίως στην πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση και ανταγωνίζεται την ευαισθητοποιούσα δράση της οιστραδιόλης (E2) στην υπόφυση. Η προγεστερόνη (P4) αυξάνει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης ενώ η ινχιμπίνη B φαίνεται να μειώνει την από την GnRH επαγόμενη έκκριση της FSH κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση (Messinis 2006; Hum. Reprod. Update 12, 557-571).

Ωχρινική φάση

Αρνητικός μηχανισμός

Κατά την ωχρινική φάση ο ωθηκικός έλεγχος της έκκρισης των γοναδοτροφινών διέπεται από τον αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Φαίνεται πως η συνδυασμένη δράση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης αποτελεί τον διαμεσολαβητή του αρνητικού μηχανισμού στη φάση αυτή και είναι απαραίτητη η παρουσία και των δύο ωθηκικών στεροειδών. Σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή κατά τη μέση ωχρινική φάση παρατηρήθηκε βαθμιαία αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροφινών και σημαντική μείωση των επιπέδων οιστραδιόλης και προγεστερόνης μέσα σε 24h (Alexandris et al., 1997). Επίσης η διατήρηση των επιπέδων οιστραδιόλης της μέσης ωχρινικής φάσης με την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, αμέσως μετά την ωθηκεκτομή, ανέβαλε την αναμενόμενη αύξηση των επιπέδων FSH και LH για περίπου 3 ημέρες (Messinis et al., 2002) ενώ η διατήρηση επιπλέον των συγκεντρώσεων και της προγεστερόνης της μέσης ωχρινικής φάσης με την εξωγενή χορήγησή της απέτρεψε την αύξηση των επιπέδων FSH και LH (Messinis et al., 2002), οδηγώντας έτσι στη διαπίστωση πως, κάτω από πειραματικές συνθήκες, ο αρνητικός μηχανισμός feedback της προγεστερόνης εκδηλώνεται παρουσία οιστρογόνων.

Στη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου η συχνότητα εκκριτικών ώσεων της GnRH μειώνεται ενώ αυξάνεται το εύρος τους (Filicori et al., 1986). Αυτό πιθανώς οφείλεται στα υψηλά επίπεδα προγεστερόνης, ωστόσο για να διατηρηθεί η παραπάνω εκκριτική δραστηριότητα απαιτείται η παρουσία τόσο της οιστραδιόλης όσο και της προγεστερόνης (Nippoldt et al.,

1989). Μία αύξηση της δράσης της β - ενδορφίνης στον υποθάλαμο φαίνεται πως λειτουργεί διαμεσολαβητικά στην κατασταλτική δράση αυτών των δύο στεροειδών στην έκκριση των γοναδοτροφινών (Wehrenberg et al., 1982).

Πειραματικά δεδομένα έδειξαν πως στον αρνητικό μηχανισμό κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης συμμετέχει και η ινχιμπίνη A, η οποία παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της FSH χωρίς να επηρεάζει την έκκριση της LH (Messinis et al., 2014). Ειδικότερα, παρατηρείται αρνητική συσχέτιση μεταξύ της FSH και της ινχιμπίνης A κατά την ωχρινική φάση (Messinis, 2006b). Σε μια μελέτη η εκτέλεση ωθηκεκτομής κατά την ωχρινική φάση οδήγησε σε σημαντική βαθμιαία πτώση των επιπέδων της ινχιμπίνης A 12h ώρες από την επέμβαση, η οποία ακολουθήθηκε από σταδιακή αλλά σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της FSH (Muttukrishna et al., 2002).

Ο ρόλος της ακτιβίνης και της φολλιστατίνης είναι επίσης και στη φάση αυτή μη ευκρινής.

Κατά την ωχρινική φάση λοιπόν ο αρνητικός μηχανισμός διαμεσολαβείται από τη συνδυασμένη και εξισορροπητική δράση τριών ωθηκικών ορμονών, της οιστραδιόλης, της προγεστερόνης και της ινχιμπίνης A .

Μετάβαση από την ωχρινική στην ωθυλακική φάση

Κατά τη μετάβαση από την ωχρινική στην ωθυλακική φάση λαμβάνει χώρα μια αύξηση (διακυκλική) των συγκεντρώσεων της FSH . Τα επίπεδά της αρχίζουν να αυξάνονται 2-3 , ίσως και 4, σύμφωνα με πιο πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, ημέρες πριν την έναρξη της εμμηνορρυσίας (Miro and

Aspinall, 2005). Τα επίπεδα της παραμένουν αυξημένα κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση και επιστρέφουν στις βασικές τους τιμές κατά την μέση ωοθυλακική φάση (Mais et al., 1987; Messinis et al., 1993c). Κατά τη διάρκεια της αύξησης της FSH , που ονομάζεται “παραθύρο” της FSH , γίνεται η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου.

Η διακυκλική αύξηση της FSH στην όψιμη ωχρινική φάση φαίνεται πως οφείλεται στη μειωμένη δραστηριότητα του αρνητικού μηχανισμού feedback, που κατέστειλε την έκκριση της FSH κατά την πρώιμη και μέση ωχρινική φάση. Πριν την έναρξη της διακυκλικής αύξησης της FSH παρατηρείται μια βαθμιαία αλλά σημαντική μείωση των επιπέδων της ινχιμπίνης A, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης (Roseff et al., 1989; Groome et al., 1996). Η οιστραδιόλη φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο από τις ινχιμπίνες στον έλεγχο του "παραθύρου" της FSH, καθώς η διατήρηση των επιπέδων μέσης ωχρινικής φάσης οιστραδιόλης κατά τη μεταβατική περίοδο μεταξύ των κύκλων αναβάλλει την διακυκλική αύξηση της FSH (Le Nestour et al., 1993), ενώ μετά την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου κατά τον φυσιολογικό κύκλο τα επίπεδα της FSH μειώνονται καθώς αυξάνουν εκείνα της οιστραδιόλης (van Santbrink et al., 1995). Επιπλέον ερευνητικά δεδομένα από γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε το αντιοιστρογόνο ταμοξιφένη καταδεικνύουν το σημαντικότερο ρόλο της οιστραδιόλης σε σχέση με την ινχιμπίνη στον αρνητικό έλεγχο της FSH κατά τη μετάβαση από την ωχρινική στην ωοθυλακική φάση του επόμενου κύκλου (Welt et al., 2003).

Ενδοκρινικό ρόλο κατά τη φάση αυτή του κύκλου φαίνεται να διαδραματίζουν και οι ινχιμπίνες. Η μείωση της ινχιμπίνης A στον ορό από τη μέση στην όψιμη ωχρινική φάση προηγείται της έναρξης του “παραθύρου της FSH”

(Groome et al., 1994) διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην έναρξη αυτή. Τη στιγμή της μεγαλύτερης αύξησης των επιπέδων της FSH, τα επίπεδα της ινχιμπίνης Β αυξάνουν βαθμιαία και σημαντικά, αρχίζοντας μία ή δύο ημέρες μετά από την έναρξη του "παραθύρου", χωρίς σημαντικές μεταβολές κατά το διάστημα αυτό στα επίπεδα της οιστραδιόλης (Groome et al., 1996) και καταστέλλοντας κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση (Welt et al., 1997) την έκκριση της FSH, περιορίζοντας έτσι το "παραθύρο" της.

Ο ρόλος της προγεστερόνης κατά τη φάση αυτή φαίνεται να ασκείται μέσω της δράσης στην έκκριση της GnRH - μειώνει τη συχνότητα και αυξάνει το εύρος των εκκριτικών ώσεων της LH κατά την ωχρινική φάση (Soules et al., 1984; Nippoldt et al., 1989). Έτσι η πτώση των επιπέδων της προγεστερόνης κατά την όψιμη ωχρινική φάση προκαλεί αύξηση της συχνότητας των εκκριτικών ώσεων της GnRH και διέγερση κατά κύριο λόγο της έκκρισης της FSH (Marshall and Kelch, 1986; Hall et al., 1992; McCartney et al., 2002). Ενώ όμως η αύξηση των ώσεων της GnRH συμβάλλει στη διακυκλική αύξηση της FSH φαίνεται πως δεν αποτελεί τον μοναδικό υπεύθυνο μηχανισμό για την αύξηση αυτή (Welt et al., 1997), καθώς η αύξηση της LH είναι λιγότερο ευδιάκριτη κατά την περίοδο αυτή.

Η ακτιβίνη Α πιθανόν συμμετέχει στην ανάπτυξη του "παραθύρου της" FSH και επομένως στην επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Messinis, 2000), καθώς τα επίπεδά της αρχίζουν να αυξάνονται κατά τη μέση ωχρινική φάση, προηγούμενα της διακυκλικής αύξησης της FSH (Muttukrishna et al., 1996). Για την ακτιβίνη Β τα δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα.

Καθώς η FSH αποτελεί τον κύριο διεγέρτη για την παραγωγή GnSAF , πιθανολογείται ότι η παραγωγή του GnSAF διεγείρεται κατά τη διάρκεια της διακυκλικής αύξησης της FSH (Messinis et al., 2014).

Ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor (GnSAF))

Ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor (GnSAF)) αποτελεί ωθητική ορμόνη, με μοριακό βάρος 12.5 kDa, η οποία παράγεται υπό την επίδραση της FSH και η δραστηριότητα της οποίας είναι αυξημένη κατά την πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση (Messinis & Templeton, 1989). Ο GnSAF, φαίνεται πως εμπλέκεται στον αρνητικό μηχανισμό feedback της ρύθμισης της λειτουργίας της υπόφυσης, μειώνοντας την απάντηση της υπόφυσης στη GnRH και επηρεάζοντας το εύρος του μεσοκύκλιου κύματος της LH (Ferraretti et al., 1983; Littman & Hodgen, 1984; Sopolak & Hodgen, 1984; Messinis & Templeton ,1986, 1990b).

Απομόνωση - Χαρακτηρισμός GnSAF

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό του GnSAF με τη χρήση διαφορετικών βιολογικών μεθόδων. Μέχρι σήμερα, ουσίες με GnSAF βιοδραστηριότητα έχουν απομονωθεί σε ωοθυλακικό υγρό και κοκκώδη κύτταρα διαφόρων πειραματοζώων και γυναικών (Tio et al.,

1994; Danforth & Cheng, 1995; Pappa et al., 1999; Fowler et al., 2002; Tavoulari et al., 2004; Karligiotou et al., 2006). Αν και ομοφωνία ως προς τα αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν υπάρχει, εντούτοις περισσότερο πειστική φαίνεται η διαπίστωση ότι ο GnSAF έχει την ίδια αλληλουχία αμινοξέων με το καρβοξυτελικό τμήμα της ανθρώπινης λευκωματίνης (Pappa et al., 1999). Πειραματικές δοκιμασίες, που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα έχουν δείξει την έκφραση του mRNA του καρβοξυτελικού άκρου της ανθρώπινης λευκωματίνης τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων αυτών (Karligiotou et al., 2006) ενώ έχει παρατηρηθεί μια αύξηση της έκφρασης αυτής υπό την επίδραση της FSH (Karligiotou et al., 2011). Ανασυνδυασμένα παράγωγα του άκρου αυτού έχουν δείξει δραστικότητα GnSAF in vitro σε καλλιέργεια υποφυσιακών κυττάρων ποντικών (Tavoulari et al., 2004). Παρά τις προσπάθειες, καμία από τις αλληλουχίες που έχουν προταθεί δεν έχει αποδειχθεί ότι συνιστά την αλληλουχία αμινοξέων για τον GnSAF και δεν είναι ακόμη διαθέσιμη μία ανοσολογική μέθοδος μέτρησής του. Αναμένεται ο καθορισμός της πλήρους αλληλουχίας των αμινοξέων του και του γονιδίου, που ελέγχει την παραγωγή του.

Παραγωγή του GnSAF

Το πρώτο σαφές στοιχείο ότι ο GnSAF παράγεται από την ωοθήκη προήλθε από μελέτες σε πιθήκους, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ωοθηκική διέγερση και ο ορός που συλλέχθηκε από την ωοθηκική φλέβα ανέστειλε την ανταπόκριση στην GnRH σε καλλιέργειες υποφυσιακών κυττάρων επίμυων (Schenken et al., 1984). Ειδικότερα, τα δεδομένα της παρουσίας της βιοδραστικότητας του GnSAF στο ωοθυλακικό υγρό διαφόρων ειδών, τόσο σε αυτόματους όσο και

σε κύκλους ωοθηκικής διέγερσης, υποδηλώνουν ότι ο GnSAF παράγεται από τα ωοθυλάκια. Μάλιστα η παραγωγή του GnSAF σχετίζεται με το μέγεθος του ωοθυλακίου, τόσο σε κύκλους διέγερσης όσο και σε αυτόματους κύκλους. Έτσι το ωοθυλακικό υγρό ωοθυλακίων < 11 χιλ. (σε κύκλους ωοθηκικής διέγερσης) (Fowler et al., 1994b) και αυτό ωοθυλακίων 6-8 χιλ., σε αυτόματους κύκλους, (Fowler et al., 2001, 2003), περιέχουν το μεγαλύτερο ποσό της βιοδραστικότητας GnSAF (McNatty, 1981; Westergaard et al., 1986; Fowler et al., 1994b; Magoffin & Jakimuik, 1997; Fowler et al., 2001). Τα κοκκώδη κύτταρα φαίνονται να είναι ο πιθανός τύπος παραγωγής του GnSAF, όπως αποδεικνύεται από μια μελέτη, όπου τα κοκκώδη κύτταρα αφού συλλέχθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση, καλλιεργήθηκαν και βρέθηκε βιοδραστικότητα του GnSAF στο περιβάλλον της καλλιέργειας (Fowler & Templeton, 1996). Πέραν των ωοθηκών φαίνεται ότι ο πλακούντας μπορεί να είναι ένας επιπλέον τύπος παραγωγής του GnSAF. Αυτό υπέδειξε η ελάττωση της ευαισθησίας των βοείων υποφύσεων στη GnRH και η αναστολή του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης της GnRH υπό την επίδραση ορού εγκύων γυναικών από τον οποίο είχε αφαιρεθεί η ινχιμπίνη (Fowler et al., 1995a).

Καθώς, τόσο ο ορός της ωοθηκικής φλέβας όσο και το ωοθυλακικό υγρό περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις των στεροειδών του φύλου, ιδιαίτερα οιστραδιόλη, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να ανιχνεύσουν βιοδραστικότητα του GnSAF σε ελεύθερο στεροειδών ορό, ωοθυλακικό υγρό ή ωοθηκικό ιστό μετά από ωοθυλακιόρρηξη (τόσο μετά από ωοθηκική διέγερση όσο και σε αυτόματους κύκλους) γυναικών, βοοειδών, χοίρων, επίμυων και σε εκχύλισμα ορχικού ιστού και κυττάρων Sertoli, με στόχο τον

αποκλεισμό της στεροειδικής του φύσης, και απέδειξαν *in vitro* τις κατασταλτικές του δράσεις πάνω στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Danforth et al., 1987; Fowler et al., 1990, 1994α, 1995; Korpenaal et al., 1993; Kita et al., 1994; Tio et al., 1994; van Dielen et al., 1999).

Ακολούθως του αποκλεισμού της στεροειδικής φύσης του GnSAF, αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητά του δεν σχετίζεται με την ινχιμπίνη (Farnworth et al., 1988; Muttukrishna και Knight, 1990; Fowler et al., 1994b). Αυτό έδειξαν πειραματικά δεδομένα όπου η συνεπώαση του ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού με αντιορό ινχιμπίνης δεν είχε καμία επίδραση στην βιοδραστικότητα του GnSAF, όπως φάνηκε με τη συνεχή μείωση της από την GnRH επαγόμενης έκκρισης LH, παρά την αναστολή της βιοδραστικότητας της ινχιμπίνης, που αφορά την καταστολή της βασικής έκκρισης FSH (Byrne et al., 1995). Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν οι μελέτες των Μεσσήνη και συν. (Messinis et al., 1991, 1993b) σε γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε εξωγενώς FSH.

Η παραγωγή του GnSAF ρυθμίζεται από την FSH σε ανθρώπους, πιθήκους και επίμυες (Schenken et al., 1984; Messinis & Templeton, 1986; Busbridge et al., 1988; Messinis & Templeton, 1991a; 1993b; 1994) και η βιοδραστικότητά του διαπιστώνεται κατά τη διάρκεια της μέσης και της όψιμης ωοθυλακικής (Messinis & Templeton, 1990c) και της ωχρινικής φάσης (Messinis et al., 1993c) σε γυναίκες υπό συνθήκες πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Η βιοδραστικότητα του GnSAF αξιολογήθηκε επίσης και στα βοοειδή (Fowler & Price, 1997) *in vitro* και παρατηρήθηκε ότι μετά την έναρξη της αγωγής με FSH, τόσο σε βοοειδή όσο και σε γυναίκες, η βιοδραστικότητα του GnSAF αυξήθηκε ταχύτερα από ό, τι η οιστραδιόλη ή η

ινχιμπίνη. Το χρονικό διάστημα διέγερσης της βιοδραστικότητας GnSAF από καλλιέργειες ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων, που συλλέγονται από μικρά (6-9 χιλ.) ωοθυλάκια ήταν ελάχιστο (8h) μετά από χορήγηση μιας δόσης FSH (Fowler και Mason al, 2000). Το εύρος των εκκριτικών ώσεων LH και η συχνότητα μειώθηκαν μετά 20h (Gosselin et., 2000) αγωγής με FSH σε βοοειδή, πράγμα που δείχνει αυξημένη βιοδραστικότητα GnSAF in vivo. Η διέγερση των άλλων υποψήφιων ορμονών για την καταστολή της από την GnRH επαγόμενης έκκρισης της LH (οιστραδιόλη, ινχιμπίνη A, ινχιμπίνη B) ήταν σημαντικά βραδύτερη από ό, τι η διέγερση του GnSAF (Messinis et al., 1991, 1993α, 1994α; Fowler & Price, 1997; Burger et al., 1998; Gosselin et al., 2000; Welt et al., 2001) .

Μηχανισμός της δράσης του GnSAF

Έχει παρατηρηθεί ότι η συνεπώαση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης με ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό ενισχύει τη βιοδραστικότητα του GnSAF σε υποφύσεις επίμυων (Fowler et al., 1995b). Μάλιστα, η μακροπρόθεσμη (24h) επώαση με οιστραδιόλη, προγεστερόνη ή οιστραδιόλη και προγεστερόνη δεν υπερνικά τη βιοδραστικότητα GnSAF in vitro αλλά μάλλον την κάνει πιο αποτελεσματική. Σε υποφύσεις επίμυων που είχε προεπιδράσει η οιστραδιόλη, η 4ωρη επώαση με GnRH και οιστραδιόλη ή προγεστερόνη προκάλεσε σημαντική ενίσχυση της έκκρισης και της σύνθεσης της LH σε σύγκριση με τις επιδράσεις μόνης της GnRH. Η βιοδραστικότητα του GnSAF σε ωοθυλακικό υγρό γυναικών υπό ωοθηκική διέγερση, από το οποίο έχει αφαιρεθεί η ινχιμπίνη, κατέστειλε σημαντικά τις ενισχυτικές επιδράσεις των παραπάνω ορμονών (Fowler & Templeton, 1996). Ωστόσο, το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό δεν είχε κατασταλτικές επιδράσεις

στην ενίσχυση της από τη GnRH προκαλούμενης σύνθεσης της LH που προκαλεί η χορήγηση προγεστερόνης. Σαφώς in vitro η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη από μόνες τους δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τη βιοδραστικότητα του GnSAF. Παρ' όλα αυτά, υπό συνθήκες που μιμούνται το προωορρηκτικό ορμονικό περιβάλλον (προεπίδραση της οιστραδιόλης) η προγεστερόνη ανταγωνίζεται τις κατασταλτικές επιδράσεις του GnSAF στην από τη GnRH αυξημένη σύνθεση της LH.

Ο GnSAF μπορεί να ξεπεράσει τη βιοδραστικότητα της ινχιμπίνης στο ελεύθερο από στεροειδή ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (Fowler et al., 1990, 1992, 1993). Επίσης βρέθηκε ότι η φολλιστατίνη αύξησε τις κατασταλτικές επιδράσεις του GnSAF και της ινχιμπίνης στην από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH. Πιθανόν η φολλιστατίνη τροποποιεί τοπικά τις επιδράσεις του GnSAF στην υπόφυση in vivo (Fowler & Templeton, 1996). Η έκφραση της φολλιστατίνης στην υπόφυση αυξάνει κατά τη διάρκεια του κύματος της LH, υποδηλώνοντας πως αυτή όπως και η ακτιβίνη πιθανόν να ασκούν μία παρακρινική επίδραση στη βιοδραστικότητα του GnSAF (Messinis, 2000).

Εώς σήμερα δεν υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με τη φύση και τον αριθμό των υποδοχέων του GnSAF στα γοναδοτρόφα της υπόφυσης. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν καταστολή της αυτοπριμοδότησης της GnRH υπό την επίδραση του GnSAF (Fowler et al., 1994). Ωστόσο δεν φαίνεται ότι ο GnSAF ασκεί τη δράση του με άμεση κατάληψη των υποδοχέων της GnRH (Fowler & Templeton, 1996) και είναι ασαφές, εάν έχει κάποια επίδραση στον αριθμό αυτών των υποδοχέων ή στην ενεργοποίησή τους. Καθώς χορήγηση της προγεστερόνης δεν αντιστρέφει την κατασταλτική επίδραση τόσο του GnSAF όσο και του RU486 στη διεγερμένη έκκριση της LH, συνάγεται 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).

Φυσιολογικός ρόλος του GnSAF στον γεννητικό κύκλο

Όπως έχει αποδειχθεί με *in vivo* και *in vitro* πειραματικά δεδομένα η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί την υπόφυση κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του γεννητικού κύκλου. Ωστόσο, η ευαισθητοποίησης αυτή δράση της οιστραδιόλης, η οποία πειραματικά αποδεικνύεται με την σε 30 λεπτά απάντηση της LH σε μια υπομέγιστη δόση GnRH, γίνεται εμφανής μόνο στην προωθυλακιορρηκτική περίοδο, πριν την έναρξη του μεσοκύκλιου κύματος της LH. Αυτή η καθυστέρηση της εκδήλωσης της ευαισθητοποιού δράσης της οιστραδιόλης οφείλεται στον GnSAF, οποίος την ανταγωνίζεται κατά το μεγαλύτερο μέρος της ωοθυλακικής φάσης.

Αν και η βιοδραστικότητα GnSAF είναι ιδιαίτερα εμφανής κατά τη διάρκεια των κύκλων ωοθηκικής διέγερσης, φαίνεται ότι ο παράγοντας αυτός παίζει ένα φυσιολογικό ρόλο κατά τον αυτόματο εμμηνορρυσιακό κύκλο, επηρεάζοντας την έκκριση των γοναδοτροφινών. Σε αυτόματους γεννητικούς κύκλους η δραστηριότητα του GnSAF είναι υψηλότερη στην πρώιμη και την μέση (Martinez et al., 2002) από ό,τι στην όψιμη ωοθυλακική φάση, και διαπιστώνεται σε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, ιδιαίτερα των μικρών και μεσαίων ωοθυλακίων (Messinis & Templeton, 1991b; Messinis et al., 1994, 1998), με τα στρατολογημένα μικρά ωοθυλάκια να παράγουν τις υψηλότερες ποσότητες GnSAF στη πρώιμη ωοθυλακική φάση. Έτσι αιτιολογείται η διατήρηση της υπόφυσης σε κατάσταση χαμηλής ανταπόκρισης στη δράση της GnRH στη φάση αυτή (Messinis & Templeton, 1991; Fowler et al., 2003;

Messinis, 2003). Η κατάσταση μεταβάλλεται με την πρόοδο της ωοθυλακικής φάσης, καθώς μετά την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου και από τα κοκκώδη κύτταρά του παράγονται σταθερά χαμηλότερες ποσότητες GnSAF, καθώς το κυρίαρχο ωοθυλάκιο προχωράει προς την ωοθυλακιορρηξία. Έτσι στα τέλη της ωοθυλακικής φάσης, οπότε μειώνεται η βιοδραστικότητα GnSAF, διευκολύνεται η ευαισθητοποιός επίδραση της οιστραδιόλης στην υπόφυση καθώς και η πλήρης εκδήλωση της αιχμής της LH στο μέσο του κύκλου (Messinis et al., 1994).

Κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης ο GnSAF παράγεται από τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια ενώ το ωχρό σωματίο δεν φαίνεται να συμμετέχει στην παραγωγή αυτή (Messinis et al., 1996).

Κατά την μετάβαση από την ωχρινική στην ωοθυλακική φάση, μελέτες των Μεσσήνη και συν. (Messinis et al., 1991, 1993c, 2002) έχουν δείξει ότι ο GnSAF παράγεται κάτω από την επίδραση της διακυκλικής αύξησης της FSH. Μάλιστα, η μείωση της υποφυσιακής ανταπόκρισης στην GnRH κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την ωχρινική στην ωοθυλακική φάση υποδεικνύει ότι τα μικρά ωοθυλάκια, ανταποκρινόμενα στην αύξηση της FSH κατά τη μεταβατική αυτή φάση, μπορούν να παράγουν GnSAF στο τέλος της ωχρινικής φάσης (Messinis et al., 1993b).

Κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου λοιπόν, η οιστραδιόλη και ο GnSAF φαίνεται να αλληλεπιδρούν στην υπόφυση και τα γοναδοτρόφα με την οιστραδιόλη να εκφράζει μια ευαισθητοποιό επίδραση και τον GnSAF μια ανταγωνιστική σε αυτή την επίδραση δράση (Messinis et al., 1998; Messinis, 2000, 2006b).

Ειδικότερα, φαίνεται πως ο ενδοκρινικός ρόλος του GnSAF στον άνθρωπο αφορά τον έλεγχο του εύρους και όχι της έναρξης του κύματος της LH. Στην πραγματικότητα, ένα ενδογενές κύμα της LH συμβαίνει πάντοτε ως απάντηση στο θετικό μηχανισμό αλληλορύθμισης της οιστραδιόλης, είτε στην πρώιμη είτε στη μέση ωοθυλακική φάση του φυσικού εμμηνορυσιακού κύκλου, αλλά αυτό το κύμα είναι εξασθενημένο σε σύγκριση με αυτό της μέσης του κύκλου (Taylor et al, 1995; Messinis et al., 2001). Δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ο GnSAF να συμμετέχει στον καθορισμό του χρόνου της μεσοκύκλιας αιχμής της LH, αποτελώντας ένα από τα σήματα που στέλνει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο στον εγκέφαλο καθώς προχωράει προς την ωοθυλακιορρηξία (Messinis, 2006b; Messinis et al., 2014). Το γεγονός ότι το ενδογενές κύμα της LH αμβλύνεται σε γυναίκες που υποβάλλονται σε πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας αποτελεί απόδειξη πως ο παράγοντας αυτός είναι αρχικά υπεύθυνος για την καταστολή της έκκρισης της LH κατά τη διάρκεια του κύματός της. Ακολούθως και συνθέτοντας τα ερευνητικά δεδομένα, φαίνεται πως σε αυτόματους κύκλους κατόπιν της έναρξης του κύματος της LH, η θετική επίδραση της οιστραδιόλης αμβλύνεται από τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της προγεστερόνης και τη μειωμένη δραστηριότητα του GnSAF. Αυτό σημαίνει πως η άμβλυνση του κύματος της LH είναι τελικά αποτέλεσμα της ισορροπίας ανάμεσα στη θετική επίδραση της προγεστερόνης και την αρνητική επίδραση του GnSAF, καθώς η προγεστερόνη φαίνεται επίσης να παίζει ένα ρόλο στον έλεγχο του εύρους της LH. Υπό πειραματικές συνθήκες, στον κανονικό κύκλο ή σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, εξωγενής χορήγηση προγεστερόνης επέτεινε

την αιχμή της LH, που την προκάλεσε η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνου (Liu & Yen, 1983; Messinis & Templeton, 1990).

Αν και υπάρχουν *in vitro* δεδομένα, που υποστηρίζουν ότι ο GnSAF παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες από μικρότερα παρά από μεγάλα ωοθυλάκια με άντρο (Fowler et al., 1990), εντούτοις λείπουν παρόμοια δεδομένα *in vivo*.

Γ. ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ

Ως περιεμμηνόπαυση ορίζεται ο χρονική περίοδος στη ζωή της γυναίκας οπότε συμβαίνουν φυσιολογικές μεταβολές, οι οποίες εγκαινιάζουν τη μετάβαση στην εμμηνόπαυση, αρκετά χρόνια πριν από αυτή. Σ'αυτή τη χρονική περίοδο τα επίπεδα των παραγόμενων ωοθηκικών ορμονών παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις, οδηγώντας σε απώλεια της κανονικότητας των εμμηνορρυσιακών κύκλων και εμφάνιση αγγειοκινητικών συμπτωμάτων. Ως εμμηνόπαυση ορίζεται η μόνιμη διακοπή των εμμηνορρυσιακών κύκλων ως αποτέλεσμα της απώλειας της ωοθηκικής δραστηριότητας. Η διαπίστωσή της είναι αναδρομική και ορίζεται μετά από αμηνόρροια ενός έτους από την τελευταία εμμηνορρυσία, όταν γι' αυτήν δεν ενοχοποιούνται άλλοι βιολογικοί ή ψυχολογικοί παράγοντες (WHO 1996).

Ορμονικές μεταβολές στην περιεμμηνόπαυση

Κατά την όψιμη αναπαραγωγική περίοδο, η οποία αρχίζει στα μέσα της δεκαετίας των 30 ετών σε συνδυασμό με μείωση της γονιμότητας, παρατηρείται αρχικά μείωση των επιπέδων της ινχιμπίνης Β, η οποία ακολουθείται από πτώση των επιπέδων της ινχιμπίνης Α και της προγεστερόνης ενώ τα επίπεδα της οιστραδιόλης διατηρούνται σταθερά ή μπορεί να παρουσιάσουν μέτρια αύξηση, σ'αυτό το πρώιμο στάδιο της ωοθηκικής γήρανσης. Ωστόσο ο πιο αξιόπιστος ορμονικός δείκτης της περιεμμηνόπαυσης είναι τα αυξημένα επίπεδα FSH κατά την πρώιμη

ωοθυλακική φάση. Αργότερα στην ωοθυλακική φάση η απώλεια του αρνητικού μηχανισμού αλληλορρύθμισης της ινχιμπίνης εξισορροπείται με την ενίσχυση του αρνητικού μηχανισμού αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων και έτσι τα επίπεδα της FSH δεν μεταβάλλονται. Στα επόμενα χρόνια, ακόμη και παρουσία φυσιολογικής εμμηνορρυσίας, τα επίπεδα της FSH είναι αυξημένα σε όλη τη διάρκεια του κύκλου.

Η μείωση των επιπέδων της ινχιμπίνης Β αποτελεί τον πρωιμότερο ορμονικό δείκτη ενώ τα επίπεδα της ινχιμπίνης Α και της οιστραδιόλης αρχίζουν να μειώνονται 3 - 11 μήνες πριν την τελευταία εμμηνορρυσία. Τα επίπεδα της FSH είναι αυξημένα 2 χρόνια πριν την εμμηνόπαυση ενώ 10 μήνες πριν την τελευταία εμμηνορρυσία παρουσιάζουν μια σημαντική διακύμανση. Τέσσερα έτη πριν την εμμηνόπαυση αρχίζουν να μειώνονται τα επίπεδα της δεσμευτικής των φυλετικών ορμονών σφαιρίνης (SHBG), σε συσχέτιση με τις μεταβολές στην οιστραδιόλη και τον δείκτη μάζας σώματος (BMI). Αμετάβλητα μένουν τα επίπεδα της τεστοστερόνης, με μείωση των τιμών της ελεύθερης ως αποτέλεσμα της μείωσης της SHBG.

Μεταβολές στην εμμηνόπαυση

Η ωοθήκη μετά την εμμηνόπαυση ατροφεί και υφίσταται μεταβολές τόσο δομικές όσο και σχετικές με την ορμονική δραστηριότητα. Έτσι, στον φλοιό της μετεμμηνοπαυσιακής ωοθήκης παρατηρούνται α) μείωση του πάχους του β) επιθηλιακά εγκλείσματα, τα οποία σχηματίζουν κύστεις γ) ασαφопоίηση των ορίων μεταξύ φλοιού και στρώματος δ) απώλεια ή μείωση του αριθμού των ωοθυλακίων ενώ μπορεί να παρατηρηθούν και υπολείμματα εκφυλισμένων ωοθυλακίων (έχει αναφερθεί ότι οι ωοθήκες μπορεί να

περιέχουν αρχέγονα ωοθυλάκια ακόμα και 10 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση (Costoff & Mahesh 1975; Gosden, 1987; Thatcher & Naftolin, 1991) ε) τάση κατακερματισμού των λευκών σωματίων στ) αναδιπλώσεις του επιθηλίου. Στο στρώμα οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν α) παρουσία ίνωσης και ουλών β) δομικές μεταβολές των αγγείων με υαλοποίηση των τοιχωμάτων και περιορισμό του αυλού τους.

Αν και, όπως έχει διαπιστωθεί με ιστοχημικές μεθόδους, η μετεμμηνοπαυσιακή ωοθήκη περιέχει αρκετά ένζυμα στεροειδογένεσης (Plotz et al., 1967) και παράλληλα δομικά χαρακτηριστικά, που υποδηλώνουν ισχυρό στεροειδογενετικό δυναμικό, εντούτοις παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές στην ορμονική δραστηριότητα.

Ορμονικές μεταβολές στην εμμηνόπαυση

Οιστρογόνα

Η πιο σημαντική μεταβολή είναι η αισθητή μείωση της οιστραδιόλης και της οιστρόνης. Οι τιμές ορού της οιστρόνης είναι κατά μέσο όρο 30 pg / ml και παράγεται κυρίως από περιφερική αρωματοποίηση από ανδρογόνα – ανδροντενδιόνη, η οποία είναι κυρίως επινεφριδικής προέλευσης - τα οποία μειώνονται κατά κύριο λόγο ως συνάρτηση της ηλικίας. Η θειική οιστρόνη είναι ένα συζυγές οιστρογόνο που εξυπηρετεί ως μια σταθερή δεξαμενή των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και τα επίπεδα της είναι τα υψηλότερα μεταξύ των οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η οιστραδιόλη ορού μειώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι η οιστρόνη. Τους πρώτους 12 μήνες μετά την εμμηνόπαυση η πτώση των επιπέδων της οιστραδιόλης στην κυκλοφορία είναι σχετικά απότομη ενώ τα επόμενα χρόνια παρατηρείται μία

πιο ήπια ελάττωση (Longcope et al., 1986). Τα επίπεδα οιστραδιόλης κυμαίνονται κατά μέσο όρο στα 15 pg /ml, με εύρος από 10 έως 25 pg /ml.

Ο ημερήσιος ρυθμός παραγωγής των οιστρογόνων σχετίζεται με το βάρος σώματος, δηλαδή τη δραστηριότητα της αρωματάσης του λιπώδους ιστού, η οποία συσχετίζεται με τη χρονολογική αλλά όχι με τη μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία (Cleland et al., 1985; Longcope & Baker, 1993; Bulun & Simpson, 1994). Το πηλίκιο οιστρόνης προς ανδροστενδιόνη, που αποτελεί ένα δείκτη της δραστηριότητας της αρωματάσης, αλλά και η εκτίμηση με ραδιοσημασμένη ανδροστενδιόνη του ρυθμού αρωματοποίησης *in vitro*, έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται θετικά με το δείκτη μάζας σώματος (body mass index, BMI) και με την ηλικία, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι των ωθηκών (Cleland et al., 1985; Laughlin et al., 2000). Τα επίπεδα του mRNA της αρωματάσης (P450arom) του λιπώδους ιστού αυξάνουν με την ηλικία στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Bulun & Simpson, 1994). Οι ρυθμοί μετατροπής από τη μία μορφή στην άλλη τόσο των οιστρογόνων (οιστραδιόλης σε οιστρόνη και αντίστροφα) όσο και των ανδρογόνων (ανδροστενδιόνης σε τεστοστερόνη και αντίστροφα) δεν μεταβάλλονται με την ηλικία (Longcope & Baker, 1993).

Αναφορικά με την άμεση ωθηκική συμμετοχή στα κυκλοφορούντα επίπεδα των οιστρογόνων έχουν παρατηρηθεί τα εξής: Φαίνεται πως η καταστολή των επινεφριδίων με εξωγενή γλυκοκορτικοειδή μειώνει σημαντικά τα κυκλοφορούντα επίπεδα των οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Maroulis & Abraham, 1976) ενώ η επινεφριδιεκτομή εκτελούμενη μετά την ωθηκεκτομή ουσιαστικά εξαφανίζει τα μετρούμενα οιστρογόνα στα ούρα (Barlow et al., 1969). Σε κάποιες μελέτες (Longcope et al., 1980), δεν

αποδείχθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης είναι μεγαλύτερες στην ωθηκική φλέβα σε σχέση με την ωθηκική αρτηρία, ούτε ότι το στρώμα της μετεμμηνοπαυσιακής ωθήκης είναι ικανό να αρωματοποιήσει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (Mattingly & Huang, 1969).

Ωστόσο υπάρχουν ερευνητικά αποτελέσματα τα οποία τάσσονται υπέρ της ωθηκικής συμμετοχής στα κυκλοφορούντα επίπεδα οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση. Έτσι φάνηκε ότι *in vitro* μπορεί να παραχθεί οιστραδιόλη από το στρώμα και τα κύτταρα της πύλης της μετεμμηνοπαυσιακής ωθήκης, υποδεικνύοντας έτσι την αρωματοποιητική της ικανότητα (Dennefors et al., 1980, 1982) και ότι είναι δυνατή η περιορισμένη παραγωγή οιστρογόνων, καθώς διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της οιστρόνης είναι διπλάσιες στο αίμα των ωθηκικών φλεβών σε σχέση με αυτές στο περιφερικό αίμα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (Judd ,1974a). Επίσης σε ανοσοϊστοχημική μελέτη φάνηκε η έκφραση της αρωματάσης στο ωθηκικό στρώμα της μετεμμηνοπαυσιακής ωθήκης (Inkster & Brodie, 1991).

Ανδρογόνα

Τόσο η μετεμμηνοπαυσιακή ωθήκη όσο και τα επινεφρίδια συνεχίζουν να παράγουν ανδρογόνα. Η ωθήκη συνεχίζει να παράγει ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη, και αυτή η παραγωγή έχει αποδειχθεί ότι εν μέρει τουλάχιστον εξαρτάται από την LH (Dowsett et al., 1988; Andreyko et al., 1992). Η ανάλυση του αίματος των ωθηκικών φλεβών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις της ανδροστενδιόνης και της τεστοστερόνης είναι 15 και 4 φορές μεγαλύτερες, αντίστοιχα, από αυτές στο

περιφερικό φλεβικό αίμα (Judd et al., 1974a). Ωστόσο, μετά την εμμηνόπαυση υπάρχει σημαντική πτώση της συνολικής παραγωγής της ανδροστενδιόνης. Αυτή η μείωση οφείλεται κυρίως στην ελάττωση της ωθητικής συμμετοχής στην κυκλοφορούσα ποσότητα της ανδροστενδιόνης. Ενώ λοιπόν η προεμμηνόπαυσιακή ωθήκη συμμετέχει περίπου κατά το ήμισυ στο συνολικό ημερήσιο ρυθμό παραγωγής της ανδροστενδιόνης (1.5 mg/24ωρο), η σχετική της συμμετοχή μετά την εμμηνόπαυση ελαττώνεται κατά 80% (0.3 mg/24ωρο)(ποσοστό σχετικής συμμετοχής από 50% πριν την εμμηνόπαυση σε 20% στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες). Παρατηρείται επίσης και μικρή μείωση της επινεφριδιακής συμμετοχής, η οποία ελαττώνεται από 1.5 mg/24ωρο σε 1.2 mg/24ωρο. Ωστόσο, η μετεμμηνόπαυσιακή ωθήκη παράγει περισσότερη ανδροστενδιόνη (0.3 mg/24ωρο) παρά τεστοστερόνη (60 μg/24ωρο).

Αναφορικά με την τεστοστερόνη, στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση παρατηρείται μείωση (28%) του ρυθμού συνολικής παραγωγής της. Η μείωση αυτή της ημερήσιας παραγωγής της τεστοστερόνης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ελάττωση της σχετικής συμμετοχής των μη ωθητικών πηγών παραγωγής της. Η παραγωγή επινεφριδιακής προελεύσεως τεστοστερόνης πιθανόν να τελείται από έμμεσους μηχανισμούς (δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ανδροστενδιόνη). Ωστόσο, η ωθητική συμμετοχή στην ημερήσια παραγωγή της τεστοστερόνης δεν μεταβάλλεται μετά την εμμηνόπαυση, με αποτέλεσμα η σχετική συμμετοχή της στη συνολική ημερήσια παραγωγή να αυξάνει στο 40% σε σχέση με το 25% πριν την εμμηνόπαυση (Adashi, 1994). Με την αύξηση της ηλικίας των μετεμμηνόπαυσιακών γυναικών έχει βρεθεί μία αύξηση της παραγωγής της τεστοστερόνης από την ωθήκη, με αποτέλεσμα

η συγκέντρωση της στην κυκλοφορία να επιστρέφει σε προεμμηνόπαυσιακά επίπεδα, ενώ αντιθέτως τα επίπεδα της ανδροστενδιόνης στην κυκλοφορία δείχνουν να έχουν αρνητική συσχέτιση (Chakravarti et al., 1976; Jiroutek et al., 1998; Laughlin et al., 2000). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες, που δεν έχουν καταλήξει σε ανάλογα συμπεράσματα (Meldrum et al., 1981; Cauley et al., 1989).

Αναφορικά με τους ρυθμούς μεταβολικής κάθαρσης των ανδρογόνων φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται από τη χρονολογική ή τη μετεμμηνόπαυσιακή ηλικία των γυναικών, ενώ συσχετίζονται με το βάρος σώματος (Longcope & Baker, 1993; Laughlin et al., 2000).

Μεταβολές στην έκκριση των γοναδοτροφινών μετά την εμμηνόπαυση

Η απώλεια του μηχανισμού αλληλορύθμισης των ωοθηκικών στεροειδών στην FSH και στην LH και της ινχιμπίνης στην FSH λόγω της εξάντλησης των ωοθυλακίων συνδέεται με μια κατά 15 φορές αύξηση των επιπέδων της FSH και κατά 10 φορές των επιπέδων της LH σε σχέση με τα επίπεδα που παρατηρούνται κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, οπότε παρατηρούνται και τα χαμηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης, σε υγιείς γυναίκες (Yen & Tsai, 1971; Wide et al., 1973; Chakravarti et al., 1976; Gill et al., 2002a). Η άνοδος της FSH, η οποία αρχίζει ήδη από την ηλικία των 38 (στάδιο-3)(Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW)(Soules et al., 2001), παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις μέχρι περίπου 4 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση (στάδιο 1), όταν οι τιμές είναι σταθερά μεγαλύτερες από 20 mIU /ml. Φαίνεται ωστόσο ότι τόσο για την FSH όσο και για την LH τα επίπεδα φθάνουν σε plateau μετά περίπου 12 μήνες αμηνόρροιας (Longcope et al., 1986) ενώ η αύξηση των επιπέδων τους στην κυκλοφορία οφείλεται στην αύξηση της

έκκρισης τους από τα γοναδοτρόφα της υπόφυσης (Gharib et al., 1990). Τα αυξημένα επίπεδα γοναδοτροφινών προκύπτουν από τη μείωση της έκκρισης οιστραδιόλης και ινχιμπίνης. Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά για τον έλεγχο της παραγωγής του GnRH mRNA σε τύπου 1 νευρώνες (Wittkowski et al., 1999; Zhu et al., 2007). Επιπλέον, η αύξηση των γοναδοτροφινών που παρατηρείται κατά την εμμηνόπαυση φαίνεται να ενισχύεται από την ουσία P (Jeong et al., 2006) καθώς και από ταχυκινίνες που παράγονται σε υπερτροφικούς νευρώνες (Marshall et al., 1993; De Kretser et al., 2002) ως αποτέλεσμα της μείωσης της οιστραδιόλης.

Εκτός από τις αυξήσεις της FSH και της LH, δεν επηρεάζονται τα επίπεδα άλλων υποφυσιακών ορμονών. Η αυξητική ορμόνη (GH), η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH) και η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (ACTH) είναι σε φυσιολογικά επίπεδα. Τα επίπεδα ορού προλακτίνης (PRL) μπορεί να μειωθούν ελαφρά, ως αποτέλεσμα μείωσης των οιστρογόνων.

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης αρχίζουν να ελαττώνονται από περίπου 2 έτη πριν την εμμηνόπαυση, με πιο ταχεία μείωση γύρω από το χρόνο της εμμηνόπαυσης και φτάνουν σε plateau 2 έτη μετά από αυτή (Burger et al., 1999).

Δράση γοναδοτροφινών στην ωοθήκη

Στο στρώμα και στα κύτταρα της πύλης της μετεμμηνοπαυσιακής ωοθήκης έχουν βρεθεί με τη χρήση σημασμένων με ραδιενεργό ιώδιο (¹²⁵I) γοναδοτροφινών, θέσεις σύνδεσης των γοναδοτροφινών (Nakano et al., 1989) ενώ τα κύτταρα αυτά εξακολουθούν να παραμένουν ευαίσθητα στις γοναδοτροφίνες. Αυτό διαπιστώθηκε in vitro με την παραγωγή μετρήσιμων

ποσοτήτων ανδροστενδιόνης, οιστραδιόλης και προγεστερόνης, υποδηλώνοντας αρωματοποιητική ικανότητα για το στρώμα της μετεμμηνοπαυσιακής ωοθήκης. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα της πύλης και του στρώματος μπορούν να απαντήσουν στην εξωγενή χορήγηση χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) με αύξηση της βιοσύνθεσης των στεροειδών, υποδηλώνοντας ότι στα κύτταρα αυτά διατηρείται η ευαισθησία στις LH και hCG (Peluso et al., 1976; Dennefors et al., 1980; Dowsett et al., 1988). Καθώς στα κύτταρα της πύλης έχουν βρεθεί διάφορα στεροειδογενετικά ένζυμα, είναι πιθανό ότι οι γοναδοτροφίνες στην κυκλοφορία ελέγχουν τη στεροειδογένεση σε αυτά τα κύτταρα.

Ο μεταβολισμός των γοναδοτροφινών μετά την εμμηνόπαυση

Οι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες της υπόφυσης μεταβολίζονται με νεφρικούς (Emmanouel et al., 1984) και ηπατικούς μηχανισμούς (Fiete et al., 1991), οι οποίοι δεν επηρεάζονται από την αύξηση της ηλικίας και το γοναδικό ορμονικό περιβάλλον (Sharpless et al., 1999). Μεταβολές της υδατανθρακικής σύνθεσης των ισομορφών LH και FSH, που παρατηρούνται στην εμμηνόπαυση πιθανόν ως αποτέλεσμα των μεταβολών στο περιβάλλον των γοναδικών στεροειδών (Wide et al 1994), μπορούν να μεταβάλουν την κάθαρση των γοναδοτροφινών στο πλάσμα. Οι πιο όξινες ισομορφές της FSH καθαίρονται βραδύτερα όταν ενίονται σε ποντίκια (Wide et al., 1984) αλλά παρουσιάζουν μικρότερη βιοδραστικότητα σε in vitro (Andersen et al., 2001; Ulloa-Aguirre et al., 2001). Ενώ όμως ο χρόνος ημίσειας ζωής της FSH είναι μικρότερος, της LH είναι μεγαλύτερος στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (από 60 λεπτά σε νέες σε 140 λεπτά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Booth et al.,

1996; Sharpless et al., 1999)). Αντίθετα η εμμηνόπαυση δεν μεταβάλλει την κάθαρση της ελεύθερης α-υπομονάδας (FAS).

Εώς σήμερα δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η ηλικία επιδρά επιπροσθέτως στην κάθαρση της LH μετά την εμμηνόπαυση.

Η επίδραση της ηλικίας

Υποθαλαμικές μεταβολές με την ηλικία

Συχνότητα εκκριτικών ώσεων GnRH

Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα, καθώς σε κάποιες μελέτες παρατηρείται μια μείωση στη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH (Lambalk et al., 1997) ενώ σε κάποιες άλλες όχι. Οι Alexander και συν. (1990) δεν βρήκαν κάποια επίδραση της ηλικίας (με όριο τα 50 έτη) σε ωθηκεκτομηθείσες γυναίκες. Παρομοίως, οι Santoro και συν. (1998) δεν βρήκαν διαφορές στη συχνότητα των ώσεων της LH εντός ενός 24ωρου, μεταξύ γυναικών με πρόωρη και μη εμμηνόπαυση. Αντίθετα, οι Rossmannith και συν. (1991), συγκρίνοντας γυναίκες ηλικίας 49-57 και 78-87 ετών μετά από φυσική εμμηνόπαυση, έδειξαν ότι η συχνότητα των ώσεων της LH μειώνεται με την ηλικία. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι μελέτες των Lambalk και συν. (1997). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι η συχνότητα των ώσεων της FAS μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, όπως βέβαια και τα επίπεδα των γοναδοτροφινών στην κυκλοφορία, ανεξάρτητα από τις μεταβολές των ωθηκικών στεροειδών (Hall et al., 2000) και διαπιστώθηκε επιβράδυνση της συχνότητας των εκκριτικών ώσεων της GnRH από περίπου κάθε 50 λεπτά στις νεώτερες σε κάθε 70 λεπτά σε μεγαλύτερες μετεμμηνοπαυσιακές

γυναίκες (Hall et al., 2000). Επιπλέον παρατηρείται μια αξιοσημείωτη αύξηση των διαστημάτων μεταξύ των εκκριτικών ώσεων της GnRH με την ηλικία. Τέλος, έχει διαπιστωθεί μια εξαρτώμενη από τον ύπνο μεταβολή στην δυναμική των ώσεων της GnRH σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Reame et al., 2002).

Ποσότητα έκκρισης GnRH

Οι μεταβολές στη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων αντανακλούν μόνο μια άποψη της έκκρισης GnRH και δεν αντιπροσωπεύουν τη συνολική ποσότητα της εκκρινόμενης GnRH ή την ποσότητα της GnRH που εκκρίνεται σε κάθε εκκριτική ώση. Οι Gill και συν. (2002a) χρησιμοποιώντας μία ημιποσοτική μέθοδο εκτίμησης της ποσότητας της ενδογενώς εκκρινόμενης GnRH, με τη χορήγηση μικρής δόσης GnRH ανταγωνιστή, διαπίστωσαν αύξηση της ποσότητας της εκκρινόμενης GnRH σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με νεώτερες γυναίκες και σε συσχέτιση με την κατάργηση του ωοθηκικού αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (Hall et al., 1994; Hayes et al., 1998). Επίσης αν και παρατηρήθηκε μείωση στη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων μεταξύ νεώτερων και μεγαλύτερων μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, η αύξηση της ηλικίας συνδέθηκε με αύξηση παρά με μείωση στη συνολική ποσότητα εκκρινόμενης GnRH. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με εκείνα που δείχνουν τη μείωση της συχνότητας των ώσεων της GnRH με την αύξηση της ηλικίας, καταδεικνύουν μια αύξηση στην ποσότητα της GnRH, που εκκρίνεται κατά ώση. Η διαπίστωση αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης GnRH σε νευρώνες στο μέσο βασικό υποθάλαμο σε μετεμμηνοπαυσιακές σε σχέση με νεώτερες γυναίκες (Rance et al., 1996).

Επιπλέον νεκροτομικές μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες υποδηλώνουν ότι η έκκριση της GnRH αυξάνει με την ηλικία (Rance et al., 1990, 1996). Επομένως η ικανότητα του υποθαλάμου να εκκρίνει GnRH δεν ελαττώνεται με την ηλικία αν και η δυναμικές του ελέγχου μεταβάλλονται. Επιπλέον οι μελέτες αυτές δείχνουν πως θα πρέπει να υπάρχει σημαντική συμμετοχή της υπόφυσης στην αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων LH που συμβαίνει με την ηλικία κατά την εμμηνόπαυση, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

Μεταβολές στην έκκριση των γοναδοτροφινών- υπόφυση με την ηλικία

Μετά την εμμηνόπαυση τα επίπεδα των γοναδοτροφινών και της FAS μειώνονται προοδευτικά με την ηλικία (Kwekkeboom et al. 1990; Rossmanith et al., 1991, 1994a; Hall et al., 2000). Μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έδειξαν πως μεταξύ των ηλικιών 45-55 και 70-80 παρατηρείται μια μείωση κατά περίπου 30% στα επίπεδα των γοναδοτροφινών (από 148.6 ± 8.4 UI/l σε 107.0 ± 5.4 UI/l για την FSH και από 95.8 ± 7.3 UI/l σε 60.4 ± 3.9 UI/l για την LH) υποδηλώνοντας ότι η έκκριση τους δεν επηρεάζεται μόνο από το ωθητικό feedback αλλά και από την ηλικία (Hall et al., 2000). Εώς σήμερα δεν υπάρχουν στοιχεία για το εάν η αύξηση της κάθαρσης των γοναδοτροφινών συμμετέχει στη μείωση των επιπέδων τους στο πλάσμα με την ηλικία μετά την εμμηνόπαυση. Επίσης, αντικείμενο έρευνας αποτελεί εάν η μείωση των εκκρινόμενων επιπέδων γοναδοτροφινών με την ηλικία προκαλείται από υποθαλαμικούς ή υποφυσιακούς παράγοντες.

Μεταβολές στην ικανότητα της υπόφυσης να απαντά στην GnRH έχουν μελετηθεί με τη χρήση είτε του εύρους των εκκριτικών ώσεων (Hall et al.,

2000) της LH είτε της απάντησης στην εξωγενή χορήγηση GnRH (Rossmanith et al., 1991). Τα αποτελέσματα διαφέρουν με την πλειοψηφία των μελετών να μιλούν για μια σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση στην ικανότητα της υπόφυσης να εκκρίνει γοναδοτροφίνες (Rossmanith et al., 1991; Genazzani et al., 1997), αν και αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες (Alexander et al., 1990; Lambalk et al., 1997; Santoro et al., 1998). Οι Hall και συν. (2000) έδειξαν ότι υπάρχει μείωση του εύρους των ώσεων της FAS και της LH με την αύξηση της ηλικίας, για την οποία βέβαια μπορεί να ευθύνονται είτε η μείωση της ποσότητας της GnRH που εκκρίνεται σε κάθε ώση είτε η μείωση της ευαισθησίας των γοναδοτρόφων στη GnRH. Σχετικά με το δεύτερο, η απάντηση της FSH και της LH στην εξωγενή χορήγηση της GnRH βρέθηκε να είναι μειωμένη σε μεγαλύτερες σε σχέση με νεώτερες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Rossmanith et al., 1991). Ωστόσο, οι Lambalk και συν. (1997) βρήκαν ότι με την αύξηση της χρονολογικής ηλικίας υπήρχε μία αύξηση της απάντησης της LH στη GnRH, ενώ με την αύξηση των ετών μετά την εμμηνόπαυση (μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία) διαπιστώθηκε μείωση της απάντησης της LH στη GnRH .

Η επίδραση της ηλικίας στον αρνητικό μηχανισμό των οιστρογόνων και της προγεστερόνης

Όπως συνάγεται από τα παραπάνω, μετά την εμμηνόπαυση συμβαίνουν αλλαγές στις σχέσεις μεταξύ των ωοθηκών και του υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος. Κατά την περιεμμηνόπαυση, τα επίπεδα της FSH είναι αυξημένα, της ινχιμπίνης Β είναι μειωμένα κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση, αν και διατηρείται η κανονικότητα των κύκλων (Klein et al., 1996;

Soules et al., 1998) και οι τιμές της LH είναι φυσιολογικές, κάτι που δείχνει πως καιρό πριν την εμμηνόπαυση αρχίζει να αμβλύνεται ο αρνητικός μηχανισμός των ωθηκικών στεροειδών (Messinis, 2006). Μετά την εμμηνόπαυση ωστόσο ο αρνητικός μηχανισμός καταργείται όπως αποδεικνύεται, καθώς μετά από ωθηκεκτομή υγείων μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών οι τιμές FSH, LH, οιστραδιόλης δεν μεταβάλλονται (Dafopoulos et al., 2004b; Messinis, 2006).

Όσον αφορά στην επίδραση των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων στην έκκριση των γοναδοτροφινών στη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο, φαίνεται ότι ο αρνητικός μηχανισμός feedback διατηρείται, καθώς η χορήγηση οιστραδιόλης σε νεώτερες και μεγαλύτερες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συνδέθηκε με μείωση των μέσων επιπέδων LH, FSH, FAS αλλά με καμιά μεταβολή στη συχνότητα ώσεων της FAS (Cagnacci et al., 1989; Chongthammakun et al., 1993; Rossmannith et al., 1994a; Santoro et al., 1998; Gill 2002a). Η επιπλέον χορήγηση προγεστερόνης για 7 ημέρες οδήγησε σε μια περαιτέρω μείωση στα επίπεδα των γοναδοτροφινών, σε συνδυασμό με μείωση στην συχνότητα ώσεων της FAS (Cagnacci et al., 1989; Rossmannith et al., 1994b; Gill et al., 2002b).

Οι μεταβολές στα επίπεδα των γοναδοτροφινών και τη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της GnRH, σε απάντηση στον στεροειδικό μηχανισμό αλληλορύθμισης (τόσο των οιστρογόνων όσο και της προγεστερόνης), σε κάποιες μελέτες ήταν παράλληλες σε νεώτερες και μεγαλύτερες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Gill, 2002b), ενώ σε κάποιες άλλες επισημαίνεται μείωση της απαντητικότητας στο στεροειδικό feedback με την ηλικία (Santoro et al., 1998). Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν τη διατήρηση του

στεροειδικού αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης στην εμμηνόπαυση αν και παραμένει αδιευκρίνιστη η επίδραση της ηλικίας στην απαντητικότητα στο στεροειδικό feedback. Παρά την απουσία της επίδρασης των οιστρογόνων στη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της GnRH (Gill et al., 2002b), η συνολική ποσότητα GnRH, εκκρινόμενη ως απάντηση στη χορήγηση οιστρογόνων, μειώθηκε, (όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση μίας ημιποσοτικής μεθόδου εκτίμησης της ποσότητας της ενδογενούς GnRH με τη χορήγηση μικρής δόσης GnRH ανταγωνιστή), υποδηλώνοντας ότι τα οιστρογόνα μειώνουν την ποσότητα της GnRH που εκκρίνεται σε κάθε ώση.

Αν και τα περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν πως ο υποθάλαμος κατά την εμμηνόπαυση είναι το κύριο σημείο για τον αρνητικό μηχανισμό αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης υπάρχουν κάποια δεδομένα για άμεση επίδραση στην υπόφυση του μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των ωοθηκικών στεροειδών (Gharib et al., 1990).

Η επίδραση της ηλικίας στον θετικό μηχανισμό των οιστρογόνων και της προγεστερόνης

Κατά την περίοδο της περιεμμηνόπαυσης παρατηρούνται υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης και αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η μεγαλύτερες γυναίκες με κανονική εμμηνορρυσία είναι λιγότερο ευαίσθητες στον θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, κάτι που επιβεβαιώνουν πειραματικά δεδομένα σε επίμυες (Wise et al., 1997). Έκφραση του παραπάνω φαινομένου αποτελεί η αποτυχία ωοθυλακιορρηξίας σε αρκετούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους περιεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Οι Van Look και συν. (1997) έδειξαν πως η ικανότητα της οιστραδιόλης να προκαλέσει ένα

κύμα LH είναι μειωμένη σε περιεμμηνόπαυσιακές γυναίκες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σ'αυτές τις γυναίκες το ποσοστό αύξησης της LH ως απάντηση στη χορήγηση μιας δόσης GnRH στην πρώιμη ωοθυλακική φάση είναι μειωμένο.

Κατά την εμμηνόπαυση, λόγω των πολύ χαμηλών κυκλοφορούντων επιπέδων οιστραδιόλης, ο θετικός μηχανισμός δεν είναι επίσης ενεργός. Ωστόσο παραμένει παλμική η έκκριση των FSH, LH και GnRH. Οι Νταφόπουλος και συν. (2004b) απέδειξαν πως η ευασθησία της υπόφυσης στη GnRH παρέμεινε αμετάβλητη κατά τη διάρκεια μιας εβδομάδας αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή συγκριτικά με τις προεγχειρητικές τιμές, όπως αυτή αξιολογήθηκε ως απάντηση σε 30min στη χορήγηση 10μg GnRH ενδοφλεβίως.

Σε ωοθηκεκτομηθέντες πιθήκους η εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης μπορεί να προκαλέσει ενδογενές κύμα της LH, του οποίου η έναρξη εξαρτάται από τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στον ορό καθώς και από τη διάρκεια της αύξησης τους (Karsch et al., 1973). Σε μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες η εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης προκαλεί ενδογενή κύματα της LH (Karande et al., 1990), τα οποία όμως εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό αύξησης του εύρους τους (1.6 - 4.6 φορές), ακόμη και με σύγχρονη χορήγηση προγεστερόνης, σε σχέση με το εμφανιζόμενο σε φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους (περίπου 10 φορές) (Kempers & Ryan, 1977). Επίσης η χορήγηση εξωγενώς οιστρογόνων σε μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες προκειμένου να επιτευχθούν επίπεδα παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται κατά την ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού εμμηνόρρυσιακού κύκλου,

προκάλεσε βαθμιαία αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH (Daforoulos et al., 2004a)

Ωστόσο στα πλαίσια της βιολογικής γήρανσης και της έκπτωσης των λειτουργιών των διαφόρων οργάνων, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί μια μεταβολή στην ευαισθησία απέναντι στα ωθητικά στεροειδή με την πάροδο των ετών (Messinis, 2006). Εξάλλου η προοδευτική μείωση των επιπέδων τόσο της LH όσο και της FSH στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ως αποτέλεσμα της ηλικίας, αποδεικνύει μια νευροενδοκρινική επίδραση της ηλικίας, πρόσθετη και ανεξάρτητη των μεταβολών στο ωθητικό επίπεδο. Το γεγονός ότι σε συνάρτηση με την ηλικία μειώνεται η απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH (Shaw et al., 2009) οδηγεί στην υπόθεση ότι η ενδεχόμενη άμβλυνση του κύματος της LH μετά από εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων μετεμμηνοπαυσιακά θα μπορούσε να αποτελεί μια ακόμη εκδήλωση την υποφυσιακής γήρανσης. Πρόσφατες μελέτες (Grams et al., 2010) έχουν δείξει μείωση του όγκου της υπόφυσης με την πρόοδο της ηλικίας στις γυναίκες αλλά παραμένει άγνωστο εάν αυτό αντανακλά στον αριθμό των γοναδοτρόφων κυττάρων, τη μορφομετρία τους ή τη λειτουργία τους ή ακόμη τη μειωμένη έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων και μεταβολές στα ενδοκυττάρια συστήματα σηματοδότησης.

Φαίνεται λοιπόν πως μετά την εμμηνόπαυση η απουσία του αρνητικού και θετικού μηχανισμού οφείλεται πρωτίστως σε ωθητική ανεπάρκεια ενώ μένει να διευκρινιστεί εάν και κατά πόσον η χρονολογική/μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία επιδρά στη ακεραιότητα του υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος και στην ικανότητά του να απαντάει στις αρνητικές και θετικές επιδράσεις των εξωγενών στεροειδών .

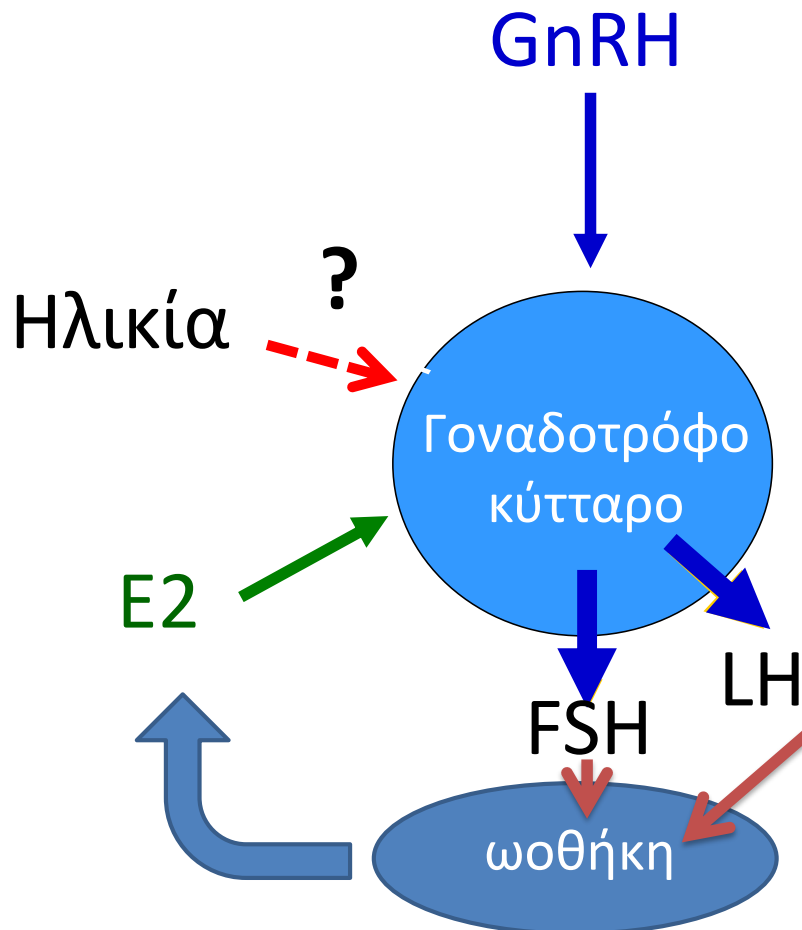
Αναπάντητα ερωτήματα

Μετεμμηνοπαυσιακή περίοδος

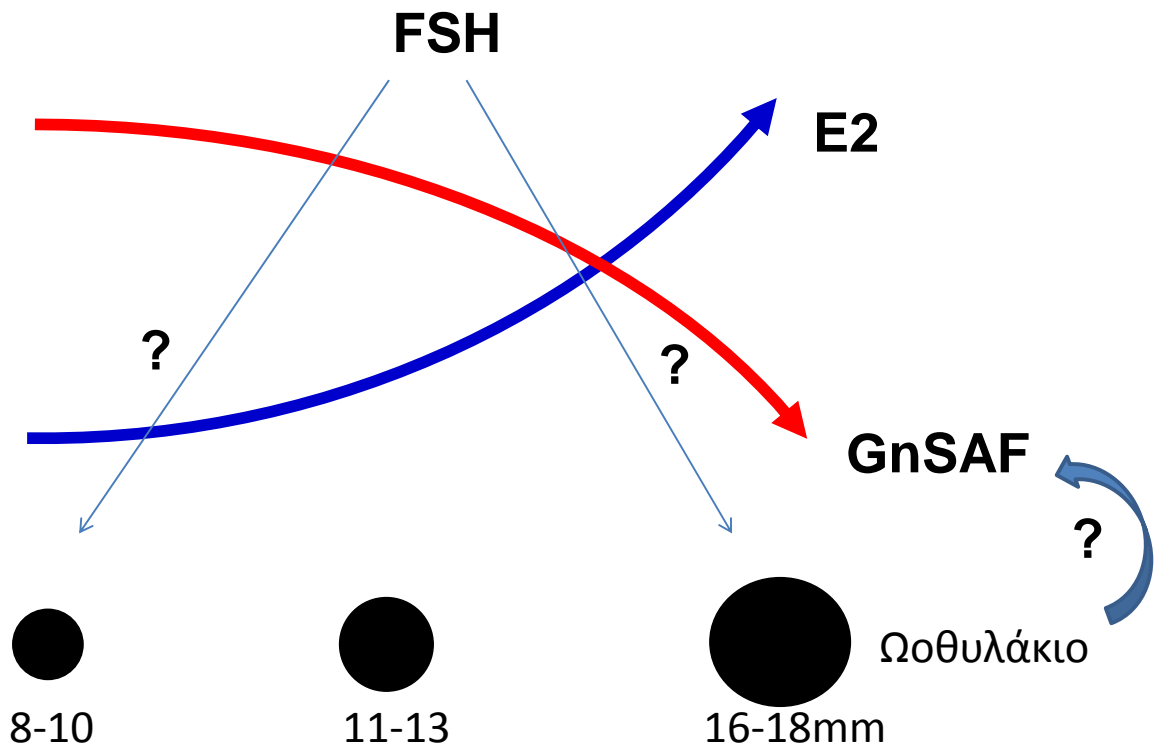
- Δεν έχει πλήρως διερευνηθεί εάν η ηλικία μετά την εμμηνόπαυση επηρεάζει τις ανασταλτικές και διεγερτικές επιδράσεις των στεροειδών ωοθηκικών ορμονών στις γοναδοτροφίνες.
- Δεν είναι γνωστό εάν η ηλικία μετά την εμμηνόπαυση επηρεάζει την υποφυσιακή απάντηση των γοναδοτρόφων κυττάρων στη διεγερτική επίδραση των οιστρογόνων (θετικός μηχανισμός).

Προεμμηνοπαυσιακή περίοδος

- Δεν είναι γνωστό εάν η ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH μετά την ωοθηκική διέγερση με εξωγενή FSH μεταβάλλεται κατά την όψιμη σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου.
- Με άλλα λόγια, δεν είναι γνωστό εάν η in vivo βιοδραστικότητα του GnSAF κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης προέρχεται από το επικρατές ωοθυλάκιο.



Σχήμα 2. Μηχανισμοί παλίνδρομης αλληλορύθμισης των οιστρογόνων στην υπόφυση. Δεν έχει πλήρως διερευνηθεί η επίδραση της ηλικίας μετά την εμμηνόπαυση στην λειτουργία του γοναδοτρόφου κυττάρου και τους μηχανισμούς feedback .



Σχήμα 3. Η παραγωγή GnSAF σε σχέση με την παραγωγή οιστραδιόλης (E2) κατά την ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου. Η υπόθεση της σταδιακά μειούμενης παραγωγής GnSAF κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου: Έλεγχος της βιοδραστικότητας του με τη χρήση της απάντησης της υπόφυσης στη GnRH μετά από χορήγηση FSH, ως *in vivo* βιολογικής μεθόδου (bioassay). (Από: Messinis et al., 2014; *Reprod Biomed Online* 28(6):714-722, τροποποιημένο).

Σκοπός της εργασίας

Μετά την παραπάνω αναφορά σε βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των ωοθηκικών στεροειδών καθώς επίσης και τη βιοδραστικότητα του GnSAF, η παρούσα εργασία έγινε προκειμένου να δοθούν απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα.

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

- Να διερευνήσει εάν η μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία μπορεί να επηρεάσει την υποφυσιακή απάντηση στην εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, ώστε να εξετασθεί εάν ο θετικός μηχανισμός feedback επηρεάζεται από την ηλικία μετά την εμμηνόπαυση.
- Να εξετάσει περαιτέρω την υπόθεση της παραγωγής του GnSAF κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου μέσω του ελέγχου της απάντησης της υπόφυσης στη GnRH στην αρχόμενη και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση μετά από χορήγηση FSH .

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γυναίκες

Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν σαράντα (40) εθελόντριες γυναίκες, μετά από κατάλληλη ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση. Τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από το Επιστημονικό συμβούλιο του Νοσοκομείου. Όλες οι γυναίκες ήταν υγιείς χωρίς παθολογικές καταστάσεις ή νοσήματα, για τα οποία να απαιτείται φαρμακευτική θεραπεία. Επίσης στις γυναίκες της μελέτης δεν υπήρχε αντένδειξη για τη λήψη ορμονικών σκευασμάτων και δεν λάμβαναν ορμονικά στεροειδή ή άλλα συναφή φάρμακα τουλάχιστον κατά το διάστημα των τελευταίων έξι μηνών πριν από την είσοδο στη μελέτη. Έγινε έλεγχος της θυρεοειδικής και επινεφριδικής λειτουργίας με αναλύσεις αίματος.

Η γυναίκες της μελέτης χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ως εξής :

Ομάδα Α

Η ομάδα αυτή περιέλαβε τριάντα (30) μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έως 80 ετών, οι οποίες διαιρέθηκαν σε τρεις υπο-ομάδες. Η πρώτη υπο-ομάδα (I) περιέλαβε 10 γυναίκες, οι οποίες βρίσκονταν 2 έως 8 έτη (4.6 (μέση τιμή (mean)) \pm 0.51 (σφάλμα μέσης τιμής (SEM)) από την εμμηνόπαυση. Η δεύτερη υπο-ομάδα (II) συμπεριέλαβε επίσης 10 γυναίκες, οι οποίες βρίσκονταν 9 έως και 17 έτη (11.65 (mean) \pm 0.67(SEM)) από την εμμηνόπαυση και η τρίτη (III) τις υπόλοιπες 10 γυναίκες, που βρίσκονταν 18 έως 25 έτη (21.3 (mean) \pm 0.81(SEM)) από την εμμηνόπαυση. Όλες οι γυναίκες είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (BMI) (υπο-ομάδα I: 25.9

(mean) \pm 0.69(SEM) kg/m², υπο-ομάδα II: 27.01(mean) \pm 0.68(SEM) kg/m² και υπο-ομάδα III: 27.5 (mean) \pm 2.08(SEM) kg/m² (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κλινικές και ορμονικές παράμετροι της ομάδας A των γυναικών της μελέτης πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών (ημέρα 1).

	Υπο-ομάδα I	Υπο-ομάδα II	Υπο-ομάδα III	
	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	P
Χρονολογική ηλικία (έτη)	53.8 \pm 0.55	58.60 \pm 1.08	71 \pm 1.23	0.000
Μετεμνηνοπαυσιακή ηλικία (έτη)	4.6 \pm 0.51	11.65 \pm 0.67	21.3 \pm 0.81	0.000
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)(kg/m²)	25.98 \pm 0.69	27.017 \pm 0.68	27.5 \pm 0.38	0.211
LH (mIU/ml)	50.97 \pm 1.61	29.06 \pm 3.22	27.61 \pm 2.08	0.000
FSH (mIU/ml)	94.2 \pm 8.60	63.84 \pm 7.67	61.51 \pm 6.91	0.010
Estradiol (pg/ml)	7.85 \pm 1.00	12.82 \pm 1.72	11.2 \pm 1.54	0.065

Ομάδα Β

Η ομάδα αυτή περιέλαβε δέκα (10) γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, ηλικίας 20-35 ετών (29 (mean) \pm 9.1(SEM)). Τα επίπεδα της προλακτίνης των γυναικών ήταν φυσιολογικά όπως επίσης και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI: 22.6 (mean) \pm 0.8(SEM) kg/m²).

Μεθοδολογία

Ομάδα Α

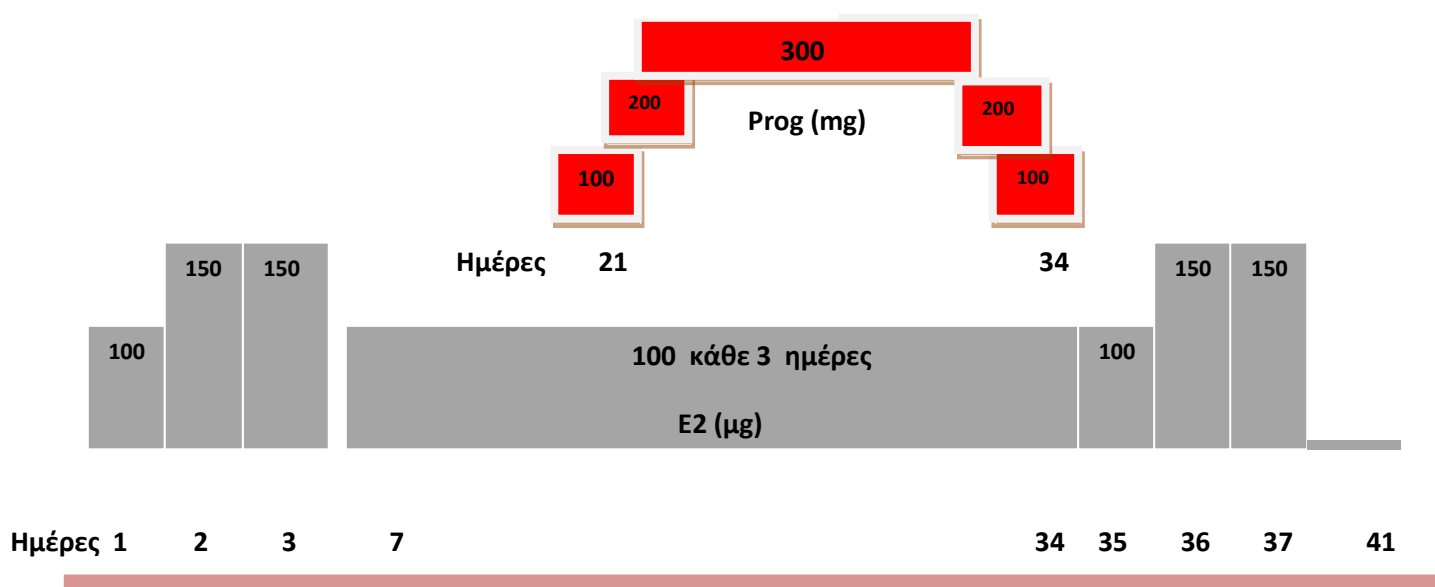
Οι γυναίκες και των τριών υπο-ομάδων υποβλήθηκαν δύο φορές στην ίδια οξεία πειραματική διαδικασία με μεσοδιάστημα ενός μηνός – πριν (Experiment Procedure 1 (EP1)) και μετά (Experiment Procedure 2 (EP2)) την αγωγή για 31 ημέρες με οιστραδιόλη, χορηγούμενης διαδερμικά στη δόση των 100 μ g (Dermestril transdermal therapeutic system, 100 μ g - 50 μ g estradiol hemihydrates, Faran, Greece) κάθε 3 ημέρες (ημέρες 4 - 34). Επιπλέον, στις γυναίκες χορηγήθηκε προγεστερόνη (Utrogestan capsules, 100mg, Faran, Greece) από το στόμα (ημέρες 21-34) σε δόση 100 mg στις ημέρες 21 και 34, 200 mg στις ημέρες 22 και 33 και 300 mg στις ημέρες 23 έως 32. Η οξεία πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τη χορήγηση οιστραδιόλης σε δόση 100 μ g τις ημέρες 1 και 35 και 150 μ g τις ημέρες 2, 3, 36 και 37 (Σχήμα 1).

Με στόχο τη διαπίστωση της εμφάνισης ενός κύματος της LH, έγινε η λήψη δειγμάτων αίματος από όλες τις γυναίκες κάθε 12 ώρες από τις ημέρες 1 έως 3 και 35 έως 37 (06:00h-18:00h) και κάθε 6 ώρες τις ημέρες 4 έως 7 και 38 έως 41 (06:00h-12:00h-18:00h-24:00h). Δείγματα αίματος λήφθηκαν επίσης

τις ημέρες 8, 13, 20, 21, 27 και 34. Σε όλα τα δείγματα αίματος, έγινε μέτρηση των FSH, LH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΟΜΑΔΑ Α



Σχήμα 1. Πρωτόκολλο πειραματικών διαδικασιών στην ομάδα Α. Δοσολογικό σχήμα χορήγησης οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (Prog). Η πειραματική διαδικασία της ομάδας Α συμπεριέλαβε τη χορήγηση E2 (διαδερμική χορήγηση) σε δόση 100 μg την ημέρα 1 και 150 μg τις ημέρες 2 και 3 και πάλι 100 μg την ημέρα 35 και 150 μg τις ημέρες 36 και 37. Επίσης στις ενδιάμεσες 31 ημέρες χορηγήθηκε E2 στη δόση των 100 μg κάθε 3 ημέρες (ημέρες 4-34). Επιπλέον στις γυναίκες χορηγήθηκε προγεστερόνη από το στόμα (ημέρες 21-34).

Ομάδα Β

Κάθε γυναίκα της ομάδας Β μελετήθηκε σε δύο διαφορετικούς φυσιολογικούς κύκλους ως ακολούθως:

Κύκλος 1:

Στον κύκλο αυτό πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες πειραματικές διαδικασίες, που θα περιγραφούν στον κύκλο 2 . Αντί της FSH χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (saline) 2 ml υποδορίως.

Κύκλος 2:

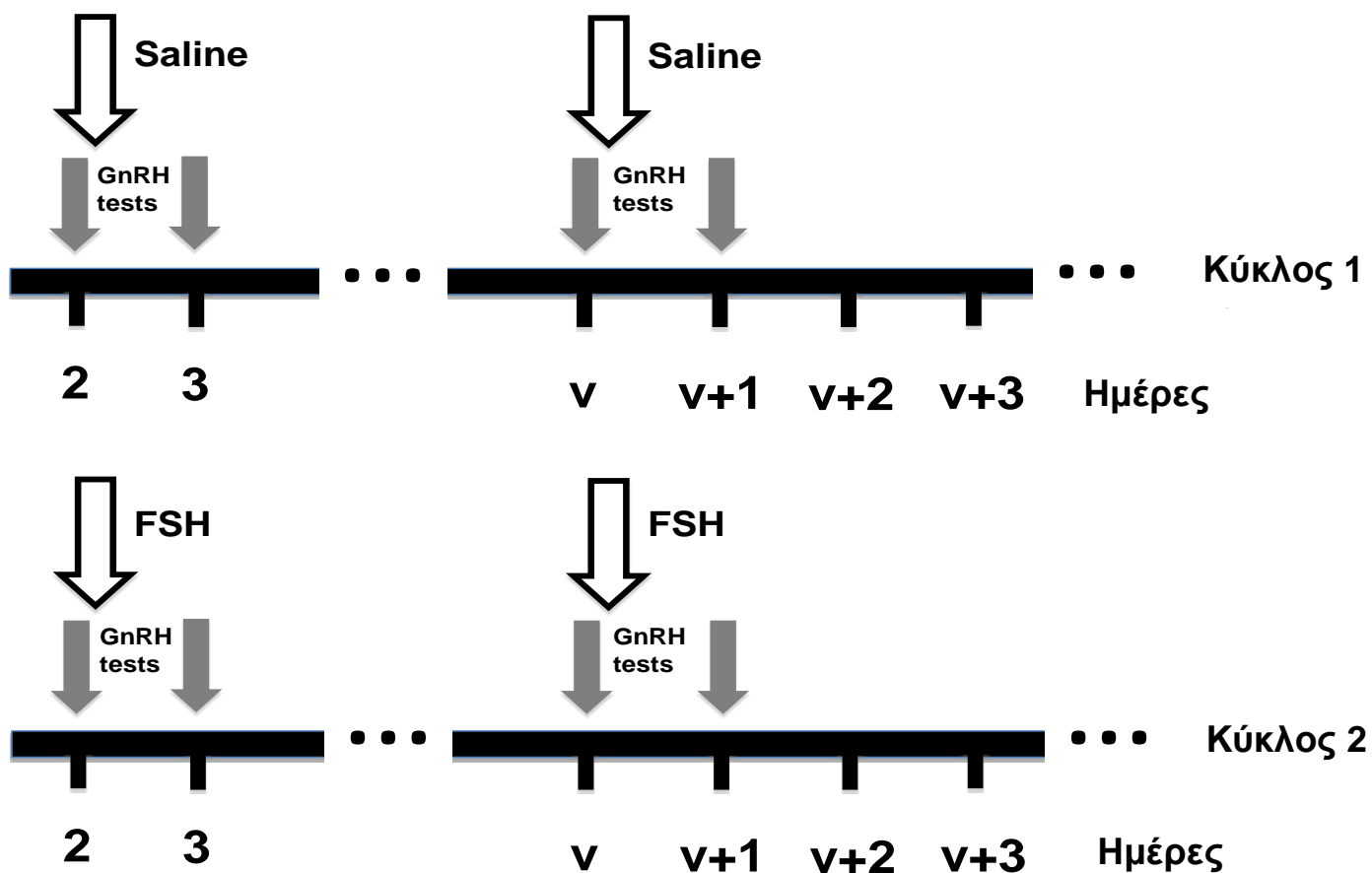
Την ημέρα 2 του κύκλου (0900h),στις γυναίκες τοποθετήθηκε ενδοφλέβιος καθετήρας και λήφθηκαν δύο δείγματα αίματος (5-7ml) με μεσοδιάστημα 15 λεπτών. Στη συνέχεια χορηγήθηκε GnRH (Relefact LH-RH, 0.1 mg/ml, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) ενδοφλεβίως στη δόση των 10 µg και λήφθηκε εκ νέου δείγμα αίματος στα 30 λεπτά μετά τη χορήγηση GnRH. Μετά το τέλος της πειραματικής αυτής διαδικασίας, στις γυναίκες χορηγήθηκε FSH σε εφάπαξ δόση 450 IU υποδορίως. Η FSH ήταν ανασυνδυασμένη (Puregon 150 IU, MSD, Athens, Greece). Την ημέρα 3, δηλαδή 24 ώρες μετά τη χορήγηση της FSH επαναλήφθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία GnRH, όπως την ημέρα 2. Κατόπιν, οι γυναίκες παρακολουθούνταν υπερηχογραφικά αρχίζοντας από την ημέρα 7 του κύκλου ανά μία ή δύο ημέρες για την εκτίμηση του μεγέθους του ωοθυλακίου. Όταν το ωοθυλάκιο έφτασε το μέγεθος των 16-17 mm (ημέρα ν), επαναλήφθηκε η πειραματική διαδικασία, που περιγράφηκε την ημέρα 2 (0900h), δηλαδή στις γυναίκες χορηγήθηκε

GnRH 10 µg, όπως ήδη αναφέρθηκε και μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας χορηγήθηκε εκ νέου μια δόση FSH 450 IU υποδορίως. Η πειραματική διαδικασία GnRH επαναλήφθηκε 24 ώρες αργότερα, δηλαδή την επομένη το πρωί (ημέρα n+1) (Σχήμα 2).

Δείγματα αίματος σε κάθε πειραματική διαδικασία GnRH, λήφθηκαν όπως αναφέρθηκε στους χρόνους -15, 0 (ένεση GnRH) και 30 λεπτά. Και στους δύο κύκλους, μετά το τέλος των πειραματικών διαδικασιών από όλες τις γυναίκες λήφθηκαν δείγματα αίματος σε καθημερινή βάση για τις επόμενες 4 ημέρες, ενώ ελέγχθηκε υπερηχογραφικά η ωοθυλακιορρηξία. Επτά ημέρες μετά την ωοθυλακιορρηξία λήφθηκε ένα δείγμα αίματος και στους δύο κύκλους. Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 15 λεπτά και ο ορός αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την μέτρηση FSH, LH οιστραδιόλης, προγεστερόνης και ινχιμπίνης Β. Η απάντηση της υπόφυσης στη GnRH μετρήθηκε ως η καθαρή αύξηση πάνω από τη βασική τιμή της LH στα 30 λεπτά (ΔLH).

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΟΜΑΔΑ Β



Σχήμα 2. Πρωτόκολλο πειραματικών διαδικασιών στην ομάδα Β. Στον κύκλο 1, χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (saline) (2 ml)) υποδορίως τις ημέρες 2 και v (ημέρα, κατά την οποία το κυρίαρχο ωοθυλάκιο έφτασε στο μέγεθος των 16-17 mm), αμέσως μετά τη ολοκλήρωση ενός GnRH τεστ (μια δόση i.v. των 10 µg). Στον κύκλο 2, χορηγήθηκαν 450 IU ανασυνδυασμένης FSH τις ημέρες 2 και v, αμέσως μετά την ολοκλήρωση ενός GnRH τεστ. GnRH τεστ πραγματοποιήθηκε και τις ημέρες 3 και v+1. Δείγματα αίματος σε σχέση με τη χορήγηση GnRH (χρόνος 0) λήφθηκαν στα -15, 0 και 30 λεπτά. Δείγματα αίματος λήφθηκαν επίσης στις ημέρες v+2 και v+3.

ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Οι FSH, LH, οιστραδιόλη και προγεστερόνη μετρήθηκαν στον ορό του αίματος χρησιμοποιώντας Μικροσωματιδιακή Ανοσολογική Μέθοδο με Ηλεκτρο –Χημειοφωταύγεια (Electrochemiluminescence Immunoassays “ECLIA” (Elecsys 1010/2010 and Modular Analytics E170; Roche Diagnostics). Η ινχιμπίνη Β μετρήθηκε σε δείγματα αίματος με τη χρήση μιας Μικροσωματιδιακής Ανοσοενζυμικής Μεθόδου (an enzyme-linked immunosorbent assay (DE10-84100 Inhibin B Enzyme-Linked Immunosorbent) (ELISA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mIU/ml για τις FSH και LH, σε pg/ml για την οιστραδιόλη, σε ng/ml για την προγεστερόνη και σε pg/ml για την ινχιμπίνη Β. Τα κατώτερα επίπεδα ανίχνευσης για την FSH, LH, οιστραδιόλη, προγεστερόνη και ινχιμπίνη Β ήταν 0.1 IU/l, 0.1 IU/l, 5 pg/ml, 0.03 ng/ml και 7 pg/ml αντίστοιχα. Η διακύμανση μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων και μέσα στην ίδια μέτρηση ήταν 3.1 και 3.4%, 2.0 και 3.4%, 4.5 και 6.0%, 6.0 και 6.7% και 7.2 και 5.6% αντιστοίχως.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι τιμές των ορμονών παρουσίαζαν κανονική κατανομή (one sample Kolmogorov-Smirnov test). Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με paired t-test και one-way analysis of variance (ANOVA), που ακολουθήθηκε από Benferroni post hoc testing. Οι τιμές όλες εκφράζονται ως mean \pm SEM. Το Students-t-test χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθεί η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve (AUC)) για την LH μεταξύ των υπο-ομάδων I και II. Το α -επίπεδο 0.05 θεωρήθηκε ότι έδειχνε στατιστική σημαντικότητα. Το στατιστικό πακέτο λογισμικού, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν SPSS 17.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ομάδα Α

Μελέτη του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης μετεμηνοπαυσιακών γυναικών

Οι βασικές συγκεντρώσεις ορού FSH και LH πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών ήταν αυξημένες στις τρεις υπο-ομάδες γυναικών αλλά ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην υπο-ομάδα II (63.9 ± 7.6 mIU/ml και 29 ± 3.2 mIU/ml, αντιστοίχως) και στην υπο-ομάδα III (61.5 ± 6.9 mIU/ml και 27.6 ± 2 mIU/ml, αντιστοίχως) σε σύγκριση με την υπο-ομάδα I (94.2 ± 8.6 mIU/ml και 50.9 ± 1.1 mIU/ml, αντίστοιχα) (LH: $P < 0.001$, FSH: $P < 0.05$) (Πίνακας 1).

Ως αποτέλεσμα της χορήγησης οιστραδιόλης οι συγκεντρώσεις ορού της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά και στις δύο οξείες πειραματικές διαδικασίες (experimental procedures (EP1 and EP2)) σε όλες τις υπο-ομάδες από τις ημέρες 1 έως 4 και 35 έως 38 και μειώθηκαν βαθμιαία εφεξής ($P < 0.001$) (Σχήματα 3, 4). Οι τιμές ορού της προγεστερόνης ήταν χαμηλές τις ημέρες 1 έως 8 και σημαντικά υψηλότερες τις ημέρες 35 ($P < 0.001$), παρουσιάζοντας σημαντική μείωση στο εξής έως την ημέρα 41 (Σχήματα 3, 4).

Στην πειραματική διαδικασία 1 (EP1) οι τιμές ορού των LH και FSH μειώθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση οιστραδιόλης (Σχήματα 5, 6). Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με τις βασικές τιμές (υπο-ομάδα I : 50.9 ± 1.6 mIU/ml, υπο-ομάδα II : 29.06 ± 3.2 mIU/ml, υπο-ομάδα III : 27.6 ± 2.08 mIU/ml) οι τιμές ορού της LH μειώθηκαν σημαντικά ($P < 0.05$) φτάνοντας στα

χαμηλότερα επίπεδα σε όλες τις υπο-ομάδες (υπο-ομάδα I : 21.6 ± 3.7 mIU/ml ($P < 0.001$), υπο-ομάδα II : 20.4 ± 0.9 mIU/ml ($P < 0.05$), υπο-ομάδα III: 20.4 ± 2.3 mIU/ml ($P < 0.001$) σε 24 ώρες. Ομοίως, υπήρξε μια σημαντική μείωση ($P < 0.05$) στις βασικές τιμές της FSH από 94.2 ± 8.6 mIU/ml στην υπο-ομάδα I , 63.9 ± 7.6 mIU/ml στην υπο-ομάδα II και 61.5 ± 6.9 mIU/ml στην υπο-ομάδα III σε 50.2 ± 9.8 mIU/ml ($P < 0.001$), 57.6 ± 6.3 mIU/ml ($P < 0.05$) και 53.7 ± 7.2 mIU/ml ($P < 0.05$) αντιστοίχως στις 24 ώρες.

Στην EP2, οι τιμές οιστραδιόλης βρισκόταν πάνω από το επίπεδο των 100 pg/ml. Κατά τη διαδικασία αυτή οι τιμές ορού της LH και FSH δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές και διατηρήθηκαν κατά μέσω όρο κάτω από τα 20 mIU/ml (Σχήματα 7, 8).

Μετά την καταστολή των συγκεντρώσεων των LH και FSH, στις υπο-ομάδες I και II, ένα κύμα της LH πραγματοποιήθηκε, ως αποτέλεσμα του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης των οιστρογόνων και στις δύο πειραματικές διαδικασίες. Στα Σχήματα 9 και 10 όλες οι τιμές των ορμονών παρίστανται σε σχέση με τη μέγιστη τιμή (peak) της LH (χρόνος 0). Οι μέγιστες τιμές (peak) του κύματος LH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην υπο-ομάδα I, σε σχέση με την υπο-ομάδα II και στις δύο πειραματικές διαδικασίες ($P < 0.05$). Στην EP2 οι μέγιστες τιμές (peak) του κύματος της LH ήταν σημαντικά μειωμένες και στις δύο υπο-ομάδες I και II (32.8 ± 1.91 mIU/ml και 18.8 ± 1.2 mIU/ml αντιστοίχως, $P < 0.05$) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του κύματος LH στην EP1 (53.7 ± 4.3 mIU/ml και 40.3 ± 2.6 mIU/ml αντίστοιχα, $P < 0.001$). Η καθαρή αύξηση στις τιμές της LH κατά τη διάρκεια του κύματος (από την έναρξη έως την μέγιστη τιμή) ήταν σημαντικά υψηλότερη στην υπο-ομάδα I σε σύγκριση με την υπο-ομάδα II ,τόσο στην EP1 (24.5 ± 5.4 vs 13.7

± 2.5 mIU/ml, $P < 0.05$) όσο και στην EP2 (19.5 ± 0.7 vs 9.3 ± 0.8 mIU/ml, $P < 0.001$) (Σχήμα 9, 10). Η πρώτη τιμή που ξεπερνούσε το 180% της μέσης τιμής των προηγούμενων 4 δειγμάτων θεωρήθηκε ότι υποδείκνυε ότι το κύμα της LH είχε αρχίσει και ο χρόνος του προηγούμενου δείγματος θεωρήθηκε ως το χρονικό σημείο της έναρξης του κύματος (Messinis et al., 1985).

Οι τιμές LH διέφεραν σημαντικά μεταξύ των υπο-ομάδων I και II στα χρονικά σημεία -6, 0, and +12 ώρες στην EP1 και στα χρονικά σημεία -24, -18, -12, -6, 0, και 6 ώρες στην EP2 ($P < 0.05$) (Σχήματα 9, 10). Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ της EP1 και EP2 ($P < 0.05$), σε όλα τα χρονικά σημεία εκτός από το +36 ώρες για την υπο-ομάδα I και σε όλα τα χρονικά σημεία ($P < 0.05$) εκτός από +30 και +36 ώρες για την υπο-ομάδα II.

Όταν μετρήθηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) για τις συγκεντρώσεις της LH, παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στην υπο-ομάδα I και στην υπο-ομάδα II. Συγκεκριμένα η περιοχή κάτω από την καμπύλη για τις τιμές της LH ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην υπο-ομάδα II από την υπο-ομάδα I τόσο στην EP1 (224.8 ± 12.4 vs 169.7 ± 11.8 mIU/ml/36h, $P < 0.05$) όσο και στην EP2 (142.9 ± 9.6 vs 78.2 ± 7.6 mIU/ml/36h, $P < 0.001$).

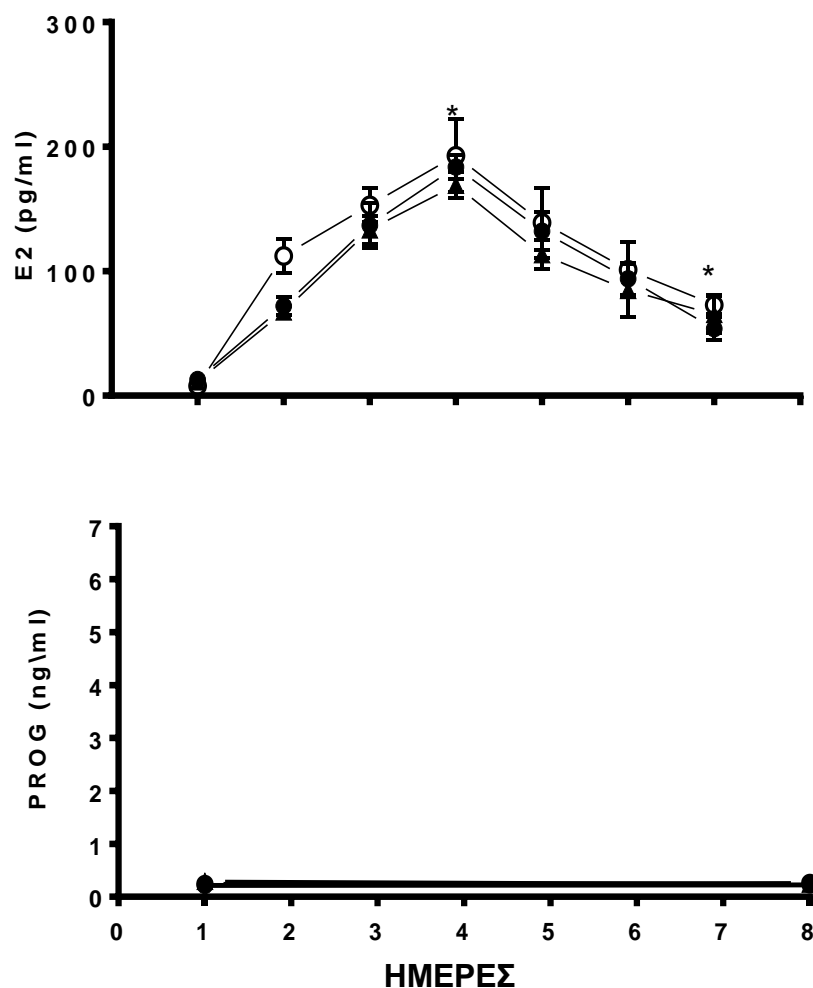
Μετά την αρχική καταστολή, οι τιμές της FSH παρουσίασαν κύμα, εντούτοις αυτό ήταν λιγότερο σαφές σε σχέση με αυτό της LH. Οι μέγιστες τιμές του κύματος της FSH διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο υπο-ομάδων ($P < 0.05$) (Σχήματα 9, 10).

Αν και οι τιμές ορού της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά και στις δύο πειραματικές διαδικασίες (Σχήματα 11, 13), μετά τη χορήγηση οιστρογόνων,

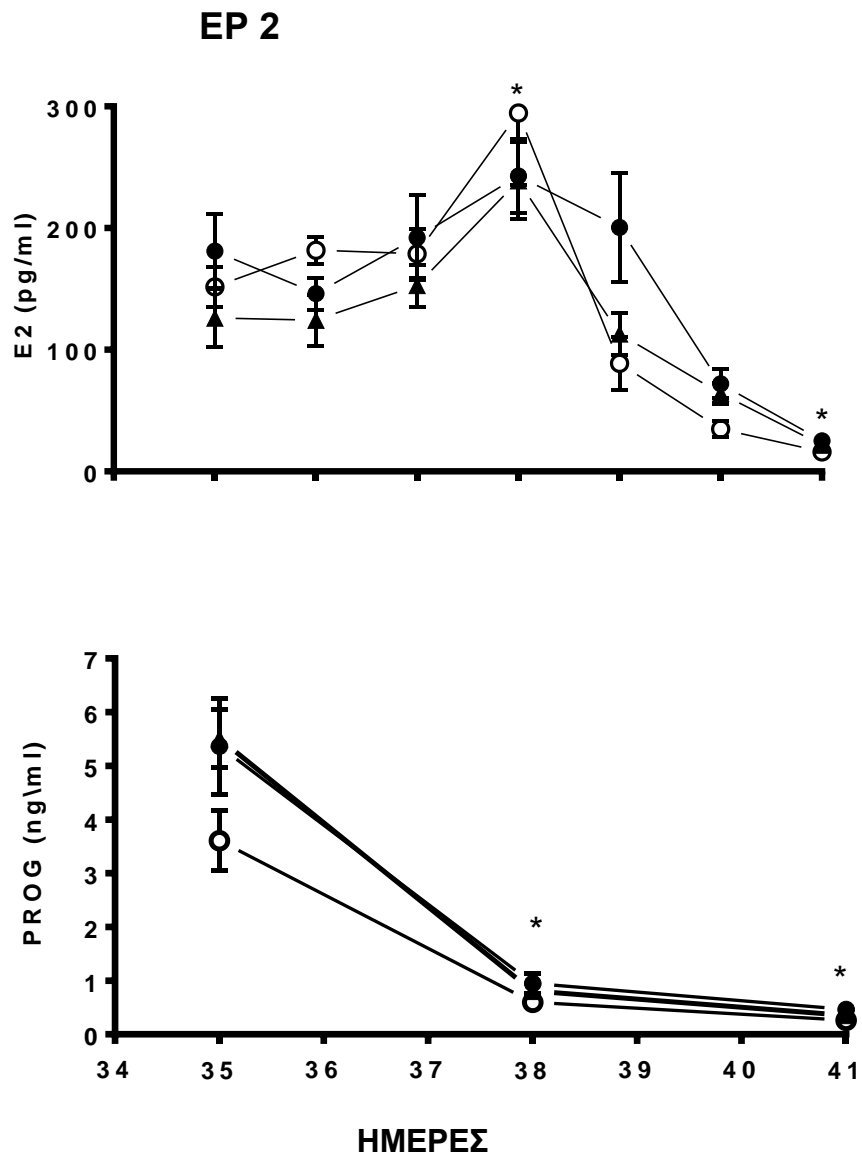
καμία γυναίκα στην υπο-ομάδα III δεν παρουσίασε κύμα της LH (Σχήματα 12-14).

Όλες οι γυναίκες παρουσίασαν κολπική αιμόρροια 3 ημέρες μετά τη διακοπή της χορήγησης της προγεστερόνης.

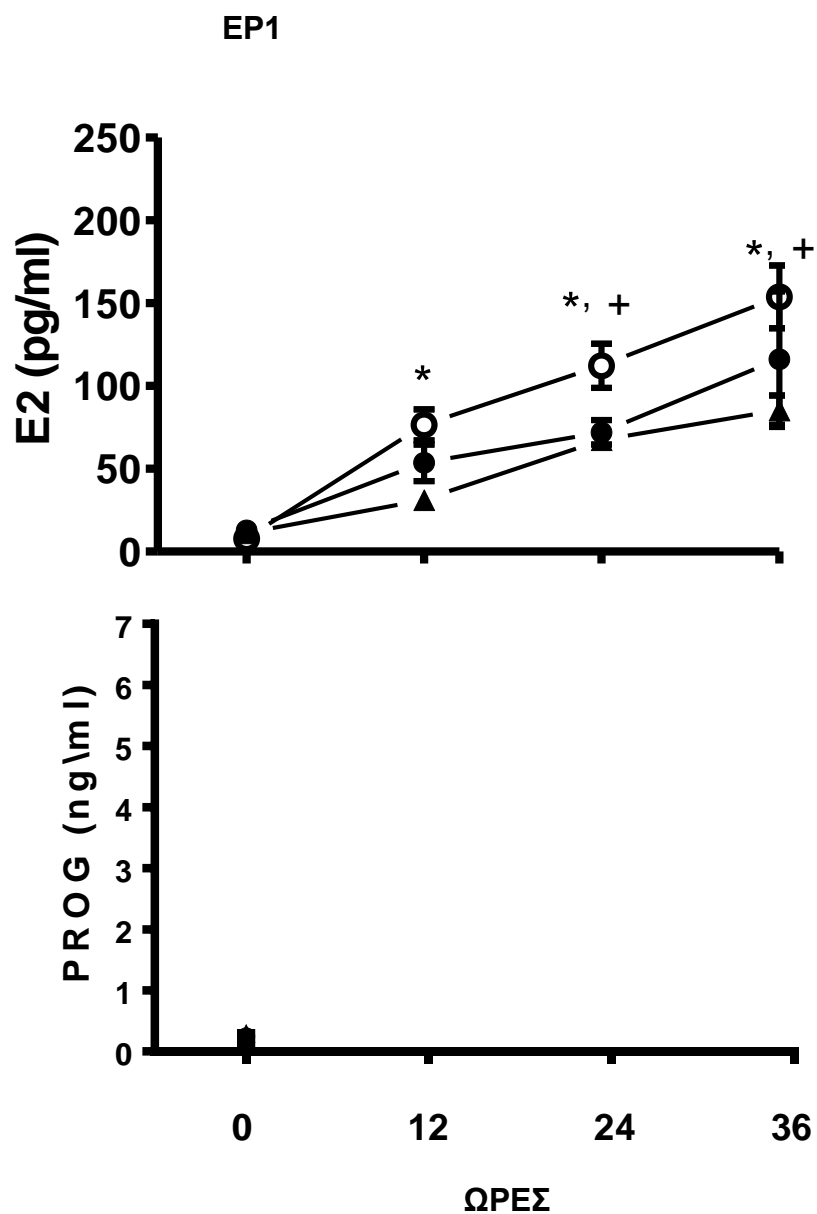
EP 1



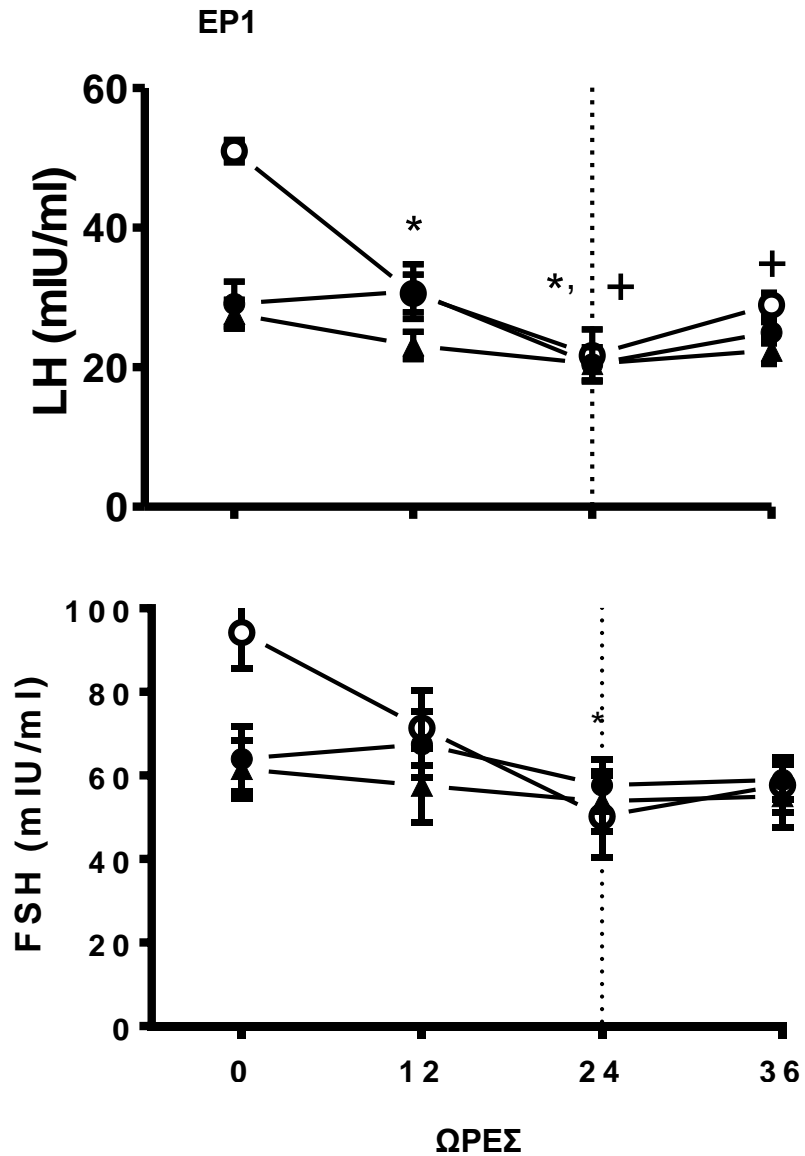
Σχήμα 3. Οι συγκεντρώσεις ορού (mean \pm SEM) της οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PROG) μετά την εξωγενή χορήγηση αυτών των στεροειδών στην (\circ) υπο-ομάδα I, (\bullet) υπο-ομάδα II και (\blacktriangle) υποομάδα III, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας 1 (experimental procedure (EP1)). * $P < 0.001$ (στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών 4 και 1).



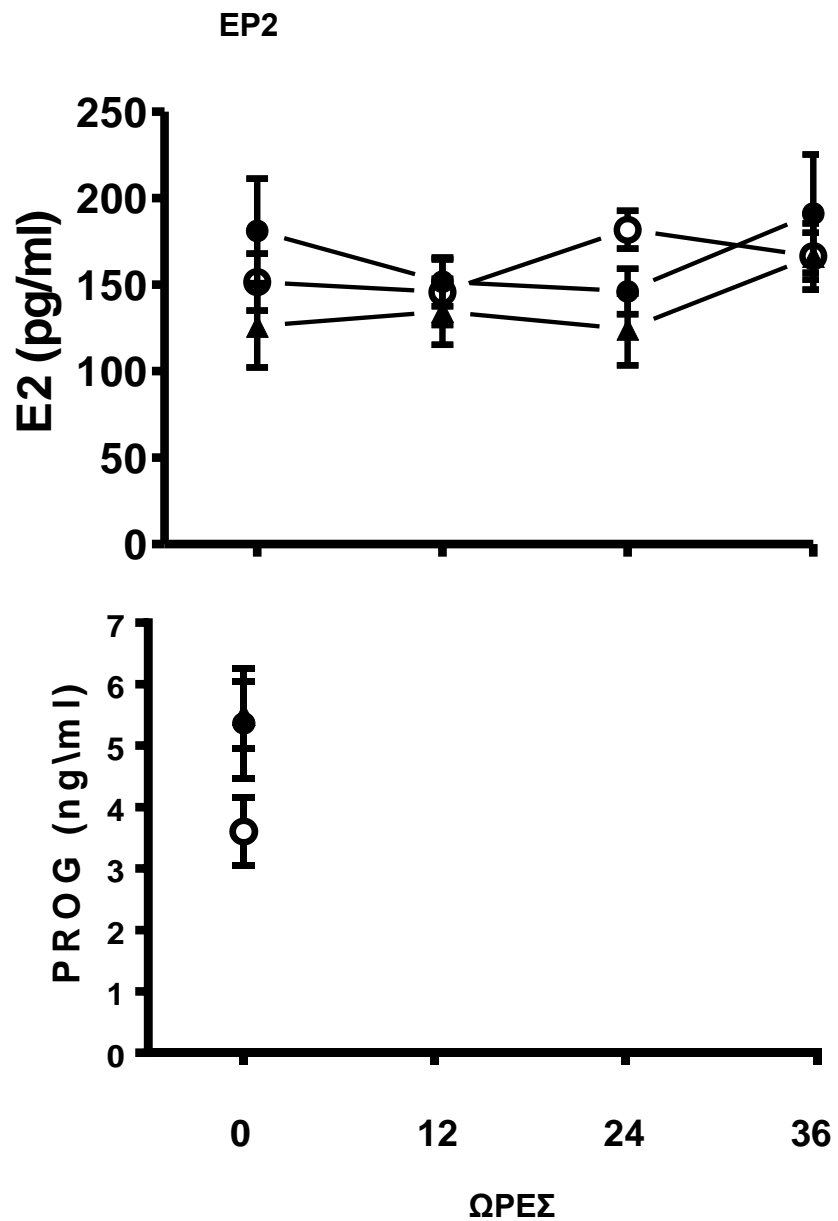
Σχήμα 4. Οι συγκεντρώσεις ορού (mean \pm SEM) της οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PROG) μετά την εξωγενή χορήγηση αυτών των στεροειδών στην (○) υπο-ομάδα I, (●) υπο-ομάδα II και (▲) υποομάδα III, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας 2 (experimental procedure (EP2)). * $P < 0.001$ (στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών 38 και 35 και μεταξύ των ημερών 38 και 41).



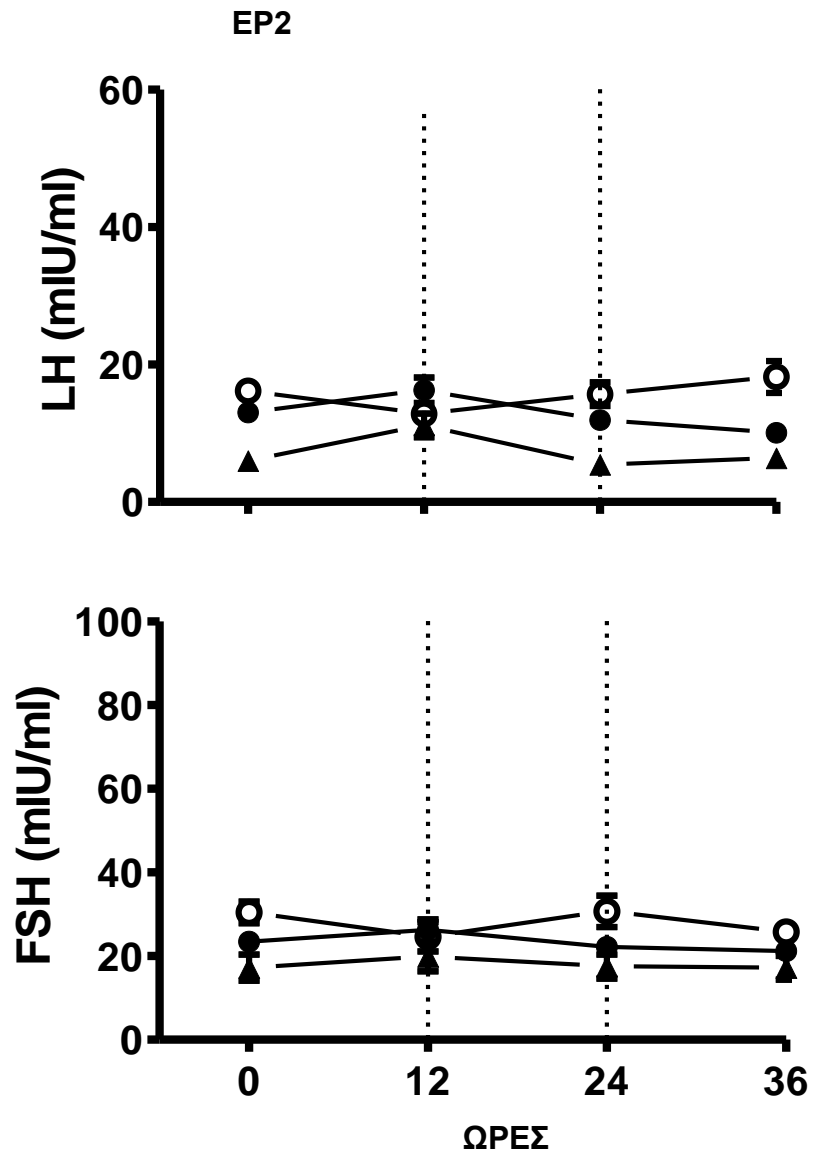
Σχήμα 5. Η επίδραση τη εξωγενούς χορήγησης οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (PROG) στην (○) υπο-ομάδα I, (●) υπο-ομάδα II και (▲) υπο-ομάδα III in EP1 . * $P < 0.001$, + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από το χρονικό σημείο 0 ώρες).



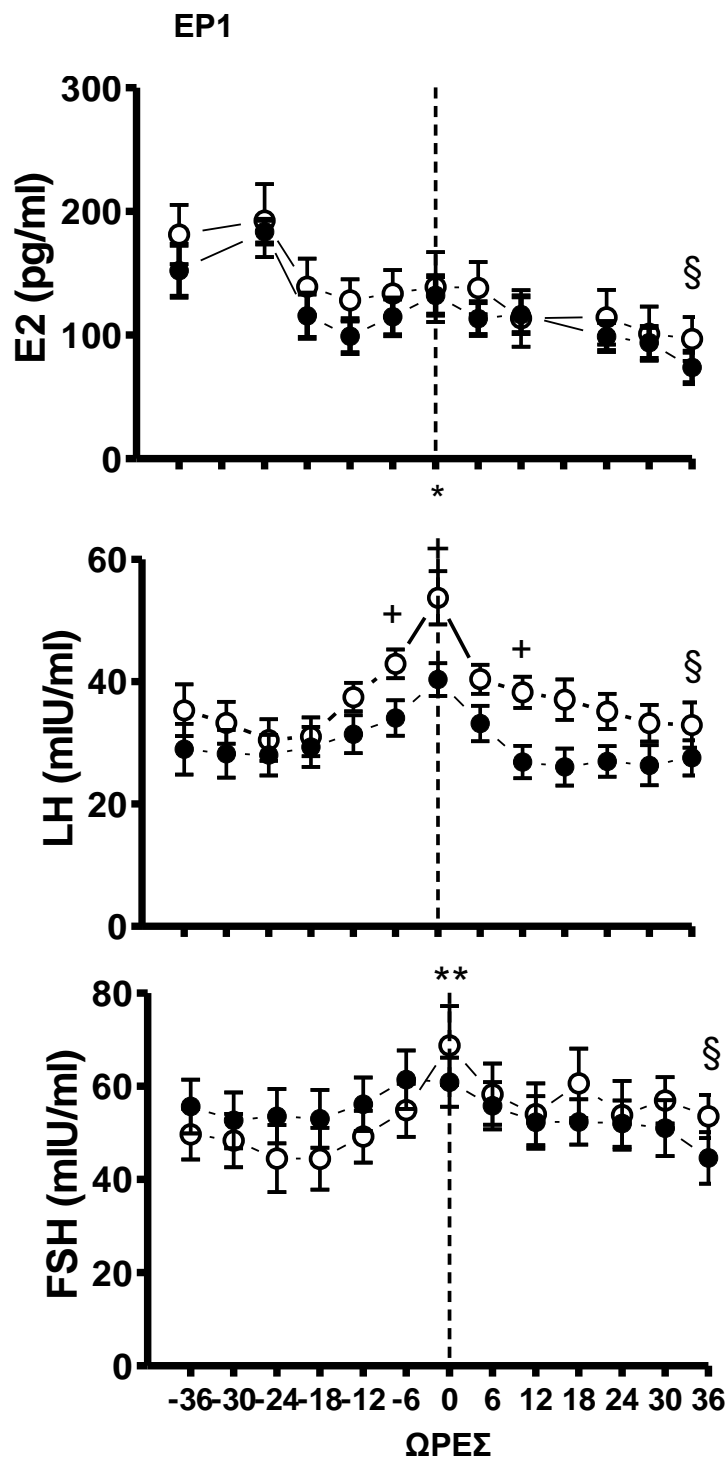
Σχήμα 6. Η επίδραση τη εξωγενούς χορήγησης οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (PROG) αναφορικά με την LH και FSH στην (○) υπο-ομάδα I, (●) υπο-ομάδα II και (▲) υπο-ομάδα III in EP1 . * $P < 0.001$, + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από το χρονικό σημείο 0 ώρες).



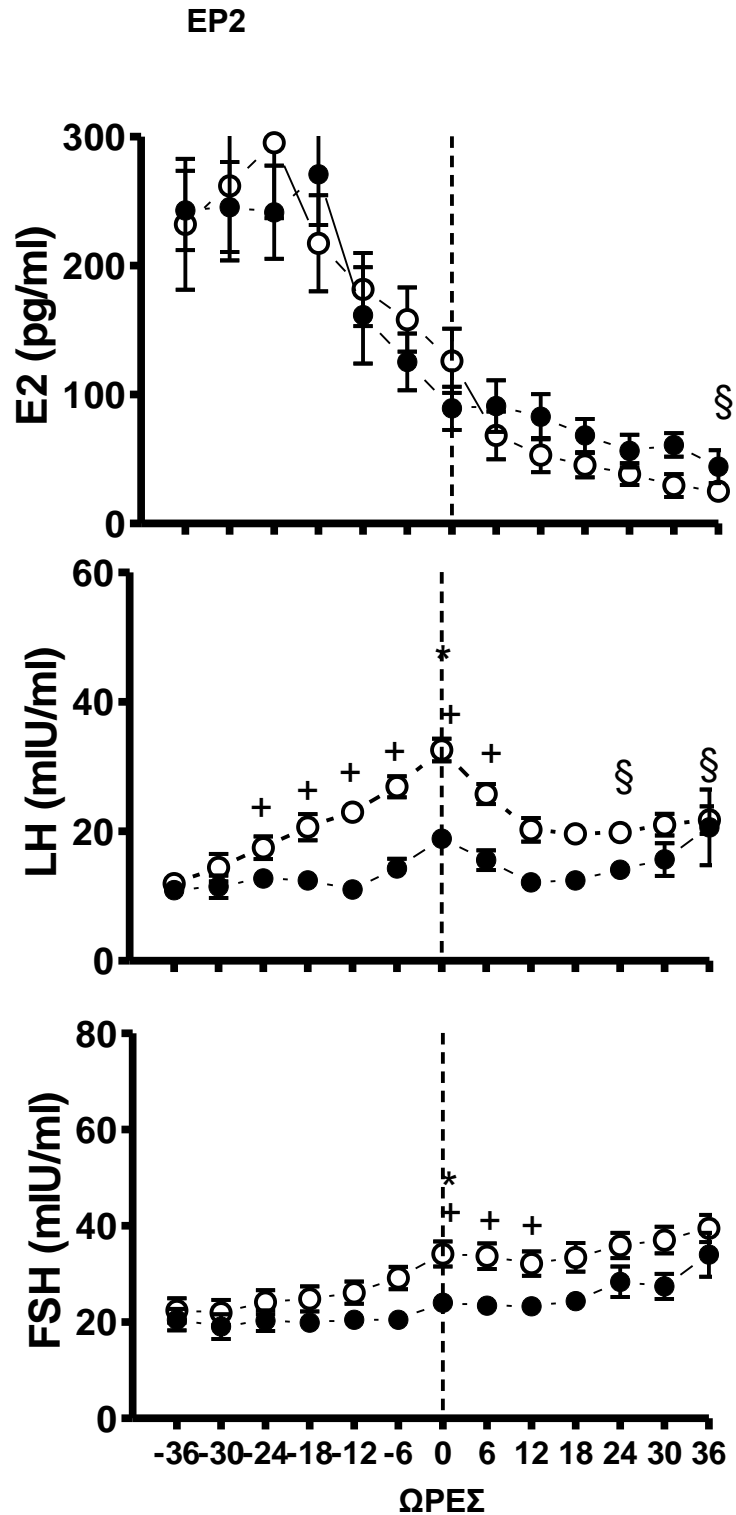
Σχήμα 7. Η επίδραση τη εξωγενούς χορήγησης οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (PROG) στην (○) υπο-ομάδα I, (●) υπο-ομάδα II και (▲) υπο-ομάδα III in EP2 .



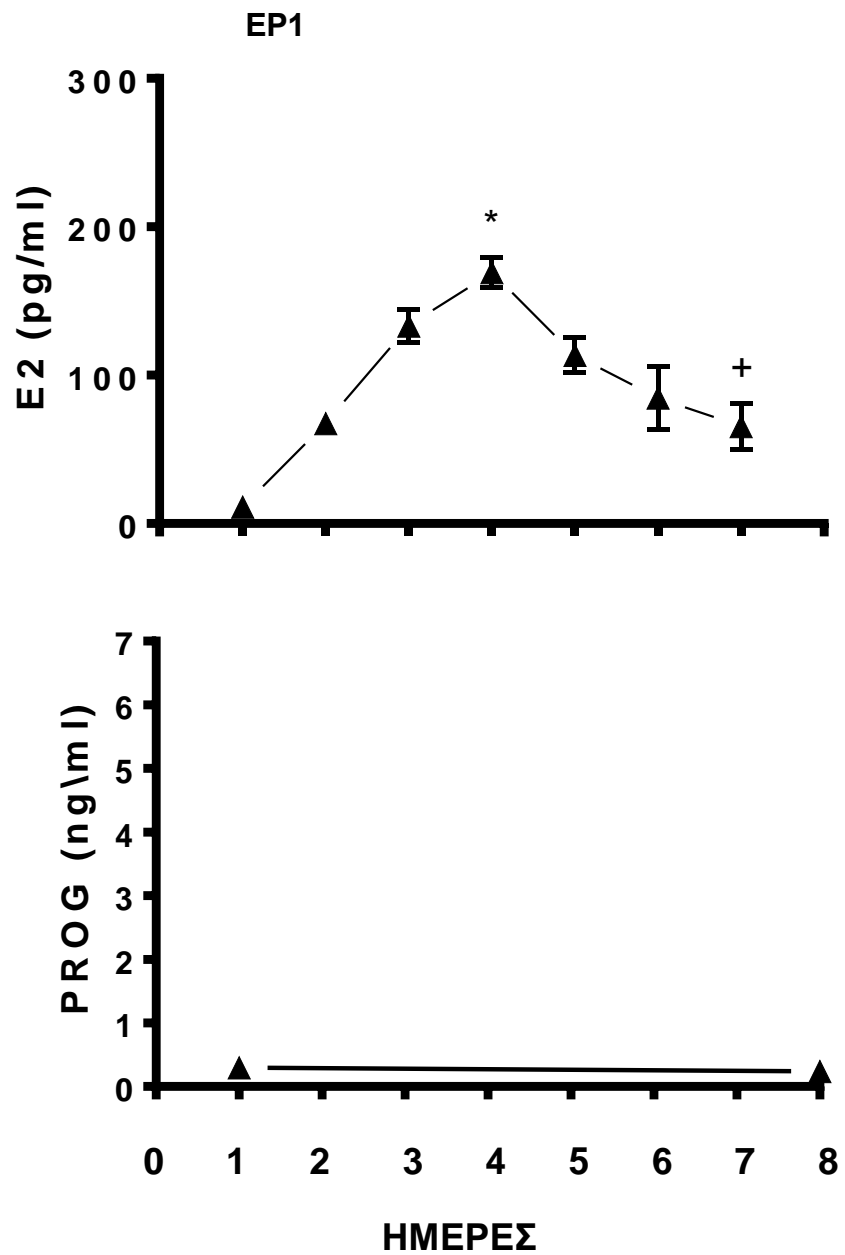
Σχήμα 8. Η επίδραση τη εξωγενούς χορήγησης οιστραδιόλης (E2) και προγεστερόνης (PROG) αναφορικά με την LH και FSH στην (○) υπο-ομάδα I, (●) υπο-ομάδα II and (▲) υπο-ομάδα III in EP2 .



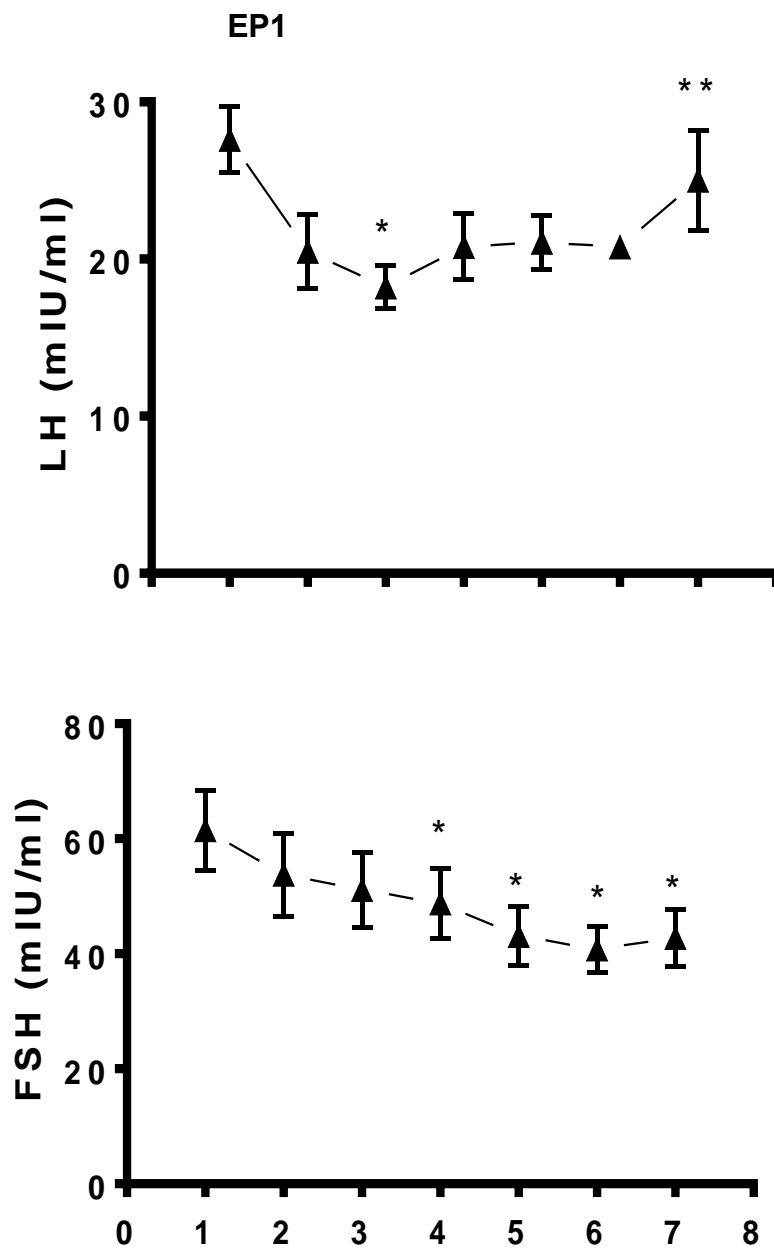
Σχήμα 9. Οι τιμές ορού (mean ± SEM) της οιστραδιόλης (E2), της LH και της FSH στην (○) υπο-ομάδα I, και (●) υπο-ομάδα II στην EP1. * $P < 0.001$, ** $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την έναρξη του κύματος), § $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από τις κορυφαίες τιμές), + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο υπο-ομάδες). Οι τιμές παρίστανται σε σχέση με τη μέγιστη τιμή (peak) της LH.



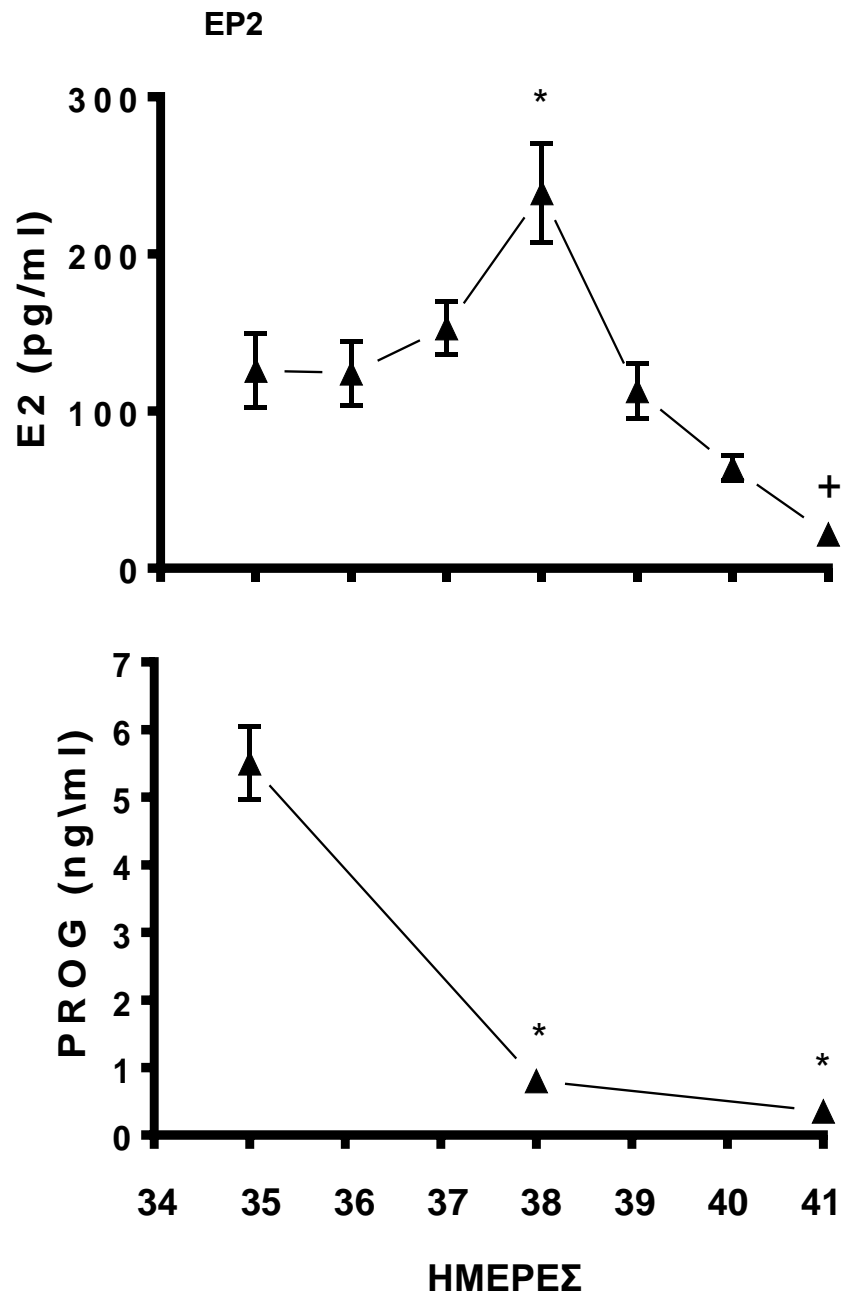
Σχήμα 10. Οι τιμές ορού (mean ± SEM) της οιστραδιόλης (E2), της LH και της FSH στην (○) υπο-ομάδα I, και (●) υπο-ομάδα II στην EP2. * $P < 0.001$, (στατιστικά σημαντική διαφορά από την έναρξη του κύματος), § $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από τις κορυφαίες τιμές), + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο υπο-ομάδες). Οι τιμές παρίστανται σε σχέση με τη μέγιστη τιμή (peak) της LH.



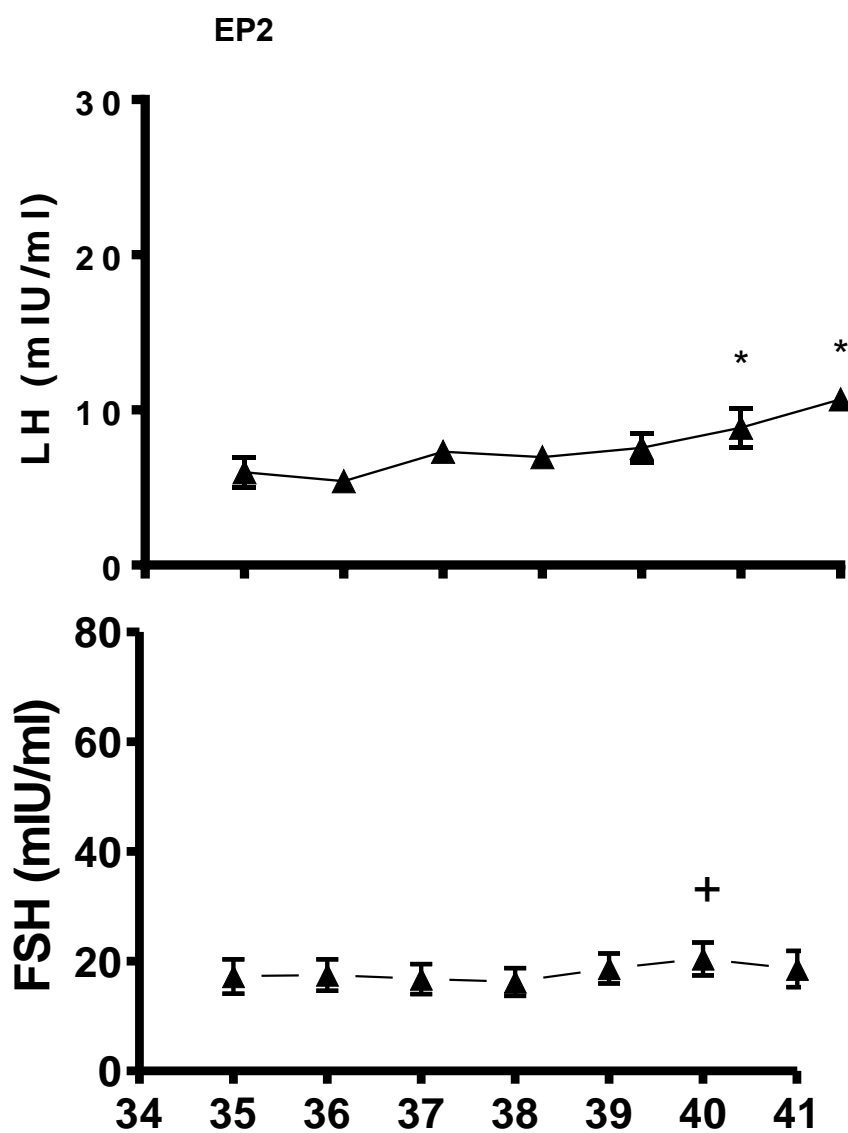
Σχήμα 11. Οι τιμές ορού (mean \pm SEM) της οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PROG) στην υπο-ομάδα III στην EP1 : * $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 1), + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 4).



Σχήμα 12. Οι τιμές ορού (mean \pm SEM) της LH και της FSH στην υπο-ομάδα III στην EP1 : * $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 1), ** $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 3) .



Σχήμα 13. Οι τιμές ορού (mean \pm SEM) της οιστραδιόλης (E2) και της προγεστερόνης (PROG) στην υπο-ομάδα III στην EP2 : * $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 35), + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 38).



Σχήμα 14. Οι τιμές ορού (mean ± SEM) της LH και της FSH στην υπο-ομάδα III στην EP2 : * $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 35), + $P < 0.05$ (στατιστικά σημαντική διαφορά από την ημέρα 38).

Ομάδα Β

Μελέτη του ρόλου του GnSAF κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου

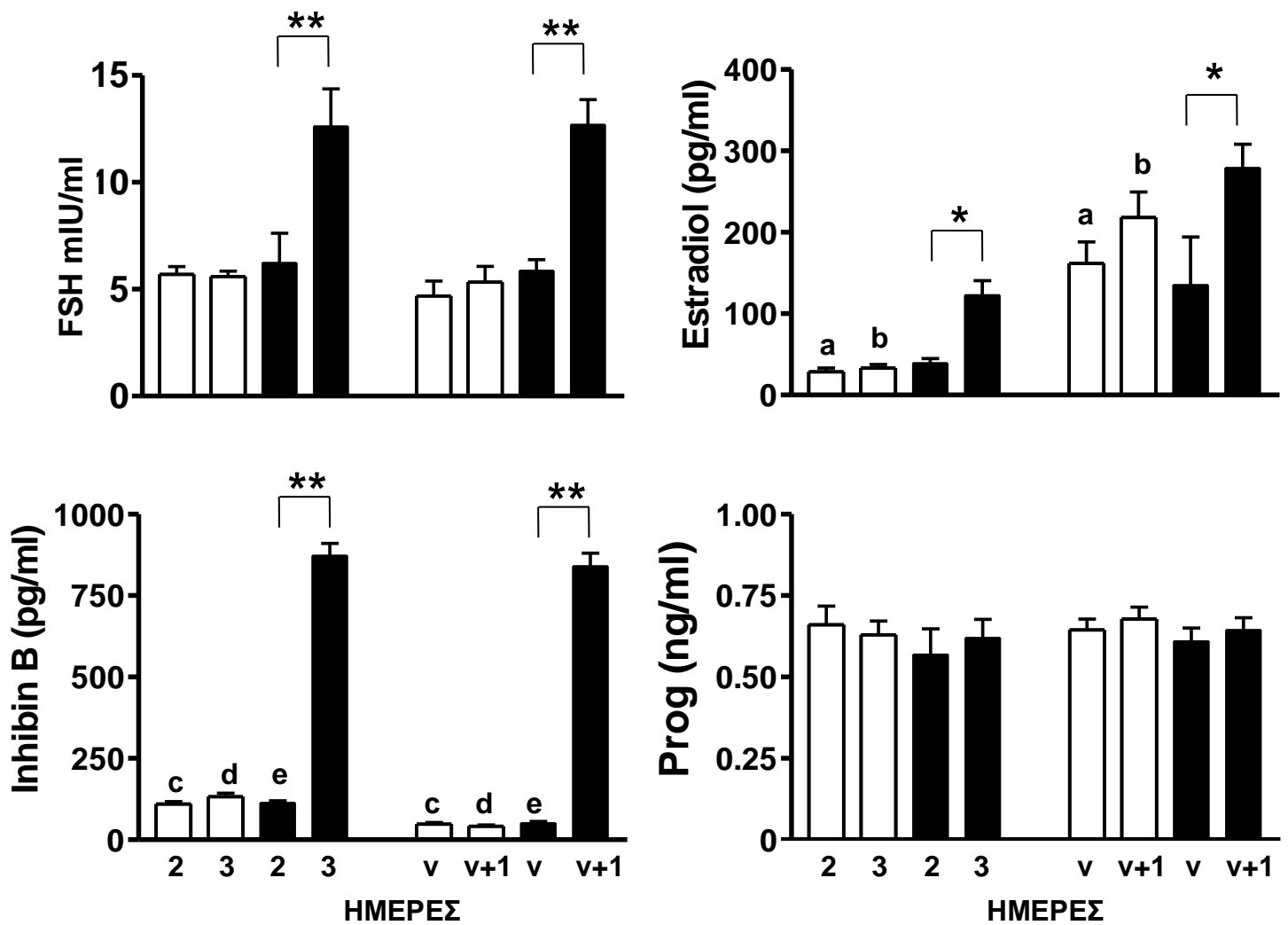
Το Σχήμα 15 δείχνει τις τιμές FSH, οιστραδιόλης, ινχιμπίνης Β και προγεστερόνης στην πρώιμη (ημέρα 2 και 3) και στην όψιμη ωοθυλακική φάση (ημέρα n και $n+1$) και των δύο κύκλων. Οι τιμές ορού αυτών των ορμονών την ημέρα 2 ήταν παρόμοιες μεταξύ των δύο κύκλων. Επίσης, στον κύκλο 1, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις τιμές των παραπάνω ορμονών μεταξύ των ημερών 2 και 3. Οι τιμές ορού της FSH στον κύκλο 2 αυξήθηκαν σημαντικά τις ημέρες 3 και $n+1$, σε σύγκριση με τις ημέρες 2 και n , αντιστοίχως, ως αποτέλεσμα της εξωγενούς χορήγησης της ορμόνης αυτής ($P < 0.001$). Οι τιμές του ορού της οιστραδιόλης στον κύκλο 1 αυξήθηκαν σημαντικά από τις ημέρες 2 και 3 στις ημέρες n και $n+1$ ($P < 0.001$), με τάση για περαιτέρω αύξηση από την ημέρα n στην ημέρα $n+1$. Ωστόσο, στον κύκλο 2, οι τιμές οιστραδιόλης στον ορό αυξήθηκαν σημαντικά από την ημέρα 2 έως την ημέρα 3 ($P < 0.05$) και από την ημέρα n έως την ημέρα $n+1$ ($P < 0.05$), λόγω της εξωγενούς χορήγησης FSH. Οι τιμές οιστραδιόλης την ημέρα n ήταν παρόμοιες και στους δύο κύκλους. Οι τιμές ορού της ινχιμπίνης Β στον κύκλο 1 ήταν σημαντικά χαμηλότερες τις ημέρες n και $n+1$ από ό,τι τις ημέρες 2 ($P < 0.001$) και 3 αντίστοιχα ($P < 0.01$). Στον κύκλο 2, οι τιμές ινχιμπίνης Β ήταν σημαντικά χαμηλότερες την ημέρα n από ό,τι την ημέρα 2 ($P < 0.001$), αλλά αυξήθηκαν σημαντικά μετά την έγχυση της FSH τόσο στην πρώιμη (ημέρα 3 σε σύγκριση με την ημέρα 2) και την όψιμη ωοθυλακική φάση (ημέρα $n+1$ σε σύγκριση με την ημέρα n , $P < 0.001$), φθάνοντας σε παρόμοια επίπεδα τις ημέρες 3 και $n+1$. Οι συγκεντρώσεις της

προγεστερόνης στον ορό ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους σε όλα τα χρονικά σημεία και δεν επηρεάστηκαν από την έγχυση της FSH.

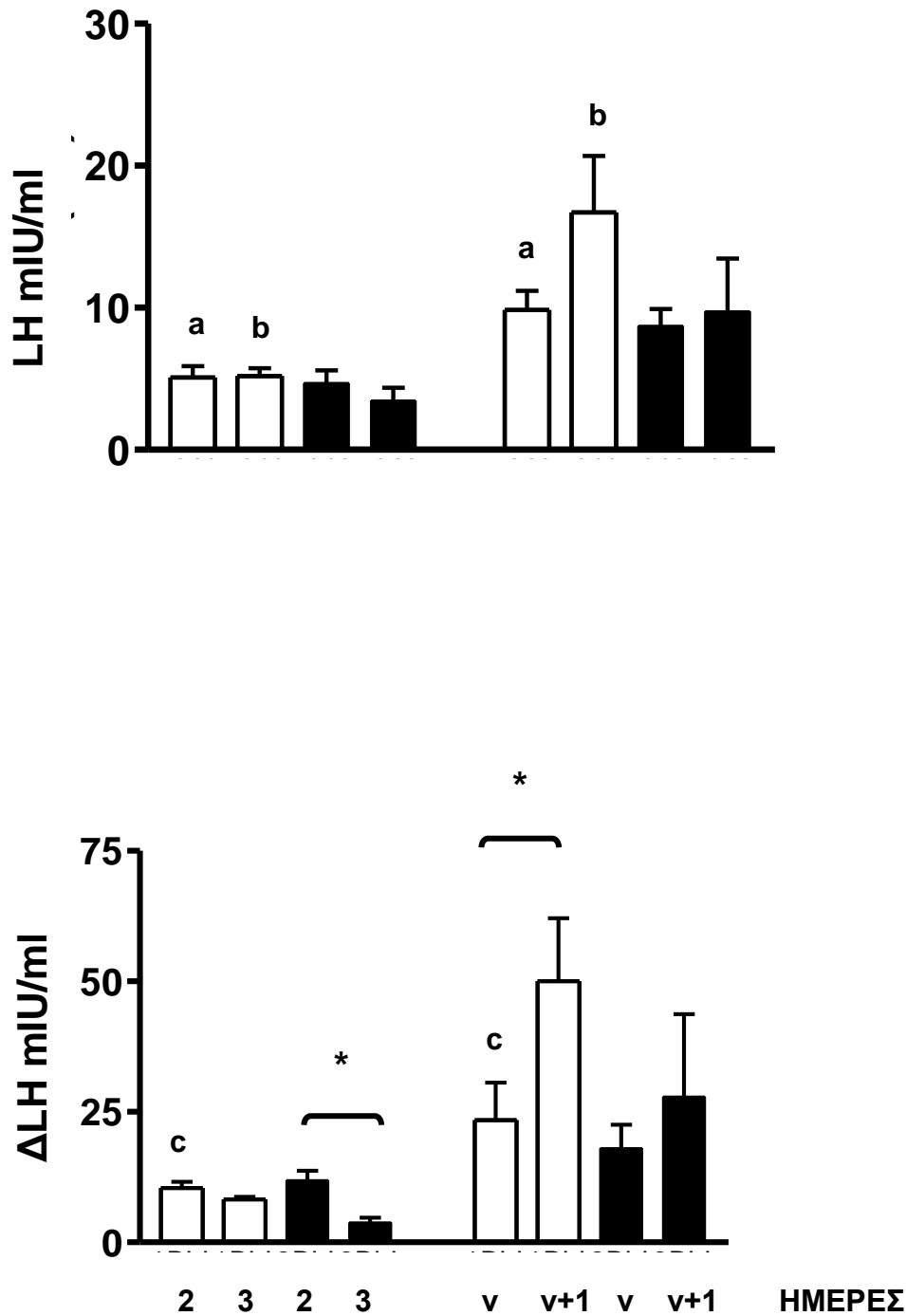
Το Σχήμα 16 δείχνει τις τιμές ορού της LH και τις τιμές ΔLH στις ημέρες 2, 3, n και $n+1$ στους δύο κύκλους καθώς και την ποσοστιαία διαφορά στις τιμές ΔLH μεταξύ κύκλου 1 και 2 τις ημέρες 3 και $n+1$ (perc ΔLH). Οι τιμές LH και ΔLH την ημέρα 2 ήταν παρόμοιες στους δύο κύκλους. Οι βασικές συγκεντρώσεις LH αυξήθηκαν σημαντικά και στους δύο κύκλους από την ημέρα 2 έως την ημέρα n ($P < 0.05$) και από την ημέρα 3 έως την $n+1$ αντίστοιχα ($P < 0.05$). Επίσης, παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση από την ημέρα n έως την ημέρα $n + 1$. Οι τιμές ΔLH στον κύκλο 1 δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από την ημέρα 2 στην 3, αλλά αυξήθηκαν σημαντικά από την ημέρα 2 έως n ($P < 0.05$) και από την ημέρα n στη $n+1$ ($P < 0.05$). Αντίθετα, στον κύκλο 2, μετά την ένεση της FSH, οι τιμές ΔLH μειώθηκαν σημαντικά στην πρώιμη ωοθυλακική φάση (από την ημέρα 2 έως την ημέρα 3, $P < 0.05$) και παρουσίασε μία μη σημαντική αύξηση στην όψιμη ωοθυλακική φάση (από την ημέρα n στην $n+1$). Το perc ΔLH είχε αρνητική τιμή τόσο κατά την πρώιμη όσο και κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση με καμία διαφορά μεταξύ τους ($66.9 \pm 17.5\%$ vs $65.2 \pm 3.6\%$, Σχήμα 17).

Σε όλες τις γυναίκες και οι δύο κύκλοι ήταν ωοθυλακιορρηκτικοί όπως διαπιστώθηκε με την αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης του ορού κατά τη μέση ωχρινική φάση (κύκλος 1: 10.4 ± 1.2 , κύκλος 2: 12.1 ± 2.7 ng / ml). Αυτό προηγήθηκε ενός κύματος της LH, δεδομένου ότι οι τιμές του ορού της LH αυξήθηκαν περαιτέρω τις ημέρες $n+2$ και $n+3$ και ήταν

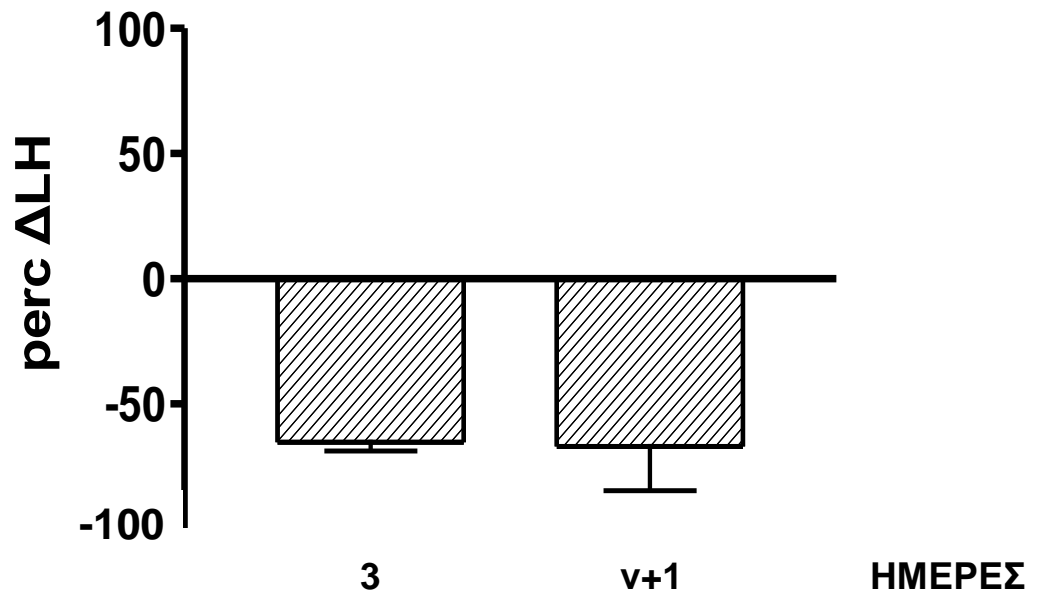
σημαντικά υψηλότερες στον κύκλο 1 ($33.4 \pm 7,0$ και 11.4 ± 1.9 mIU/ml αντίστοιχα) από ό, τι στον κύκλο 2 (12.1 ± 4.8 και 6.3 ± 1.1 mIU/ml, αντιστοίχως, $P < 0.05$). Η διάρκεια των δύο κύκλων ήταν παρόμοια (κύκλος 1: $28,7 \pm 0,8$ ημέρες, κύκλος 2: 29.0 ± 0.5 ημέρες).



Σχήμα 15. Οι τιμές ορού της FSH, της οιστραδιόλης, της ινχιμπίνης B και της προγεστερόνης τις ημέρες 2, 3, v και v+1 στους δύο κύκλους. Οι λευκές στήλες αντιστοιχούν στον κύκλο 1 και οι μαύρες στον κύκλο 2. ** P<0.001. * P<0.05. a και b P<0.001. c, d και e P<0.001.



Σχήμα 16. Οι βασικές τιμές LH και ΔLH τις ημέρες 2, 3, v και v+1 στους δύο κύκλους και η ποσοστιαία διαφορά στις τιμές ΔLH μεταξύ των κύκλων 1 και 2 τις ημέρες 3 και v+1 (percΔLH). Οι λευκές μπάρες αντιστοιχούν στον κύκλο 1 και οι μαύρες μπάρες στον κύκλο 2. * $P < 0.05$. a, b and c $P < 0.05$.



Σχήμα 17. Η ποσοστιαία διαφορά στις τιμές ΔLH μεταξύ των κύκλων 1 και 2 τις ημέρες 3 και v+1 (perc ΔLH).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A. Μελέτη του θετικού μηχανισμού αλληλορρύθμισης μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (ομάδα A)

Η παρούσα μελέτη δείχνει μεταβολές στον θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων με την ηλικία σε υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ειδικότερα, η ενδογενής εκκριτική αιχμή της LH (κύμα της LH), που προκλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, μετά από μια σταδιακή εξασθένηση κατά τη διάρκεια μιας μεταβατικής περιόδου 20 ετών από την εμμηνόπαυση, τελικά καταργήθηκε. Η επίδραση αυτή της ηλικίας σχετικά με την απάντηση της υπόφυσης στο οιστρογονικό ερέθισμα ήταν σύμφωνη με την ταυτόχρονη μείωση στις βασικές συγκεντρώσεις LH και FSH, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αποθέματα της υπόφυσης ελαχιστοποιούνται στην όψιμη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο (Baccarelli et al., 2001; Hall, 2004). Η ελαττωμένη ικανότητα απάντησης της υπόφυσης στα εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα ήταν ιδιαίτερα εμφανής μετά από την προηγούμενη αγωγή των γυναικών με προγεστερόνη, στο πλαίσιο μιας προσομοιωμένης ωχρινικής φάσης. Αυτή η θεραπεία οδήγησε σε σημαντική καταστολή των βασικών συγκεντρώσεων των δύο γοναδοτροφινών, ειδικά της LH, η οποία προσέγγισε τις συγκεντρώσεις εκείνες που παρατηρούνται στην πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου και αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές στην όψιμη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο.

Στην παρούσα μελέτη, η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων εφαρμόστηκε σε δόσεις που, όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες, είναι σε θέση να προκαλέσουν μια αιχμή της LH σε γυναίκες (Daforoulos et al., 2006; Messinis et al., 2010). Αν και μετά τη χορήγηση των οιστρογόνων επιτεύχθηκαν παρόμοιες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στον ορό και στις τρεις υπο-ομάδες γυναικών, η μέγιστη τιμή της αιχμής της LH που προκλήθηκε στην υπο-ομάδα II (περίπου 10 χρόνια μετά τον εμμηνόπαυση) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό,τι στην υπο-ομάδα I (~ 5 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση). Συνεπώς, φαίνεται ότι δεν είναι η ισχύς του ερεθίσματος της οιστραδιόλης, αλλά η ικανότητα της υπόφυσης να απαντήσει σε αυτό, που μειώθηκε με την ηλικία. Στην όψιμη μετεμμηνόπαυση (~ 20 έτη), δεν παρατηρήθηκε κύμα της LH ως απόκριση στη χορήγηση οιστραδιόλης, πράγμα που υποδεικνύει ότι τελικά τα αποθέματα της υπόφυσης είχαν σχεδόν εξαντληθεί.

Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από εκείνα μιας πρόσφατης μελέτης σε γυναίκες, η οποία έδειξε ότι ο θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης διατηρήθηκε ακόμα και στην ηλικία των 75 ετών, αν και μειώθηκε αναφορικά με το εύρος του σε σύγκριση με την ηλικία των 50 ετών (Shaw et al., 2011). Υπάρχουν, ωστόσο, σαφείς διαφορές μεταξύ των δύο μελετών. Πρώτον, στην προαναφερθείσα μελέτη, η εμμηνοπαυσιακή ηλικία δεν είχε ληφθεί υπόψη, παρά μόνο η χρονολογική ηλικία και δεύτερον δεν ήταν ο θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων, αυτός που μελετήθηκε, αλλά της προγεστερόνης, δεδομένου ότι 48 ώρες μετά την έναρξη της αγωγής με οιστρογόνα και πριν την εμφάνιση ενός προκαλούμενου από τα οιστρογόνα κύματος LH, στις γυναίκες χορηγήθηκε

επίσης προγεστερόνη. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο μελετών αξίζει να τονιστεί, αφού είναι γνωστό πως η προγεστερόνη αυξάνει τη θετική δράση των οιστρογόνων και ενισχύει το εύρος του επαγόμενου κύματος της LH (Chang & Jaffe, 1978; March et al., 1979; Messinis & Templeton, 1990). Σε καμία περίπτωση ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν ακυρώνει τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης. Αντιθέτως, τα παρόντα δεδομένα είναι συμπληρωματικά προς εκείνα της παραπάνω μελέτης, καθώς διερευνάται το αποτέλεσμα της επίδρασης των οιστρογόνων μόνων τους. Τα αποτελέσματά μας σε συνδυασμό με τα προηγούμενα δεδομένα δείχνουν ότι με την πάροδο της ηλικίας, ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης απαιτεί μια όλο και ισχυρότερη διεγερτική επίδραση των ωθηκικών στεροειδών, προκειμένου να ενεργοποιηθούν τα ελαττωμένα αποθέματα και να απελευθερωθούν γοναδοτροφίνες από τα γοναδοτρόφα κύτταρα.

Αν και στην παρούσα μελέτη, μόνο η οιστραδιόλη χρησιμοποιήθηκε ως ερέθισμα των αποθηκών της υπόφυσης, μεταξύ των δύο οιστρογονικών πειραματικών διαδικασιών, η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη χορηγήθηκαν μαζί όχι ως ερέθισμα για την ενεργοποίηση της υπόφυσης, αλλά ως υποκατάστατα ορμονών, προκειμένου να προσομοιώσουν το προφίλ του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου, όσον αφορά στην ακολουθία των ορμονικών γεγονότων. Αυτή η αγωγή κατέστειλε τα αυξημένα επίπεδα των γοναδοτροφινών πλησιάζοντας κατά κάποιον τρόπο την κατάσταση που εμφανίζεται στην κανονική ωοθυλακική φάση (Dafopoulos et al., 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μειωμένη απόκριση της υπόφυσης στην πρόκληση των οιστρογόνων παρατηρήθηκε επίσης κατά τη διάρκεια της δεύτερης πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή της προσομοιωμένης ωχρινικής φάσης.

Κατά την δεύτερη αυτή πειραματική διαδικασία οι μέγιστες τιμές της LH και της FSH (peak) στο κύμα ήταν χαμηλότερες από ό,τι κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος, δηλαδή πριν από την υποκατάσταση των στεροειδών.

Είναι προφανές από αυτά τα αποτελέσματα ότι το μέγεθος της απόκρισης της υπόφυσης βρίσκεται σε άμεση σχέση με τις βασικές τιμές των δύο γοναδοτροφινών. Αυτό υποστηρίζει την άποψη ότι όταν ο αρνητικός μηχανισμός ενισχύεται, η θετική επίδραση αμβλύνεται. Παρ'όλα αυτά, ακόμη και αν οι απόλυτες τιμές ήταν διαφορετικές, το μοτίβο των μεταβολών με την ηλικία, πριν και μετά τη χορήγηση στεροειδών ήταν παρόμοιο. Είναι πιθανό ότι η χορήγηση της προγεστερόνης, στο πλαίσιο μιας προσομοιωμένης ωχρινικής φάσης, να προκάλεσε μείωση του αριθμού των υποδοχέων οιστρογόνων στον υποθάλαμο και την υπόφυση, που ελάττωσε την οιστρογονική διέγερση (Smanik et al., 1983; Blanstein & Brown, 1984). Δεδομένου ότι η ίδια προσέγγιση εφαρμόσθηκε και στις τρεις υπο-ομάδες γυναικών, είναι προφανές ότι αυτό είχε παρόμοια επίδραση στις δύο πειραματικές διαδικασίες.

Η αιτία για τη μειωμένη απαντητικότητα της υπόφυσης με την ηλικία σε οιστρογονικό ερέθισμα δεν είναι σαφής. Ωστόσο, θα μπορούσε να ερμηνευθεί στο πλαίσιο της διαδικασίας “γήρανσης”, η οποία έχει αντίκτυπο σε πολλές λειτουργίες του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της έκκρισης των υποφυσιακών ορμονών (Noth & Mazzaferri, 1985; Roseberg et al., 1988). Δεν είναι γνωστό εάν αυτό σχετίζεται με την προσφάτως αναφερθείσα μείωση του όγκου της υπόφυσης με τη γήρανση στις γυναίκες (Terano et al., 1996; Baccarelli et al., 2001; Hall, 2004). Στην παρούσα, όπως και σε

προηγούμενες μελέτες, τα βασικά επίπεδα της FSH και της LH μειώθηκαν με την ηλικία. Παρά το γεγονός αυτό, έχει τεκμηριωθεί ότι υπάρχει μια αύξηση σχετιζόμενη με την ηλικία στο υποθαλαμικό περιεχόμενο της GnRH, παρόλο που μειώνεται η συχνότητα των εκκριτικών ώσεων (Hall et al., 2000; Gill et al., 2002). Η απόκλιση αυτή είναι δύσκολο να εξηγηθεί, παρ'όλα αυτά, δεν είναι μόνο η βασική αλλά και η απάντηση της LH στην GnRH, που μειώνεται με την ηλικία (Shaw et al., 2009), υποδεικνύοντας πιθανώς ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε υποθαλαμική GnRH μπορεί να εξηγηθεί στη βάση ενός βραχέος μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης (short feedback), που λειτουργεί τοπικά μεταξύ της υπόφυσης και του υποθαλάμου.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει για πρώτη φορά αλλαγές στο θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης των οιστρογόνων στις γυναίκες κατά τη διάρκεια μιας ορισμένης περιόδου μετά την εμμηνόπαυση. Παρατηρήθηκε μια σταδιακή εξασθένηση της απάντησης της υπόφυσης στην οιστρογονική διεγερτική επίδραση, με πλήρη κατάργηση μετά από περίπου 20 έτη. Τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι τα αποθέματα των υποφυσιακών γοναδοτρόφων κυττάρων μειώνονται με την ηλικία, πιθανώς ως αποτέλεσμα της φυσιολογικής μείωσης της λειτουργικής ακεραιότητας των διαφόρων οργάνων του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της υπόφυσης.

B. Μελέτη του ρόλου του GnSAF κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου (ομάδα B)

Η παρούσα μελέτη έδειξε μια σημαντική αύξηση στην απάντηση της LH στη GnRH (ΔLH) στην όψιμη σε σύγκριση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση σε φυσιολογικούς κύκλους, υποστηρίζοντας τη γνωστή ευαισθητοποιήσιμη δράση των ωοθηκών στα υποφυσιακά γοναδοτρόφα κύτταρα. Επιπλέον, αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε την γνωστή κατασταλτική επίδραση της χορήγησης FSH στην απάντηση της LH στη GnRH στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, σε σύγκριση με φυσιολογικούς κύκλους (Messinis et al., 1998). Αυτό δείχνει ότι η FSH διεγείρει την αύξηση της παραγωγής των διαφόρων ωοθηκικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του GnSAF, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μειωμένη έκκριση της LH ως απόκριση στην GnRH. Στην όψιμη ωοθυλακική φάση, η υπό φυσιολογικές συνθήκες αυξημένη ευαισθητοποιήσιμη επίδραση των ωοθηκών στην από την GnRH επαγόμενη έκκριση LH μετριάστηκε μετά τη χορήγηση της FSH, αντιπροσωπεύοντας μόνο μια μικρή αύξηση από την προηγούμενη ημέρα ($\Delta LH \sim 20\%$), σε αντίθεση με φυσιολογικούς κύκλους ($\Delta LH \sim 100\%$ αύξηση). Αυτό δείχνει ότι η FSH διεγείρει την παραγωγή ουσιών με δραστηριότητα “άμβλυνσης” (GnSAF) όχι μόνο στις αρχές αλλά και στην όψιμη ωοθυλακική φάση, οι οποίες ελάττωσαν την απάντηση της LH στην GnRH.

Η διαφορετική απάντηση της LH στην GnRH στην πρώιμη (μείωση) και στην όψιμη ωοθυλακική φάση (περιορισμένη αύξηση), μετά από τη χορήγηση της FSH, θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως ένδειξη ότι η ποσότητα του

παραγόμενου GnSAF είναι υψηλότερη στην πρώτη από ό,τι στη δεύτερη φάση του κύκλου. Αυτό το ενδεχόμενο, ωστόσο, είναι μάλλον απίθανο, δεδομένου ότι η ποσοστιαία διαφορά στην απάντηση της LH στη GnRH μεταξύ των κύκλων χωρίς θεραπεία και αυτών όπου χορηγήθηκε FSH ήταν την ημέρα 3 παρόμοια με εκείνη, που παρατηρείται κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση (Σχήματα 16, 17). Ως εκ τούτου, είναι λογικό να συμπεράνει κανείς ότι η ικανότητα των ωοθηκών να παράγουν GnSAF ως απάντηση στη χορήγηση FSH και επομένως και η ποσότητα του εκκρινόμενου GnSAF είναι σχεδόν ίση στις δύο φάσεις του κύκλου.

Είναι γνωστό ότι κατά την έναρξη του κύκλου μια ομάδα μικρών κοιλοτικών ωοθυλακίων είναι παρούσα στις ωοθήκες από την οποία επιλέγεται το κυρίαρχο ωοθυλάκιο κάτω από την “διακυκλική” αύξηση της FSH, δηλαδή την αύξηση μεταξύ δύο συνεχόμενων κύκλων (Hillier, 1994). Είναι πιθανό, επομένως, η θέση παραγωγής του GnSAF μετά τη χορήγηση της FSH να είναι η ομάδα των μικρών ωοθυλακίων. Παρά το γεγονός ότι η ανάπτυξη των ωοθυλακίων στις γυναίκες πραγματοποιείται κατά κύματα (Baerwald et al.,2012), εκτιμάται ότι το μέγεθος της ομάδας και ως εκ τούτου ο αριθμός των μικρών, αναπτυσσόμενων αλλά μη επιλεγμένων κοιλοτικών ωοθυλακίων παραμένει μάλλον σταθερός σε κάθε χρονικό σημείο από την πρώιμη στην όψιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου, όπως αυτό επίσης εκτιμάται από τις αμετάβλητες συγκεντρώσεις αντιμυλλεριανής ορμόνης σε όλη τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (La Marca et al.,2006; Visser et al.,2006). Στην όψιμη ωοθυλακική φάση, το κυρίαρχο προωορρηκτικό ωοθυλάκιο σποτελεί την κύρια πηγή παραγωγής οιστραδιόλης, η οποία στην παρούσα μελέτη

αυξήθηκε περαιτέρω μετά τη χορήγηση της FSH. Το γεγονός ότι η ΔLH απάντηση στην GnRH ήταν εξίσου περιορισμένη στις δύο φάσεις των κύκλων χορήγησης FSH σε σχέση με τους κύκλους control υποδεικνύει την παραγωγή του GnSAF από την ομάδα των μικρών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και ότι η συμβολή του ωορρηκτικού ωοθυλακίου είναι ελάχιστη. Αυτό υποστηρίζεται από προηγούμενα *in vitro* δεδομένα που δείχνουν ότι τα μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια παράγουν GnSAF σε μεγαλύτερες ποσότητες από ό,τι τα περιωορρηκτικά ωοθυλάκια (Fowler et al., 2001).

Τα συμπεράσματα αυτά, αναφορικά με τον GnSAF, υποστηρίζονται περαιτέρω από τις μεταβολές των επιπέδων ορού της ινχιμπίνης Β στην παρούσα μελέτη. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παράγεται κυρίως στην πρώιμη ωοθυλακική φάση από μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια υπό την επίδραση της διακυκλικής αύξησης της FSH (Sehested et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη, μια αξιοσημείωτη αύξηση στις συγκεντρώσεις της ινχιμπίνης Β παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση της FSH, η οποία ήταν παρόμοια κατά την πρώιμη και την όψιμη ωοθυλακική φάση. Αυτό υποδηλώνει περαιτέρω ότι η ομάδα των κοιλοτικών ωοθυλακίων ήταν σε μέγεθος παρόμοια στις δύο φάσεις του κύκλου και ότι η παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι το μοτίβο των μεταβολών GnSAF προσέγγισε εκείνο της ινχιμπίνης Β, που παράγεται επίσης από τα μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια, αν και οι συγκεντρώσεις του GnSAF αξιολογήθηκαν μόνο έμμεσα.

Καθώς ο GnSAF δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως, τα παρόντα αποτελέσματα, για την άμβλυνση της απάντησης της LH στη GnRH, θα πρέπει να

ερμηνεύονται προσεκτικά. Παρ'όλα αυτά, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι ωοθήκες όταν διεγείρονται με FSH εκφράζουν μια δραστηριότητα άμβλυσης της από τη GnRH προκαλούμενης έκκρισης της LH είτε αυτή ονομάζεται GnSAF είτε διαφορετικά . Προηγούμενα *in vivo* και *in vitro* πειράματα έχουν αποκλείσει το ενδεχόμενο η μειωμένη απάντηση της LH στη GnRH κατά τη διάρκεια της θεραπείας με FSH να αποδίδεται στην οιστραδιόλη ή την ινχιμπίνη (Pappa et al.,1999; Messinis and Templeton, 1987; Byrne et al., 1995; Balen et al., 1995). Ειδικότερα, η βιοδραστικότητα του GnSAF, που αξιολογήθηκε σε καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης αρουραίου δεν επηρεάστηκε από ένα αντίσωμα ενάντια στην ινχιμπίνη (Balen et al., 1995). Επιπλέον, η συν-επώαση ορού από γυναίκες μετά από ωοθηκική διέγερση με αντίσωμα ινχιμπίνης δεν είχε καμία επίδραση στην βιοδραστικότητα του GnSAF (Byrne et al., 1995). Πέραν αυτών, πειράματα σε τρωκτικά έχουν δείξει ότι τα ωοθυλάκια είναι ένα *in vivo* μοντέλο για τη μελέτη της παραγωγής του GnSAF, ο οποίος είναι διαφορετικός από την ινχιμπίνη (Fowler et al., 2004).

Τα παρόντα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση, που είχε προηγουμένως διατυπωθεί, ότι ο GnSAF παράγεται κάτω από την επίδραση της δακυκλικής αύξησης της FSH από τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Καθώς η FSH μειώνεται, η παραγωγή του GnSAF μειώνεται επίσης και αυτό διευκολύνει την ευαισθητοποιή επίδραση της οιστραδιόλης, που εκκρίνεται σε ολοένα και μεγαλύτερες ποσότητες από το προωρρηκτικό ωοθυλάκιο, οδηγώντας στο μεσοκυκλικό κύμα της LH (Messinis, 2006). Κατά τη διάρκεια της ωοθηκικής διέγερσης, η εξωγενώς χορηγούμενη FSH διεγείρει την παραγωγή μεγάλων

ποσοτήτων GnSAF και αυτό οδηγεί σε ένα σημαντικά εξασθενημένο κύμα της LH (Messinis et al., 1985).

Τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν περαιτέρω ένα φυσιολογικό ρόλο για τον GnSAF στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, δηλαδή ότι αυτός ο παράγοντας διατηρεί την υπόφυση σε μια κατάσταση χαμηλής αποκρισιμότητας στη GnRH στο μεγαλύτερο μέρος της ωοθυλακικής φάσης, διευκολύνοντας στο μέσο του κύκλου την πλήρη έκφραση του κύματος της LH.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι η ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH αναφορικά με την έκκριση της LH μετά τη χορήγηση της FSH ήταν εξίσου εξασθενημένη κατά την πρώιμη και την όψιμη ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυτό υποδηλώνει ότι η κύρια πηγή του GnSAF κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου είναι μια ομάδα μικρών κοιλοτικών ωοθυλακίων, ενώ η συνεισφορά του ωορρηκτικού ωοθυλακίου στην όψιμη ωοθυλακική φάση είναι ελάχιστη. Τα δεδομένα αυτά προσδίδουν μία νέα διάσταση στην εξήγηση των ορμονικών μεταβολών του γεννητικού κύκλου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά αλλαγές στο θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων στις γυναίκες κατά τη διάρκεια μιας ορισμένης περιόδου μετά την εμμηνόπαυση.
2. Παρατηρείται μια σταδιακή εξασθένηση της απάντησης της υπόφυσης στην οιστρογονική πρόκληση, με πλήρη κατάργησή της μετά από 20 περίπου έτη από την εμμηνόπαυση.
3. Τα αποθέματα των υποφυσιακών γοναδοτρόφων κυττάρων μειώνονται με την ηλικία, πιθανώς ως αποτέλεσμα της φυσιολογικής φθοράς της λειτουργικής ακεραιότητας των διαφόρων οργάνων του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της υπόφυσης.
4. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται η γνωστή κατασταλτική επίδραση της αγωγής με FSH στην απάντηση της LH στη GnRH (βιοδραστικότητα GnSAF) στην πρώιμη ωοθυλακική φάση.
5. Ο GnSAF φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στη διάρκεια του γεννητικού κύκλου.
6. Η κύρια πηγή του GnSAF κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου είναι μια ομάδα μικρών κοιλοτικών ωοθυλακίων, ενώ η συνεισφορά της ωορρηκτικού ωοθυλακίου στην όψιμη ωοθυλακική φάση είναι ελάχιστη.
7. Η ικανότητα των ωοθηκών να παράγουν GnSAF ως απόκριση στη χορήγηση FSH και επομένως η ποσότητα του εκκρινόμενου GnSAF είναι σχεδόν ίδια στις δύο φάσεις του κύκλου..

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός

Είναι γνωστό ότι μετά την εμμηνόπαυση οι συγκεντρώσεις ορού της FSH και LH αυξάνουν αρκετές φορές πάνω από αυτά της πρώιμης παραγωγικής φάσης, λόγω της απουσίας του αρνητικού μηχανισμού. Ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει ότι ο θετικός μηχανισμός των οιστρογόνων μαζί με την προγεστερόνη, αν και αμβλυμένος, διατηρείται κατά τα όψιμα μετεμμηνοπαυσιακά έτη. Παρόλα αυτά δεν έχει διερευνηθεί εάν συμβαίνει το ίδιο με τον θετικό μηχανισμό μόνο των οιστρογόνων.

Κατά τον φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο, η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH, ενώ ο παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροπινών (GnSAF) πιθανόν ανταγωνίζεται αυτή τη δράση. Χρησιμοποιώντας την απάντηση της LH στη GnRH κατά τη διάρκεια της χορήγησης FSH ως μιας in vivo βιολογικής μεθόδου, για την εκτίμηση της βιοδραστικότητας του GnSAF, εξετάσθηκε η υπόθεση ότι η αυξημένη απάντηση της LH στη GnRH κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση συσχετίζεται με τη μειωμένη παραγωγή του GnSAF από το ωορρηκτικό ωοθυλάκιο.

Υλικό και μέθοδοι

Η μελέτη περιέλαβε σαράντα υγιείς γυναίκες, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ως εξής: Η πρώτη ομάδα περιέλαβε τριάντα εμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες διαιρέθηκαν σε 3 υπο-ομάδες, ανάλογα με τα έτη από την εμμηνόπαυση (υπο-ομάδα I: 2-8 έτη, υπο-ομάδα II: 9-17 έτη, υπο-ομάδα III: 18-25 έτη) και μελετήθηκαν για 41 ημέρες. Οι γυναίκες της ομάδας αυτής υποβλήθηκαν δύο φορές στην ίδια πειραματική διαδικασία. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τη διαδερμική χορήγηση οιστραδιόλης σε δόση 100 µg την ημέρα 1 και 35 και 150 µg τις ημέρες 2, 3, 36 και 37. Οιστραδιόλη επίσης χορηγήθηκε σε δόση 100 µg κάθε 3 ημέρες από την ημέρα 4 έως την ημέρα 34. Επίσης οι γυναίκες έλαβαν επιπλέον προγεστερόνη (από του

στόματος) από την ημέρα 21 έως την ημέρα 34. Δείγματα αίματος λήφθηκαν από όλες τις γυναίκες κάθε 12 ώρες τις ημέρες 1 έως 3 και 35 έως 37 και κάθε 6 ώρες τις ημέρες 4 έως 7 και 38 έως 41. Επίσης δείγματα αίματος λήφθηκαν τις ημέρες 8, 13, 20, 21, 27 και 34. Σε όλα τα δείγματα έγινε μέτρηση των FSH, LH, οιστραδιόλης και προγεστερόνης.

Η δεύτερη ομάδα περιέλαβε δέκα γυναίκες, με φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους, οι οποίες μελετήθηκαν σε δύο κύκλους. Μελετήθηκε η απάντηση της LH στη χορήγηση 10 μg GnRH i.v. (ΔLH: η καθαρή αύξηση πάνω από τη βασική τιμή της LH στα 30 λεπτά) τις ημέρες 2 και 3 και στις ημέρες n (μέγεθος κυρίαρχου ωοθυλακίου 16-17 mm) και $n+1$ στον κύκλο 1 (κύκλος ελέγχου) και στον κύκλο 2. Τις ημέρες 2 και n , χορηγήθηκε μια δόση υποδορίως φυσιολογικού ορού (κύκλος 1) ή 450 IU ανασυνδυασμένης FSH (κύκλος 2) μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της GnRH. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $mean \pm SEM$.

Αποτελέσματα

Ομάδα A

Με την έναρξη του ερευνητικού πρωτοκόλλου στις γυναίκες της ομάδας A, οι τιμές ορού των LH και FSH μειώθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση οιστραδιόλης, ως αποτέλεσμα του αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων. Μετά τη χορήγηση οιστραδιόλης πραγματοποιήθηκε κύμα της LH, ως αποτέλεσμα του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των οιστρογόνων στις υπο-ομάδες I και II κατά τη διάρκεια και των δύο πειραματικών διαδικασιών. Οι κορυφαίες τιμές της LH κατά τη διάρκεια του κύματος ήταν σημαντικά υψηλότερες στην υπο-ομάδα I σε σχέση με τη υπο-ομάδα II ($P < 0.05$). Παρά τη σημαντική άνοδο των επιπέδων της οιστραδιόλης στις γυναίκες της υπο-ομάδας III καμία από τις γυναίκες αυτής της υπο-ομάδας δεν εμφάνισε κύμα της LH.

Ομάδα B

Στις γυναίκες της ομάδας B, η χορήγηση FSH αύξησε τις συγκεντρώσεις στον ορό τόσο της οιστραδιόλης όσο και της ινχιμπίνης B. Στον κύκλο 1, η ΔLH

παρέμεινε αμετάβλητη από την ημέρα 2 στην ημέρα 3, αλλά αυξήθηκε σημαντικά από την ημέρα n στη $n+1$. Αντίθετα, στον κύκλο 2, η ΔLH μειώθηκε σημαντικά από τις ημέρες 2 έως 3 ($P < 0.05$) και έδειξε μια μη σημαντική στατιστικά αύξηση από την ημέρα n έως τη $n+1$. Η ποσοστιαία διαφορά στην ΔLH μεταξύ των κύκλων 1 και 2 ήταν όμοια στις ημέρες 3 ($-66.9 \pm 17.5\%$) και $n+1$ ($-65.2 \pm 3.6\%$).

Συμπεράσματα

Ομάδα A

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν για πρώτη φορά μια μείωση της ευαισθησίας της υπόφυσης στο θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της εξωγενώς χορηγούμενης οιστραδιόλης στις μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες, με άμβλυση του επαγόμενου από τα οιστρογόνα κύματος της LH έως την κατάργησή του σε μια περίοδο 20 ετών μετά την εμμηνόπαυση. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος είναι πιθανόν να οφείλονται σε κεντρικού τύπου σχετιζόμενες με την ηλικία μεταβολές του υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος, οι οποίες οδηγούν σε μια σημαντική μείωση της λειτουργικής ικανότητας των υποφυσιακών γοναδοτρόφων κυττάρων.

Ομάδα B

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του εμμηνορρυσιακού κύκλου, ο GnSAF παράγεται από μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια ενώ η συμμετοχή του ωορρηκτικού ωοθυλακίου είναι ελάχιστη.

SUMMARY

OBJECTIVE

It is well known that after menopause, serum concentrations of both FSH and LH increase several times above early follicular phase levels due to the absence of the negative feedback mechanism. It has been shown that positive feedback mechanism of estrogen plus progesterone, although attenuated, is preserved in late postmenopausal years. Whether this is also the same for the positive feedback effect of estrogen alone has not been investigated.

During menstrual cycle, oestradiol sensitizes the pituitary to GnRH, while gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) may oppose this action. Using the LH response to GnRH during treatment with FSH as an in vivo bioassay for GnSAF, we tested the hypothesis that the augmented LH response to GnRH in the late follicular phase is related to reduced production of GnSAF from the ovulatory follicle.

MATERIAL AND METHODS

The study included forty healthy women, divided in two groups: Group A included thirty postmenopausal women, divided into three subgroups (10 women in each group) according to the years since menopause, (group I: 2-8 y, group II: 9-17 y, group III: 18-25 y) and studied for 41 days. All women participated in the same experimental procedure twice: Exogenous estradiol was given (via skin patches) during two experiments at the doses of 100 µg on days 1 and 35 and 150 µg on days 2, 3, 36 and 37. Estradiol was also given at the dose of 100 µg every 3 days from day 4 to the day 34. Progesterone (given orally) was added from day 21 to 34. In order to assess the occurrence of an LH surge, blood samples were collected from all women every 12 hours from days 1 to 3 and 35 to 37 and every 6 hours from days 4

to 7 and 38 to 41. Blood samples were also taken on days 8, 13, 20, 21, 27 and 34. In all blood samples FSH, LH, E2 and P4 were measured.

Group B included ten normally cycling women, studied during two menstrual cycles. The LH response to 10 µg GnRH i.v. (Δ LH: the net increase in LH at 30 minutes above the basal value.) was investigated on days 2 and 3 and on days v (follicle size 16-17 mm) and v + 1 of cycle 1 (control) and cycle 2. On days 2 and v, a single s.c. injection of either normal saline (cycle 1) or 450 IU recombinant FSH (cycle 2) was given after the end of the GnRH experiment. The results are presented as mean \pm SEM.

RESULTS

Group A

Following treatment with the estradiol, serum FSH and LH levels declined significantly (negative feedback mechanism). An LH surge occurred as a result of the estradiol positive feedback mechanism in groups I and II, in both experiments. Peak LH values during the surge were significantly higher in group I than in group II in both experiments ($P < 0.05$). None of the patients in group III displayed an LH surge following the estrogen triggering effect.

Group B

FSH injection increased both serum oestradiol and inhibin B. In cycle 1, Δ LH remained unchanged from days 2 to 3 but increased significantly from days v to v + 1. In contrast, in cycle 2, Δ LH decreased significantly from days 2 to 3 ($P < 0.05$) and showed a nonsignificant increase from day v to day v + 1. The percentage difference in Δ LH between cycle 1 and cycle 2 was similar on days 3 ($-66.9 \pm 17.5\%$) and v + 1 ($-65.2 \pm 3.6\%$).

CONCLUSIONS

Group A

The present study demonstrates for the first time a decreasing sensitivity of the pituitary to the positive feedback effect of exogenous estrogen in

postmenopausal women with the estrogen-induced LH surge becoming attenuated before it was completely abolished in later postmenopausal years. Although the mechanism is not clear, it is suggested that age-related central alterations in the hypothalamic pituitary system take place in postmenopausal women leading to a marked reduction of the functional capacity of the pituitary gonadotrophs.

Group B

These results suggest that during the follicular phase of the menstrual cycle, GnSAF is produced by small antral follicles, while the contribution of the ovulatory follicle is minimal.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Μεσσήνης Ι.Ε. (2005) Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία, 15-49.

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.

Adams LA, Clifton DK, Bremner WJ, Steier RA (1988) Testosterone modulates the differential release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone that occurs in response to changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the male monkey. *Biol Reprod* 38:156-162.

Adashi EY (1994) The climacteric ovary as a functional gonadotropin-driven androgen-producing gland. *Fertil Steril* 62:20-27.

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

Alexander SE, Aksel S, Hazelton JM, Yeoman RR, Gilmore SM (1990) The effect of aging on hypothalamic function in oophorectomized women. *Am J Obstet Gynecol* 162:446-449.

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.

Andreyko J.L., Monroe S.E., Marshall L.A. (1992) Concordant suppression of serum immunoreactive luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone, alpha subunit, bioactive LH, and testosterone in postmenopausal women by a potent gonadotropin releasing hormone antagonist (detirelix). *J Clin Endocrinol Metab* 74:399-405.

Baccarelli A, Morpurgo PS, Corsi A, Vaghi I, Fanelli M, Cremonesi G, Vaninetti S, Beck-Peccoz P and Spada A (2001) Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. *Exp Gerontol* 36,1403–1412.

Baerwald, A.R, Adams, G.P. & Pierson, R.A. (2012) Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update*, 18, 73-91.

Balen, A.H., Er, J., Rafferty, B. (1995) In vitro bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor is not affected by an antibody to human inhibin. *Journal of Reproduction & Fertility*, 104, 285-289.

Barlow JJ, Emerson K Jr, Saxena BN (1969) Estradiol production after ovariectomy for carcinoma of the breast. *NEJM* 280, 633-677.

Bédécarrats GY, Kaiser UB. (2003) Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 144(5),1802-11

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.

Blaustein JD, Brown TJ. (1984) Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats. *Brain Res.* 304(2),225-36.

Blaustein JD, Brown TJ. (1984) Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats. *Brain Res.* 304(2),225-36.

Booth RA, Weltman JRJY, Yankov VI, Murray J, Davison TS, Rogol AD, Asplin CM, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS (1996) Mode of pulsatile follicle-stimulating hormone secretion in gonadal hormone-sufficient and -deficient women. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81,3208-3214

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

Buckler HM, Bangah M, Healy DL and Burger HG (1992) Vaginal progesterone administration in physiological doses normalizes raised luteinizing hormone levels in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 6, 275–282.

Bulun SE, Simpson ER. (1994) Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 78,428-432.

Burger HG, Dudley E, Mamers P, Groome N and Robertson DM (2000) Early follicular phase serum FSH as a function of age: the roles of inhibin B, inhibin A and estradiol. *Climacteric* 3,17–24.

Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A, Dennerstein L (1999) Prospectively measured levels of serum FSH, estradiol and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab* 84,4025-4030.

Burger H.G., Cahir N., Robertson D.M. (1998) Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48(6),809-813.

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.

Byrne, B., Fowler, P.A., Fraser, M. (1995) Gonadotropin surge-attenuating factor bioactivity in serum from superovulated women is not blocked by inhibin antibody. *Biology of Reproduction*, 52, 88-95.

Cagnacci A, Melis GB, Paoletti AM, Gambacciani M, Soldani R, Spinetti A, Fioretti P (1989) Influence of oestradiol and progesterone on pulsatile LH secretion in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 31,541-550.

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.

Campbell R., Han S., Herbison A. (2005) Biocytin filling of adult gonadotropin-releasing hormone neurons in situ reveals extensive, spiny, dendritic processes. *Endocrinology* 146,1163-1169.

Cauley LA, Gutal JP, Kuller LH, Ledonne D, Powell JG (1989) The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 129,1120-1131.

Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton SR, Oran DA, Studd JWW (1976) Hormonal profiles after menopause. *BMJ* 2,784-786.

Chang RJ, Jaffe RB. (1978) Progesterone effects on gonadotropin release in women pretreated with estradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 147(1),119-25.

Chappell PE, Schneider JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW and Levine JE (1999) Absence of gonadotropin surges and gonadotropin-releasing hormone self-priming in ovariectomized (OVX), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice. *Endocrinology* 140,3653–3658.

Cheng C.K., Leung P. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 26,283–306.

Chongthammakun S, Terasawa E (1993) Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 132,735–743

Cleland WH, Mendelson CR, Simpson ER (1985) Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J Clin Endocrinol Metab* 60,174-177.

Costoff A, Mahesh VB (1975) Primordial follicles with normal oocytes in the ovaries of postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc* 23,193-196

Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20,358–417

Couzinet B, Schaison G (1993) The control of gonadotrophin secretion by ovarian steroids. *Hum Reprod S (Suppl 2)*, 97-101.

Crowley WF Jr, Whitcomb RW, Jamesn JL, Weiss J, Finkelstein JS, O'Dea L St L (1991) Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent Prog Horm Res* 47,27-62.

Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, Kallitsaris A, Galazios G, Zintzaras E, Sotiros P, Messinis IE. (2004) 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(9),1985-92.

Dafopoulos K, Mademtzis I, Vanakara P, Kallitsaris A, Stamatiou G, Kotsovassilis C, Messinis IE. (2006) Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(2),641-5.

Dafopoulos K, Venetis C, Pournaras S, Kallitsaris A, Messinis IE. (2009) Ovarian control of pituitary sensitivity of luteinizing hormone secretion to gonadotropin-releasing hormone in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 92(4),1378-80.

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, 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, D.R. & Cheng, C.Y. (1995) Purification of a candidate gonadotropin surge inhibiting factor from porcine follicular fluid. *Endocrinology*, 136, 1658-1665.

De Koning, C.H., McDonnell, J., Themmen, A.P., de Jong, F.H.,Homburg, R., Lambalk, C.B. (2008) The endocrine and follicular growth dynamics throughout the menstrual cycle in women with consistently or variably elevated early follicular phase FSH compared with controls. *Hum. Reprod.* 23,1416–1423.

De Kretser D.M., Hedger M., Loveland K., et al (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8,529-541.

De La Iglesia H.O., Schwartz W. (2006) Minireview: Timely ovulation. Circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 147,1148-1153.

de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP and Fauser BC (2002) Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77, 357–362.

Dennefors BL, Janson PO, Hamberger L, Knutson F (1982) Hilus cells from human postmenopausal ovaries: gonadotrophin sensitivity, steroid and cyclic AMP production. *Acta Obstet Gynecol Scand* 61, 413-416.

Dennefors BL, Janson PO, Knutson F, Hamberger L (1980) Steroid production and responsiveness to gonadotrophin in isolated stromal tissue of human postmenopausal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 136,997-1002.

Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R. (2007) Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3958–3966

Donovan, L.E., Brain, P.H., Duggan, M.A. (2010) Isolated luteinizing hormone (LH) elevation in a woman with secondary amenorrhea: a clue to the diagnosis of an inhibin B-producing thecoma and insights into the influence of inhibin B on LH. *Fertil. Steril.* 94,1097e.9–1097e.12.

Dowsett M, Cantwell B, Lal A, Jeffcoate SL, Harris AL (1988) Suppression of postmenopausal ovarian steroidogenesis with the luteinizing hormone-releasing hormone agonist Goserelin. *J Clin Endocrinol Metab* 66,672-677.

Emmanouel DS, Stavropoulos T, Katz AI (1984) Role of the kidney in metabolism of gonadotropins in rats. *Am J Physiol* 247,E786-E792.

Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA and 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, Robertson DM, de Kretser DM and Burger HG (1988) Effects of 31 kilodalton bovine inhibin on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in rat pituitary cells in vitro: actions under basal conditions. *Endocrinology* 122,207–213.

Ferin M, Dyrenfurth I, Cowchock S, Warren M and Wiele RL (1974) Active immunization to 17 beta-estradiol and its effects upon the reproductive cycle of the rhesus monkey. *Endocrinology* 94,765–776.

Ferraretti AP, Garcia JE, Acosta AA and Jones G (1983) Serum luteinizing hormone during ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization in normally menstruating women. *Fertility and Sterility* 40, 742–747

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU (1991) A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67,1103-1110.

Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Ferrari P, Meriggiola MC, Michelacci L, Pareschi A, Valdiserri A (1989) Evidence for a specific role of GnRH pulse frequency in the control of the human menstrual cycle. *Am J Physiol* 257,E930-E936.

Filicori M, Santoro N, Merriam GR and 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.

Filicori M., Butler J.P., Crowley Jr. W.F. (1984) Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human: evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 73(6),1638-1647.

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

Finkelstein JS, Badger TM, O'Dea L St L, Spratt DI, Crowley WF (1988) Effects of decreasing the frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation on gonadotropin secretion in gonadotropin-releasing hormone-deficient men and perfuse rat pituitary cells. *J Clin Invest* 81,1725-1733.

Foster DL and Ryan KD (1979) Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105,896–904.

Fowler PA and Mason HD (2000) Human granulosa cells secrete gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity acutely in response to FSH in vitro. *Journal of Endocrinology* 164 Supplement 243

Fowler PA and Price C (1997) Follicle-stimulating hormone stimulates circulating gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor bioactivity in cows *Biology of Reproduction* 57, 278–285

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* 52,87-80

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

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 P.A., Sorsa T., Harris W.J., et al: Relationship between follicle size and gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women. *Hum Reprod* 2001; 16(7):1353-1358.

Fowler, P.A., Sorsa-Leslie, T., Cash, P.(2002) A 60-66 kDa protein with gonadotrophin surge attenuating factor bioactivity is produced by human ovarian granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 8, 823-832.

Fueshko S., Key S., Wray S. (1998) GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants. *J Neurosci* 18,2560-2569.

Garcia A, Schiff M, Marshall JC (1984) Regulation of pituitary GnRH receptors by pulsatile GnRH injections in male rats. *J Clin Invest* 74,920-928.

Genazzani AD, Petraglia F, Sgarbi L, Montanini V, Hartmann B, Surico N, Biolcati A, Volpe A, Genazzani AR (1997) Difference of LH and FSH secretory characteristics and degree of concordance between postmenopausal and aging women 26,133-138.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11,177-199.

Gill S, Lavoie HB, Bo-Abbas Y, Hall JE (2002b) Negative feedback effects of gonadal steroids are preserved with aging in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87,2297-2302.

Gill S, Sharpless JL, Rado K, Hall JE. (2002) Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.*87(5),2290-6.

Gosden RG (1987) Follicular status at the menopause. *Hum Reprod* 2,617-621.

Gosselin N, Price CA, Roy R and Carriere PD (2000) Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: evidence for negative feedback other than oestradiol and progesterone *Theriogenology* 54, 507–521

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *Endocrinology* 145(9),4073-7.

Grams AE, Gempt J, Stahl A, Forschler A. (2010) Female pituitary size in relation to age and hormonal factors. *Neuroendocrinology* 92, 128–132.

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, 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.

Groome N.P., Illingworth P.J., O'Brien M., (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40(6), 717-723.

Gross K.M., Matsumoto A.M., Bremner W.J. (1987) Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by luteinizing hormone-releasing hormone pulse frequency in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64(4), 675-680.

Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ellis TR, Paul SJ, Marshall JC (1990) Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by GnRH pulse amplitude in female rats. *Endocrinology* 127,2869-2875.

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.

Hall JE. (2004) Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 33(4),637-59.

Hall J., Schoenfeld D., Martin K.A. (1992) Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 74,600-607.

Hall J.E., Taylor A.E., Martin K.A. (1994) Decreased release of gonadotropin-releasing hormone during the preovulatory midcycle luteinizing hormone surge in normal women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15), 6894-6898.

Harlow, S.D., Gass, M., Hall, J.E., Lobo, R., Maki, P., Rebar, R.W., Sherman, S., Sluss, P.M., de Villiers, T.J.; STRAW + 10 Collaborative Group. (2012) Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, 1159-1168.

Hayes F.J., Hall J.E., Boepple P.A., Crowley Jr. W.F.(1998) Clinical review 96: differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 83(6),1835-1841.

Hillier, S.G. (1994) Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction*, 9, 188-191.

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 β 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.

Iliff-Sizemore SA, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Krueger KA, Marshall JC (1990) Testosterone differentially modulates gonadotropin subunit mRNA responses to GnRH pulse amplitude. *Endocrinology* 127,2876-2883.

Inkster SE, Brodie AMH (1991) Expression of aromatase cytochrome P-450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 73,717-726.

Jennes L., Stumpf W., Sheedy M. (1985) Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *J Comp Neurol* 232,534-547.

Jeong K.-H., Kaiser U.B. (2006) Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: Neill J.D., ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1,1635-1701.

Jiroutek MR, Chen M-H, Johnston CC, Longcope C (1998) Changes in reproductive hormones and sex hormone-binding globulin in a group of postmenopausal women measured over 10 years. *Menopause* 5,90-94.

Judd HL, Judd GE, Lucas WE, Yen SSC (1974a) Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. *J Clin Endocrinol Metab* 39,1020-1024.

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

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

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.

Kauffman A. (2004) Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol* 16,794-806.

Kempers RD, Ryan RJ (1977) Acute effects of intravenous infusion of 17 β -estradiol and 17 α -hydroxyprogesterone on gonadotropin release. *Fertil Steril* 28,631-637.

Keye WR Jr and 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 progestin receptors is centrally positioned within the total population of LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 61,265-275.

Klein N.A., Battaglia D.E., Clifton D.K. (1996) The gonadotropin secretion pattern in normal women of advanced reproductive age in relation to the monotropic FSH rise. *J Soc Gynecol Investig* 3(1),27-32.

Klein, N.A., Battaglia, D.E., Fujimoto, V.Y., Davis, G.S., Bremner, W.J., Soules, M.R. (1996) Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development

associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 1038-1045.

Klein, N.A., Battaglia, D.E., Miller, P.B., Branigan, E.F., Giudice, L.C., Soules, M.R. (1996) Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 1946-1951.

Klein, N.A., Battaglia, D.E., Miller, P.B., Soules, M.R. (1996) Circulating levels of growth hormone, insulin-like growth factor-I and growth hormone binding protein in normal women of advanced reproductive age. *Clinical Endocrinology*, 44, 285-292.

Klein, N.A., Illingworth, P.J., Groome, N.P., McNeilly, A.S., Battaglia, D.E., Soules, M.R. (1996) Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 2742-2745.

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

Kwekkeboom DJ, de Jong FH, vanHemert AM, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA, Lamberts SWJ (1990) Serum gonadotropins and α -subunit decline in aging normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 70,944-950.

La Marca, A., De Leo, V., Giulini, S., Orvieto, R., Malmusi, S., Giannella, L., Volpe, A. (2005) Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 545–548.

La Marca, A., Stabile, G., Arsenio, A.C.(2006) Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Human Reproduction*, 21, 3103-3107

Lachelin GC, Yen SS. (1978) Biphasic change in pituitary capacity induced by estrogen in hypogonadal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 46(3), 369-73.

Lachelin GC, Yen SS. (1978) Hypothalamic chronic anovulation. *Am J Obstet Gynecol.* 1,130(7),825-31.

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

Lambalk B, de Boer L, Schoute E, Popp-Snyders C, Schoemaker J (1997) Post-menopausal and chronological age have divergent effects on pituitary and hypothalamic function in episodic gonadotropin secretion. *Clin Endocrinol* 46,439-443.

Landgren BM, Collins A, Csemiczky G, Burger HG, Baksheev L, Robertson DM. (2004) Menopause transition: Annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6),2763-9.

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.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D, von Mühlen D (2000) Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo study. *J Clin Endocrinol Metab* 85,645-651.

Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D and 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.

Lee SJ, Lenton EA, Sexton L and Cooke ID (1988) The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* 3,851–855.

Legan SJ and 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.

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.

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.

Longcope C, Baker S (1993) Androgen and estrogen dynamics: relationships with age, weight, and menopausal status. *J Clin Endocrinol Metab* 76,601-604.

Longcope C, Franz C, Morello C, Baker R, Johnston CC Jr (1986) Steroid and gonadotropin levels in women during the peri-menopausal years. *Maturitas* 8:189-196.

Longcope C, Hunter R, Franz C (1980) Steroid secretion by the postmenopausal ovary. *Am J Obstet Gynecol* 138,564-568.

Lutjen PJ, Findlay JK, Trounson AO, Leeton JF and 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(4),507-13.

Marks J., Porte D.J., Stahl W. (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127,3234-3236.

Marshall J., Griffin M. (1993) The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod* 8 (Suppl 2) 57-61.

Mattingly RF, Huang WY (1969) Steroidogenesis of the menopausal and postmenopausal ovary. *Am J Obstet Gynecol* 103,679-693.

McCartney C.R., Gingrich M.B., Hu Y. (2002) Hypothalamic regulation of cyclic ovulation: evidence that the increase in gonadotropin-releasing hormone pulse frequency during the follicular phase reflects the gradual loss of the restraining effects of progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 87(5),2194-2200.

Meldrum DR, Davidson BJ, Tataryn IV, Judd HL (1981) Changes in circulating steroids with aging in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 57,624-628.

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

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, 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, 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, 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, Messini CI, Dafopoulos K. (2010) The role of gonadotropins in the follicular phase. Ann N Y Acad Sci. 1205,5-11.

Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. (2014) Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. Reprod Biomed Online. 28(6),714-722.

Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. Ann N Y Acad Sci. 2010 Sep,1205:5-11.

Messinis IE, Milingos S, Alexandris E, Mademtzis I, Kollios G, Seferiadis K (2002) Evidence of differential control of FSH and LH responses to GnRH by ovarian steroids in the luteal phase of the cycle. Hum Reprod 17,299-303.

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

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(6),1076-80.

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 AA. (1990) Effects of supraphysiological concentrations of progesterone on the characteristics of the oestradiol-induced gonadotrophin surge in women. *J Reprod Fertil*. 88(2),513-9.

Messinis, I.E. (2006) Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91, 641-645.

Messinis, I.E. (2006) From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 49-56.

Messinis, I.E. (2006) Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, 12, 557-571.

Messinis, I.E., Lolis, D., Zikopoulos, K. et al. (1994) Effect of an increase in FSH on the production of gonadotrophin-surge-attenuating factor in women. *Journal of Reproduction & Fertility*, 101, 689-695.

Messinis, I.E., Milingos, S., Zikopoulos, K.(1998) Luteinizing hormone response to gonadotrophin-releasing hormone in normal women undergoing ovulation induction with urinary or recombinant follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*, 13, 2415-2420.

Messinis, I.E., Templeton, A. & Baird, D.T. (1985) Endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with sequential use of clomiphene citrate and pulsatile human menopausal gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 61, 1076-1080.

Monroe SE, Jaffe RB and Midgley AR Jr (1972a) Regulation of human gonadotropins.XII. Increase in serum gonadotropins in response to estradiol.*J Clin Endocrinol Metab* 34,342–347.

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.

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.

Nagamani M, Hannigan EV, Dillard EA Jr, Van Dinh T (1986) Ovarian steroid secretion in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 62,508-512.

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.

Nakano R, Shima K, Yamoto M, Kobayashi M, Nishimori K, Hiraoka J (1989) Binding sites for gonadotropins in human postmenopausal ovaries. *Obstet Gynecol* 73,196-200.

Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M.(2004) Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54.*Endocrinology* 146(1) 156-63.

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.

Noth RH, Mazzaferri EL. Age and the endocrine system. *Clin Geriatr Med.* 1985,1(1),223-50.

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.

Osterlund M., Hurd Y.L. (2001) Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 64,251-267.

Ottowitz W.E., Dougherty D.D., Fischman A.J., Hall J.E. (2008) FDG-PET reveals differential sites of estrogen negative and positive feedback on luteinizing hormone secretion in women. *J Clin Endocrinol Metab* 93(8),3208-3214.

Overlie, I., Morkrid, L., Andersson, A.M., Skakkebaek, N.E., Moen, M.H., Holte, A. (2005) Inhibin A and B as markers of menopause: a five-year prospective longitudinal study of hormonal changes during the menopausal transition. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 84, 281-285.

Padmanabhan V, Battaglia D, Brown MB, Karsch FJ, Lee JS, Pan W, Phillips DJand Van Cleeff J (2002) Neuroendocrine control of follicle-stimulatinghormone

(FSH) secretion. II. Is follistatin-induced suppression of FSH secretion mediated via changes in activin availability and does it involve changes in gonadotropin-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 66,1395–1402.

Pappa, A., Seferiadis, K., Fotsis, T. (1999) Purification of a candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid. *Human Reproduction*, 14, 1449-1456.

Peluso JJ, Steger RW, Jaszczak S, Hafez ESE (1976) Gonadotropin binding sites in human postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* 27,789-795.

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 and Shahab M (2002) Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates. *Physiol Behav* 77,717–722.

Plant TM, Krey LC, Moossy J, McCormack JT, Hess DL, Knobil E (1978) The arcuate nucleus and the control of gonadotropin and prolactin secretion in the female rhesus monkey (*maccaca mulatta*). *Endocrinology* 101,52-62.

Plotz EJ, Wiener M, Stein AA, Hahn RD (1967) Enzymatic activities related to steroidogenesis in postmenopausal ovaries of patients with and without endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 99,182-197.

Pohl CR, Richardson DW, Hutchinson JS, Germak LA, Knobil E (1983) Hypophysiotropic signal frequency and the functioning of the pituitary-ovarian system in the rhesus monkey. *Endocrinology* 112,2076-2080.

Quyyumi SA, Pinkerton JV, Evans WS and Veldhuis JD (1993) Estradiol amplifies the amount of luteinizing hormone (LH) secreted in response to increasing doses of gonadotropin-releasing hormone by specifically augmenting the duration of evoked LH secretory events and hence their mass. *J Clin Endocrinol Metab* 76,594–600.

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.

Rance NE, McMullen NT, Smialek JE, Price DL, Young III WS (1990) Postmenopausal hypertrophy of neurons expressing the estrogen receptor gene in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 71,79-85.

Rance NE, Uswandi SV (1996) Gonadotropin-releasing hormone gene expression is increased in the medial basal hypothalamus of postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 81,3540-3546.

Randolph, J.F. Jr, Zheng, H., Sowers, M.R., Crandall, C., Crawford, S., Gold, E.B., Vuga, M. (2011) Change in follicle-stimulating hormone and estradiol across the menopausal transition: effect of age at the final menstrual period. *J Clin Endocrinol Metab*. 96(3),746-54.

Reame N., Luckas J., Ansbacher R. (2002) The hypothalamic GnRH pulse generator is altered in ovulatory, premenopausal women: evidence from 24 hr pulsatile LH studies. *Fertil Steril* 255,S97.

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

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.

Rossmannith WG, Handke-Vesely A, Wirth U, Scherbaum WA (1994b) Does the gonadotropin pulsatility of postmenopausal women represent the unrestrained hypothalamic-pituitary activity? *Eur J Endocrinol* 130,485-493.

Rossmannith WG, Reichelt C, Scherbaum WA (1994a) Neuroendocrinology of aging in humans: attenuated sensitivity to sex steroid feedback in elderly postmenopausal women. *Neuroendocrinology* 59:355-362.

Rossmannith WG, Scherbaum WA, Lauritzen (1991) Gonadotropin secretion during aging in postmenopausal women. *Neuroendocrinology* 54,211-218.

Santoro N, Banwell T, Tortoriello D, Lieman H, Adel T, Skurnick J (1998) Effects of aging and gonadal failure on the hypothalamic-pituitary axis in women. *Am J Obstet Gynecol* 178,732-741.

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

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

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

Schreihofner DA, Stoler MH and 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.

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

Scott C., Tilbrook A., Rawson J. (2000) Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci* 60-61,313-326

Sehested, A., Juul, A.A., Andersson, A.M. (2000) Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing

hormone, and estradiol levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 1634-1640.

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.

Shaw ND, Srouji SS, Histed SN, Hall JE. (2011) Differential effects of aging on estrogen negative and positive feedback. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.301(2),E351-5.

Shaw ND, Srouji SS, Histed SN, McCurnin KE, Hall JE. (2009) Aging attenuates the pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*.94(9),3259-64.

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.

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.

Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE (1999) Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140:,5195-5201.

Smanik EJ, Young HK, Muldoon TG, Mahesh VB. (1983) Analysis of the effect of progesterone in vivo on estrogen receptor distribution in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology*. 113(1),15-22.

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 MR, Battaglia DE and Klein NA (1998) Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* 30,193–204.

Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. (2001) Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric* 4:,267–272.

Soules M.R., Steiner R.A., Clifton D.K (1984) Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 58(2),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.

Stouffer R.L., Dahl K.D., Hess D.L. (1994) Systemic and intraluteal infusion of inhibin A or activin A in rhesus monkeys during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 50(4),888-895.

Tavoulari, S., Frilingos, S., Karatza, P. et al. (2004) The recombinant subdomain III B of human serum albumin displays activity of gonadotrophin surge-attenuating factor. *Human Reproduction*, 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.

Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC (2008) A role for kisspeptins in the

regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *N Engl J Med.* 14;358(7),709-15.

Terano T, Seya A, Tamura Y, Yoshida S, Hirayama T (1996) Characteristics of the pituitary gland in elderly subjects from magnetic resonance images: relationship to pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol (Oxf).* 45(3),273-9.

Terasawa E, Noonan J and Bridson WE (1982) Anaesthesia with pentobarbitone blocks the progesterone-induced luteinizing hormone surge in the ovariectomized rhesus monkey. *J Endocrinol* 92,327–339.

Thatcher SS, Naftolin F (1991) The aging and aged ovary. *Semin Reprod Endocrinol* 9,189-199.

Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16(10),850-8.

Tilbrook AJ, Clarke IJ and de Kretser DM (1995) Human recombinant follistatin - 288 suppresses plasma concentrations of follicle-stimulating hormone but is not a significant regulator of luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* 53,1353–1358.

Tilbrook AJ, De Kretser DM and Clarke IJ (1993) Human recombinant inhibin A suppresses plasma follicle-stimulating hormone to intact levels but has no effect on luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* 49,779–788.

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.

Turzillo AM, Clapper JA, Moss GE, Nett TM (1998) Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil.* 113(2),251-6.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Mendez JP (2001) Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. Hum Reprod 16,599-604.

Urban RJ, Padmanabham V, Beitins I, Veldhuis JD (1991) Metabolic clearance of human follicle-stimulating hormone assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay, and in vitro Sertoli cell bioassay. J Clin Endocrinol Metab 73,818-823.

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.

van Liempt, S.W., van Rheenen-Flach, L.E., van Waesberghe, J.H., Bleeker, M.C., Piek, J.M., Lambalk, C.B. (2012) Solely inhibin B-producing ovarian tumour as a cause of secondary amenorrhoea with hot flushes: case report and review of literature. Hum.Reprod. 27, 1144–1148.

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong F and Themmen AP (2002) Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Hum Reprod 17,3065–3071.

van Santbrink EJ, Hop WC, van Dessel TJ, de Jong FH and Fauser BC (1995) Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. Fertil Steril 64,37–43.

Veldhuis JD, Carlson ML, Johnson ML (1987) The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous

multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 84,7686-7690.

Velghuis 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.

Visser, J.A., de Jong, F.H., Laven, J.S. (2006) Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131, 1-9.

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.

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC and Themmen AP (2004) Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 10,77–83.

Wehrenberg WB, Wardlaw SL, Frantz AG and Ferin M (1982) beta-Endorphin in hypophyseal portal blood: variations throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 111,879–881.

Welt CK, Hall JE, Adams JM and Taylor AE (2005a) Relationship of estradiol and inhibin to the follicle-stimulating hormone variability in hypergonadotropic hypogonadism or premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 90,826–830.

Welt C.K., Martin K.A., Taylor A.E. (1997) Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8),2645-2652.

Welt C.K., Pagan Y.L., Smith P.C. (2003) Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 88(4),1766-1771.

Welt C.K., Schneyer A.L. (2001) Differential regulation of inhibin B and inhibin A by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 86(1),330-336.

Welt C.K., Smith Z.A., Pauler D.K., Hall J.E. (2001) Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6),2531-2537.

Welt, C.K., Adams, J.M., Sluss, P.M., Hall, J.E. (1999) Inhibin A and inhibin B responses to gonadotropin withdrawal depends on stage of follicle development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 2163-2169.

Westergaard LW, Christensen IJ and McNatty KP (1986) Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during normal menstrual cycle in women *Human Reproduction* 1, 227–232

Wide L, Nilsson SJ, Gemzell C, Roos P (1973) Radioimmunoabsorbent assay of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum and urine from men and women. *Acta Endocrinol* 174,53-58.

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.

Winter JS and Faiman C (1973) The development of cyclic pituitary-gonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab* 37,714–718.

Wise PM 1987 The role of the hypothalamus in aging of the female reproductive system. *J Steroid Biochem* 27,713–719

Witkin J. (1996) Effects of ovariectomy on GnRH neuronal morphology in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol* 8,601-604.

Witkin J., Demasio K. (1990) Ultrastructural differences between smooth and thorny gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroscience* 34,777-783.

Wittkowski W., Bockmann J., Kreutz M.R. (1999) Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185,157-194.

World Health Organization 1996, Research on the Menopause in the 1990s. Technical report Scr 866, Geneva, Switzerland.

Wray S., Fueshko S., Kusano K. (1996) GABAergic neurons in the embryonic olfactory pit/vomer nasal organ: Maintenance of functional GABAergic synapses in olfactory explants. *Dev Biol* 180,631-645.

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

Yin P, Kawashima K and Arita J (2002) Direct actions of estradiol on the anterior pituitary gland are required for hypothalamus-dependent lactotrope proliferation and secretory surges of luteinizing hormone but not of prolactin in female rats. *Neuroendocrinology* 75,392–401.

Young JR and 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.

Young W., Goy R., Phoenix C. (1964) Hormones and sexual behavior. *Science* 143,212-218.

Zavos, A., Dafopoulos, K., Messini, C.I., Georgoulas, P., Verikouki, C., Anifandis, G., Garas, A., Messinis, I.E. (2013) The progesterone positive feedback effect in women after ovariectomy. *Gynecol. Endocrinol.* 29, 254–258.

Zhu X., Gleiberman A., Rosenfeld M. (2007) Molecular physiology of pituitary development: Signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87,933-963.

