



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Αλέξανδρος Ι. Δαπόντε

Διδακτορική Διατριβή

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΧΑΜΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΥΠΟ
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ»**

υπό

Μαρίας Χ. Μαλανδρή

Μαιευτήρας Γυναικολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 Μαρία Χ. Μαλανδρή

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5^η/18-12-2019 ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Ι. Μεσσήνης Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Α. Καλλιτσάρης, τ. Αναπλ. Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Κ. Νταφόπουλος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Α. Δαπόντε Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Γ. Συρογιαννόπουλος Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6^{ος} Εξεταστής	Π. Γεωργούλιας Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7^{ος} Εξεταστής	Γ. – Σ. Ανυφαντής Επίκ. Καθηγητής Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς και για το συνεχές και ειλικρινές του ενδιαφέρον, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της. Ο Καθηγητής κ. Ιωάννης Μεσσήνης υπήρξε βασικός πυλώνας της εκπαίδευσής μου τόσο κατά τη διάρκεια της ειδίκευσής μου στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας όσο και κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» και αποτελεί τιμή μου να είναι επιβλέπωντας στη διδακτορική μου διατριβή. Το ακαδημαϊκό και ερευνητικό του έργο αποτελεί και θα συνεχίσει να αποτελεί πηγή έμπνευσης για όλους τους νεότερους συναδέλφους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο και τον τ. Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους ως μέλη της τριμελούς μου επιτροπής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής κ. Παναγιώτη Γεωργούλια για την πραγματοποίηση των ορμονικών μετρήσεων των δειγμάτων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Αλέξανδρο Δαπόντε για τη συμβουλευτική του και για τη βοήθεια του ως μετέπειτα Διευθυντής της Κλινικής στην ολοκλήρωση μέρους των ορμονικών μετρήσεων.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Γεώργιο Συρογιαννόπουλο και στον Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας κ. Γεώργιο Ανυφαντή για την τιμή μου που έκαναν να συμμετέχουν στην επταμελή μου εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, ειδικά την κα. Χριστίνα Μεσσήνη, Λέκτορα Μαιευτικής Γυναικολογίας, την ευχαριστώ για τη συνεχή συμπαράσταση της και τη σημαντικότερη βοήθεια της στην ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών.

Παράλληλα, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Χρήστο και Δήμητρα και στον αδελφό μου Παναγιώτη για την ηθική και πρακτική τους υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την ανιδιοτελή τους αγάπη. Χωρίς αυτούς και ό,τι αυτοί συνεπάγονται δε θα μπορούσα να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύζυγο μου Δημοσθένη Τσιτούρα που πίστεψε ότι θα τα καταφέρω και με έκανε να πιστέψω ότι θα τα καταφέρω και στο γιο μου που, αν και δεν το γνωρίζει ακόμα, αποτελεί την κινητήριου δύναμη μου.

Μαρία Χ. Μαλανδρή

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Γεννήθηκα στην Θεσσαλονίκη και αποφοίτησα από το Πειραματικό Σχολείο Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης το 1999. Διατηρώ ιδιωτικό Μαιευτικό-Γυναικολογικό ιατρείο στην Αρναία Χαλκιδικής από το 2015. Είμαι πτυχιούχος της Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ και διπλωματούχος Μεταπτυχιακών Τίτλων: 1) «Σύγχρονες Ιατρικές Πράξεις: Δικαιική Ρύθμιση και Βιοηθική Διάσταση», Α.Π.Θ, 2013 και 2) «Βιολογία της Αναπαραγωγής», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2008. Ολοκλήρωσα την υπηρεσία Υπαίθρου ως αγροτικός ιατρός στο Κ.Υ Τυρνάβου. Ειδικεύτηκα στην Γενική Χειρουργική στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και στην Μαιευτική-Γυναικολογία διαδοχικά στα Νοσοκομεία Σερρών και Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Έλαβα τον τίτλο ειδικότητας Μαιευτικής-Γυναικολογίας το 2015. Μετεκπαιδεύτηκα στην Λαπαροσκοπική Χειρουργική σε Γυναικολογία στο World Laparoscopy Hospital, Gurgaon, Haryana, India. Εχω διδάξει στην Σχολή Βοηθών Νοσηλευτών Γενικού Νοσοκομείου Σερρών και στο Θεσσαλικό Ινστιτούτο Επαγγελματικής Κατάρτισης στην Λάρισα σε σπουδαστές Νοσηλευτικής. Εχω εργαστεί στην Ψυχιατρική κλινική «Αγία Φωτεινή» στην Λάρισα και στο Ιατρικό κέντρο Αποκατάστασης- Αποθεραπείας «Αναγέννηση» στην Θεσσαλονίκη ως ανειδίκευτος ιατρός. Από τον Οκτώβριο 2015 εξειδικεύομαι στον τομέα της Αναπαραγωγικής Ιατρικής στην μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής της Α' Μ/Γ του Γ.Ν.Παπαγεωργίου.

Συμμετείχα σε πλήθος Συνεδρίων και πρακτικών Σεμιναρίων καθώς και στην συγγραφή προφορικών και αναρτημένων ανακοινώσεων τόσο σε Ελληνικά όσο και σε διεθνή συνέδρια. Δημοσιεύσεις σε ελληνικά και διεθνή Ιατρικά περιοδικά.

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΧΑΜΗΛΩΝ ΔΟΣΕΩΝ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ
ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ»**

Μαρία Χ. Μαλανδρή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ιωάννης Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων
2. **Αθανάσιος Καλλιτσάρης**, τ. Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος
3. **Κωνσταντίνος Νταφόπουλος**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος

Περίληψη

Η γκρελίνη αποτελεί ένα ορμονικό πεπτίδιο που αποτελείται από 28 αμινοξέα και παράγεται κατά κύριο λόγο από το στόμαχο, αλλά έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, όπως είναι το πάγκρεας, οι νεφροί, οι πνεύμονες, ο υποθάλαμος, η υπόφυση και οι γονάδες. Η γκρελίνη αποτελεί τον ενδογενή παράγοντα (ligand) για τον υποδοχέα των εκκριτογόνων αναλόγων της αυξητικής ορμόνης και κατά συνέπεια αποτελεί ισχυρό διεγέρτη έκκρισης της τελευταίας. Το γεγονός ότι η γκρελίνη εκκρίνεται όχι μόνο από το στόμαχο, αλλά εκφράζεται και σε άλλους ιστούς σημαίνει ότι ασκεί διάφορες ενδοκρινείς, εξωκρινείς και παρακρινείς επιδράσεις στους ιστούς αυτούς. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η γκρελίνη επηρεάζει και την αναπαραγωγική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού κυρίως μέσα από τις δράσεις της στην υπόφυση και στις ωοθήκες. Η παρούσα μελέτη έγινε προκειμένου να διερευνηθεί **1)** Ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης, **2)** Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών και ποιος είναι ο ρόλος των οιστρογόνων σε αυτή τη λειτουργία της και **3)** Ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη διεγερόμενη έκκριση της προλακτίνης.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες γυναικών. Η πρώτη περιέλαβε 10 υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (ομάδα 1) και η δεύτερη 10 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ομάδα 2). Χρησιμοποιήθηκαν δύο «υπομέγιστες» (submaximal) δόσεις γκρελίνης.

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι η διεγερτική επίδραση δύο διαδοχικών «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης: 1) δεν επηρεάζεται από το οιστρογονικό περιβάλλον, 2) σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, αλλά όχι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καταστέλλει την ημερήσια έκκριση των γοναδοτροπινών, η δράση δε αυτή ενισχύεται από την οιστραδιόλη και 3) σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αυξάνει την έκκριση της προλακτίνης από την υπόφυση, η επίδραση δε αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής παρουσία υψηλών επιπέδων οιστρογόνων στην κυκλοφορία. Πιθανολογείται ότι η οιστραδιόλη αλληλεπιδρά με τη γκρελίνη στην έκκριση υποφυσιακών ορμονών. Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας παρέχουν

νέες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της γκρελίνης στην έκκριση των ορμονών του πρόσθιου λοβού της υποφύσεως γυναικών.

Στους αγαπημένους μου γονείς...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
----	----------	----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.	Αυξητική ορμόνη GH-γενικά	25
3.	Συνοπτικά στοιχεία για τη GHRH	28
4.	Συνοπτικά στοιχεία για τη σωματοστατίνη (SST/SRIH)	30
5.	Αναλυτικά στοιχεία για τη γκρελίνη	32
5.1.	Ιστορικά Στοιχεία	32
5.2.	Δομή της γκρελίνης	34
5.3.	Γονίδιο της γκρελίνης	37
5.4.	Παραγωγή και έκκριση της γκρελίνης	39
5.5.	Υποδοχέας της γκρελίνης (GHS-R)	41
5.6.	Δράσεις της γκρελίνης	43
	I. Γενικά	43

II. Γκρελίνη και αυξητική ορμόνη	44
III. Επίδραση της γκρελίνης στην όρεξη	46
IV. Πιθανές κλινικές εφαρμογές της γκρελίνης των ανταγωνιστών της σε καταστάσεις με διαταραγμένη έκκριση αυξητικής ορμόνης που σχετίζονται με την πρόσληψη τη μη πρόσληψη τροφής	49
A) Παχυσαρκία	49
B) Νευρογενής ανορεξία	52
V. Επίδραση της γκρελίνης στο μεταβολισμό του οργανισμού	53
VI. Επίδραση γκρελίνης στο αναπαραγωγικό σύστημα γυναικών και ανδρών	54
1. Γκρελίνη και εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών	55
2. Γκρελίνη και έκκριση γοναδοτροπινών	55
3. Γκρελίνη και στεροειδείς ορμόνες του φύλου	57
4. Γκρελίνη και ωθητική στεροειδογένεση	59
5. Γκρελίνη και πολλαπλασιασμός και απόπτωση ωθητικών Κυττάρων	60
6. Γκρελίνη και ωρίμανση του ωοθυλακίου, ανάπτυξη του εμβρύου και κύηση	60
7. Γκρελίνη και ανδρικό γεννητικό σύστημα (συνοπτικά)	62
VII. Συνοπτικά άλλες δράσεις της γκρελίνης	64
6. Σκοπός της εργασίας	67

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
8.	ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	77
9.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	78
10.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	79
11.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	95
12.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	106
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	108
	SUMMARY	111
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	114

1. Πρόλογος

Η γκρελίνη αποτελεί ένα ορμονικό πεπτίδιο που αποτελείται από 28 αμινοξέα . Η ανακάλυψή της έγινε το 1999 από Ιάπωνες ερευνητές, οι οποίοι την απομόνωσαν από το στόμαχο αρουραίων. Κύτταρα που παράγουν γκρελίνη εντοπίζονται σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση τους στο βλενογόνο του στομάχου. Μικρότερα ποσοστά γκρελίνης ανιχνεύονται στον υποθάλαμο και στην υπόφυση, στον πνεύμονα, στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στο νεφρό, στο μαστό, στο θυρεοειδή αδένα, στην καρδιά και στις γονάδες. Αυτό υποδεικνύει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο της γκρελίνης στις παθοφυσιολογικές διαδικασίες στους ιστούς αυτούς. Η γκρελίνη αποτελεί τον ενδογενή συνδέτη (ligand) του υποδοχέα εκκριτογόνων αναλόγων της αυξητικής ορμόνης και κατά συνέπεια αποτελεί ισχυρό διεγέρτη έκκρισης της τελευταίας. Ένας από τους κύριους ρόλους της γκρελίνης είναι η διέγερση της όρεξης. Επιπλέον, σημαντική είναι η δράση της στη ρύθμιση του μεταβολισμού μέσα από την επίδραση της στην έκκριση της ινσουλίνης και στη διέγερση της νεογλυκογένεσης. Σημαντικός είναι ο ρόλος της γκρελίνης και στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, γαστρεντερικό και ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και στη διαδικασία του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και απόπτωσης των κυτάρων.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξαν ότι η γκρελίνη επηρεάζει και το αναπαραγωγικό σύστημα, τόσο το γυναικείο όσο και το ανδρικό. Το κατά πόσο η από την γκρελίνη έκκριση της αυξητικής ορμόνης επηρεάζεται από τα οιστρογόνα είναι ένα πεδίο έρευνας με αντιφατικά μέχρι στιγμής αποτελέσματα. Από τις μελέτες προκύπτει είτε ότι τα ενδογενή από τα εξωγενή οιστρογόνα επηρεάζουν διαφορετικά αυτή τη δράση της γκρελίνης είτε ότι η δοσολογία της χορηγούμενης γκρελίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει προσπάθεια να διευκρινιστεί το κατά πόσο τα οιστρογόνα επηρεάζουν την επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών και μέχρι σήμερα, δεν έχει δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό.

Το πρωτόκολλο, που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή, έχει ως σκοπό να εξετάσει την επίδραση χαμηλών δόσεων γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης καθώς και στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών παρουσία διαφορετικού

οιστρογονικού περιβάλλοντος. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αρχικά υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Μεσσήνη και ολοκληρώθηκε στην ίδια κλινική υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή κ. Αλέξανδρου Δαπόντε. Οι μετρήσεις των ορμονών πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας υπό τη διεύθυνση του Αναπληρωτή Καθηγητή Παναγιώτη Γεωργούλια.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς και για το συνεχές και ειλικρινές του ενδιαφέρον, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Ο Καθηγητής κ. Ιωάννης Μεσσήνης υπήρξε βασικός πυλώνας της εκπαίδευσης μου τόσο κατά τη διάρκεια της ειδίκευσης μου στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας όσο και κατά τη διάρκεια της φοίτησης μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής» και αποτελεί τιμή μου να είναι επιβλέπωντας στη διδακτορική μου διατριβή. Το ακαδημαϊκό και ερευνητικό του έργο αποτελεί και θα συνεχίσει να αποτελεί πηγή έμπνευσης για όλους τους νεώτερους συναδέλφους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους ως μέλη στην τριμελή μου επιτροπή. Θερμές ευχαριστίες και (.....) για την τιμή μου που έκαναν να συμμετέχουν στην επταμελή μου εξεταστική επιτροπή. Ειδικά την κ. Χριστίνα Μεσσήνη την ευχαριστώ και για τη συνεχή συμπαράσταση της και τη σημαντικότερη βοήθεια της στην ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής κ. Παναγιώτη Γεωργούλια για την πραγματοποίηση των ορμονικών μετρήσεων των δειγμάτων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας κ. Αλέξανδρο Δαπόντε για τη συμβουλευτική του και για τη βοήθεια του

ως μετέπειτα Διευθυντής της Κλινικής στην ολοκλήρωση μέρους των ορμονικών μετρήσεων.

Παράλληλα, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Χρήστο και Δήμητρα και στον αδελφό μου Παναγιώτη για την ηθική και πρακτική τους υποστήριξη, την ενθάρρυνση και την ανιδιοτελή τους αγάπη. Χωρίς αυτούς και ό,τι αυτοί συνεπάγονται δε θα μπορούσα να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή.

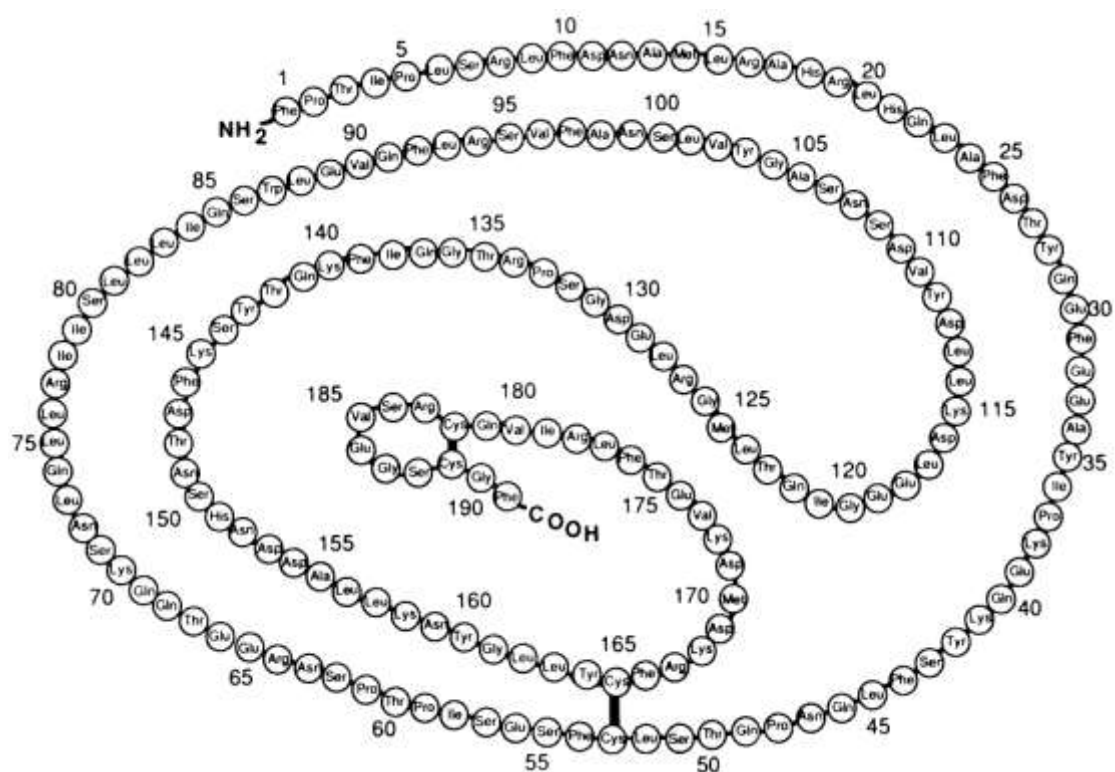
Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύζυγο μου Δημοσθένη Τσιτούρα που πίστεψε ότι θα τα καταφέρω και με έκανε να πιστέψω ότι θα τα καταφέρω και στο γιο μου που, αν και δε το γνωρίζει ακόμα, αποτελεί την κινητήριο δύναμη μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Αυξητική ορμόνη GH- γενικά

Η αυξητική ορμόνη συντίθεται και εκκρίνεται από τα σωματοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Αποτελείται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 191 αμινοξέων με δύο δισουλφιδικές γέφυρες και χωρίς τμήματα υδατανθράκων. Στην δευτεροταγή της δομή είναι κυρίως με την μορφή της α-έλικας (Cogan and Philips, 2000). Η ανακάλυψη της έγινε το 1921 από τους Evans και Long ως μία ουσία που υπάρχει στην υπόφυση των βοοειδών, της οποίας η τρίμηνη χορήγηση σε αρουραίους προκάλεσε αύξηση της ανάπτυξης των τελευταίων.

Στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν αναγνωριστεί αρκετές ισομορφές της αυξητικής ορμόνης, με κύρια αυτή με μοριακό βάρος 22kDa (70-75% της συνολικής κυκλοφορίας) (De Palo et al., 2006).



Σχήμα 1. Δισδιάστατη μορφή αλληλουχίας αμινοξέων ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (Mullis et al., 2002).

Το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης στον άνθρωπο εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17q 22-24) και αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια. Στην πραγματικότητα πρόκειται για πέντε παρόμοια γονίδια, που μόνο το ένα (GH-N) σχετίζεται με την παραγωγή της αυξητικής ορμόνης (Cooke et al., 1988).

Η έκκριση της αυξητικής ορμόνης γίνεται κατά ώσεις με συχνότητα από 10 έως 20 ώσεις το 24ωρο και ακολουθεί τον κερκάδιο ρυθμό. Η νυχτερινή αύξηση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης είναι κύριο χαρακτηριστικό της παλμικής έκκρισής της, με εκκριτικές αιχμές κάθε 1 με 2 ώρες και με μέγιστες τιμές κατά τη διάρκεια των βραδέων κυμάτων του ύπνου (3η-4η φάση του ύπνου) (Roelfsema et al., 2001). Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν επίπεδα βασικής έκκρισης GH μεταξύ των εκκριτικών αιχμών (Iranmanesh et al., 1994). Αυτοί οι δύο διαφορετικοί τρόποι έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (παλμικός και βασικός) ασκούν διαφορετική ρυθμιστική επίδραση στους ιστούς (Veldhuis et al., 2001).

Η μέχρι στιγμής βιβλιογραφία σχετικά με τους ακριβείς μηχανισμούς έκκρισης της αυξητικής ορμόνης παρέχει αντιφατικά δεδομένα. Μέχρι πριν από λίγα χρόνια πιστεύονταν ότι η ρύθμιση της υπόκεινταν στον έλεγχο κυρίως δύο υποθαλαμικών ορμονών, της εκλυτικής ορμόνης της GH (GHRH) και της σωματοστατίνης (SRIF), με την πρώτη να ασκεί διεγερτικό ρόλο και τη δεύτερη ανασταλτικό ρόλο στην έκκριση της GH (Thorner et al., 1997). Πλέον γνωρίζουμε ότι ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει και η γκρελίνη, είτε διεγείροντας απευθείας την έκκριση της GH είτε δρώντας σε κύτταρα του υποθαλάμου διεγείροντας την έκκριση της GHRH (van der Lely et al., 2004). Ποικίλοι άλλοι παράγοντες, όπως νευροπεπτίδια και νευροδιαδιβαστές, περιφερικές ορμόνες, μεταβολικά και θρεπτικά σήματα, παλίνδρομοι μηχανισμοί (κυρίως ο GH-IGF παλίνδρομος άξονας), ο ύπνος, η άσκηση, το σωματικό και ψυχολογικό stress σχετίζονται με την έκκριση της GH (Wagner et al., 2009).

Σχετικά με την κατά ώσεις έκκριση της GH, οι ερευνητές υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης με την κατά ώσεις έκκριση της GHRH και της SRIF στην πυλαία κυκλοφορία της υπόφυσης, χωρίς αυτό να είναι τεκμηριώμενο (Frohman et al., 1990).

Επίσης, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι δε μειώνεται η ένταση των νυχτερινών αιχμών της GH μετά τη χορήγηση αναλόγου σωματοστατίνης σε ανθρώπους (Dimaraki et al., 2001),

κάτι που μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη παράγοντα ο οποίος πιθανόν να ανταγωνίζεται τη δράση της σωματοστατίνης. Από την άλλη, ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο της GHRH συνεχίζουν να έχουν παλμική έκκριση της GH, γεγονός που επίσης μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη και άλλου ρυθμιστικού παράγοντα της παλμικής έκκρισης της τελευταίας (Maheshwari et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστημάτων GHRH και γκρελίνης σε υποθαλαμικό επίπεδο. Για παράδειγμα, πειράματα σε αρουραίους που έχουν μειωμένη έκφραση GHS-R στον τοξοειδή πυρήνα του υποθάλαμου, βρέθηκε τελικά να έχουν και μειωμένους νευρώνες που περιέχουν GHRH (Mano-Otagiri et al., 2006). Έρευνα του 2005 υποστηρίζει ότι η γκρελίνη νηστείας είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της βασικής και παλμικής έκκρισης GH (Misra et al., 2005). Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες στις οποίες δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων επιπέδων GH και γκρελίνης (Avram et al., 2005, Espelund et al., 2005).

Ο ρυθμός έκκρισης της αυξητικής ορμόνης φαίνεται ότι σχετίζεται αρνητικά με την αύξηση της ηλικίας. Μάλιστα, η παραγωγή της GH υπολογίζεται ότι μειώνεται με έναν ρυθμό περίπου 14% κάθε δεκαετία (Lanfranco et al., 2003). Η μείωση του ρυθμού έκκρισης της αυξητικής ορμόνης μάλλον σχετίζεται με την αντίστοιχη μείωση της GnRH (Lanfranco et al., 2003). Στους έφηβους παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός έκκρισης της ορμόνης, γεγονός που σχετίζεται με μεγαλύτερο αριθμό των εκκριτικών αιχμών έκκρισης και όχι με την να επιμήκυνση της διάρκειας της κάθε εκκριτικής αιχμής (Veldhuis et al., 2001).

3. Συνοπτικά στοιχεία για τη GHRH

Η GHRH αποτελεί μία υποθαλαμική ορμόνη με τους νευρώνες της να βρίσκονται κυρίως στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου και σε μικρότερο ποσοστό στον διάμεσο κοιλιακό πυρήνα και σε εξωυποθαλαμικές δομές (Petersenn and Schulte, 2000). Η ιστική κατανομή της υποδεικνύει και άλλες δράσεις της πέραν της απελευθέρωσης της GH. Ενδεικτικά, μελέτη παρουσιάζει τον ρόλο της GHRH στην προαγωγή του ύπνου και στη διέγερση της πρόσληψης τροφής (Lin-Su and Wajnrjch, 2002).

Η GHRH απομονώθηκε αρχικά από όγκους ανθρώπινων παγκρεατικών νησιδίων (Guillemin et al., 1982; Rivier et al., 1982). Η πρόδρομη GHRH πρωτεΐνη αποτελείται από 108 αμινοξέα (Lin-Su and Wajnrjch, 2002) και το γονίδιο της έχει χαρτογραφηθεί στην p12 ζώνη του χρωμοσώματος 20 (Mayo et al., 1985). Το εναλλακτικό μάτισμα του GHRH γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα εναλλακτικά-παραγόμενα πεπτίδια και η όλη διαδικασία εξαρτάται από τον ιστό στον οποίο θα εκφραστεί η ορμόνη (Muller et al., 1999). Ο υποδοχέας της GHRH ανήκει στην ομάδα των υποδοχέων που συνδέονται με τις G πρωτεΐνες.

Η ανάπτυξη στον άνθρωπο συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των σωματοτρόπων κυττάρων και η GHRH είναι ο βασικός ρυθμιστικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό αυτόν. Η GHRH όμως συνδέεται όχι μόνο με τον πολλαπλασιασμό αλλά και με τη λειτουργία των σωματοτρόπων κυττάρων αυξάνοντας την παραγωγή και την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από τα κύτταρα αυτά (Lin-Su and Wajnrjch, 2002). Ενδοφλέβια χορήγηση GHRH σε υγιείς εθελοντές με μέγιστη δόση χορήγησης το 1mg/kg προκαλεί δόσοεξαρτώμενη απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης στην υπόφυση. Η έκκριση της αυξητικής ορμόνης είναι ανιχνεύσιμη εντός πέντε λεπτών από την έγχυση της GHRH, φτάνει τις μέγιστες τιμές γύρω στα 15 λεπτά μετά και επιστρέφει στις αρχικές τιμές της μέσα σε 90-120 λεπτά (Giustina and Veldhuis, 1998). Μελέτες σε πάσχοντες από GHRH-παραγωγούς όγκους παρουσιάζουν υπερπλασία των σωματοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης, υπερέκκριση αυξητικής ορμόνης και επιταχυνόμενους ρυθμούς ανάπτυξης (Hammer et al., 1985). Έγχυση ανταγωνιστών της GHRH σε επίμυς μείωσε την παραγωγή της αυξητικής ορμόνης στα πειραματόζωα (Ono et al., 1991), ενώ από την άλλη έγχυση της ανθρώπινης GHRH διεγείρει άμεσα την απελευθέρωση της GH από την υπόφυση

(Cella et al., 1985). Παράλληλα, σε άτομα με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης βρέθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της GHRH, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της ίδιας της GHRH στον άνθρωπο δεν αναφέρονται μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία.

4. Συνοπτικά στοιχεία για τη σωματοστατίνη (SST/SRIH)

Η σωματοστατίνη πήρε την ονομασία της το 1973, όταν απομονώθηκε από τον υποθάλαμο ως ένα πεπτιδίο 14 αμινοξέων (Brazeau et al., 1973). Κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, αλλά και στα περισσότερα κύρια περιφερικά όργανα (Muller et al., 1999). Η σωματοστατίνη αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση και από εκεί προκύπτει και η συντομογραφία SRIH που σημαίνει ανασταλτική ορμόνη της απελευθέρωσης της σωματοστατίνης (somatotropin release-inhibiting hormone) (Brazeau et al., 1973).

Αρκετά χρόνια μετά την ανακάλυψη του αρχικού πεπτιδίου αποτελούμενου από 14 αμινοξέα (SST-14), οι ερευνητές ανακάλυψαν και μία δεύτερη βιοενεργή μορφή της σωματοστατίνης αποτελούμενη από 28 αμινοξέα (SST-28). Και οι δύο μορφές της σωματοστατίνης στα θηλαστικά προέρχονται από μια προορμόνη που ονομάζεται προσωματοστατίνη (proSST) και που μπορεί επίσης να αναστείλει την έκκριση GH (Patel, 1999). Η χαρτογράφηση του γονιδίου της σωματοστατίνης έγινε το 1983 από τους Naylor και τους συνεργάτες του. Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 3q28 και περιλαμβάνει δύο εξόνια (Naylor et al., 1983).

Οι βιολογικές δράσεις της σωματοστατίνης (SST-14 και η SST-28) ασκούνται μέσω 6 τουλάχιστον διαφορετικών υποδοχέων (SST-R1, 2a, 2b, 3, 4, και 5), οι οποίοι όλοι όμως ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (Olias et al., 2004).

Οι ανασταλτικές δράσεις της σωματοστατίνης στην έκκριση αυξητικής ορμόνης έχουν διερευνηθεί και επιβεβαιωθεί τόσο στον άνθρωπο όσο και πειραματόζωα. Σε μελέτες στις οποίες έγινε έγχυση σωματοστατίνης σε πειραματόζωα διαπιστώθηκε αυτόματη μείωση της έκκρισης της GH κατά τη διάρκεια της έγχυσης, αυτόματη έκκριση GH αμέσως μετά το τέλος της και άμεση απάντηση της GHRH. Κατά συνέπεια, η σωματοστατίνη δεν έχει επίδραση στην βιοσύνθεση της GH, αλλά απλώς αναστέλλει τον εκκριτικό μηχανισμό της τελευταίας με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της κατά τη διάρκεια της έγχυσης στα σωματοτρόπα κύτταρα. Στον άνθρωπο η έκκριση της GH μετά τη σωματοστατίνη δεν απαιτεί παρουσία GHRH (Rosenbloom, 2007). Έρευνα δείχνει ότι η σωματοστατίνη

μπορεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες ακόμα και να διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης μέσα από μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης της ίδιας (Muller et al., 1999).

5. Αναλυτικά στοιχεία για τη γκρελίνη

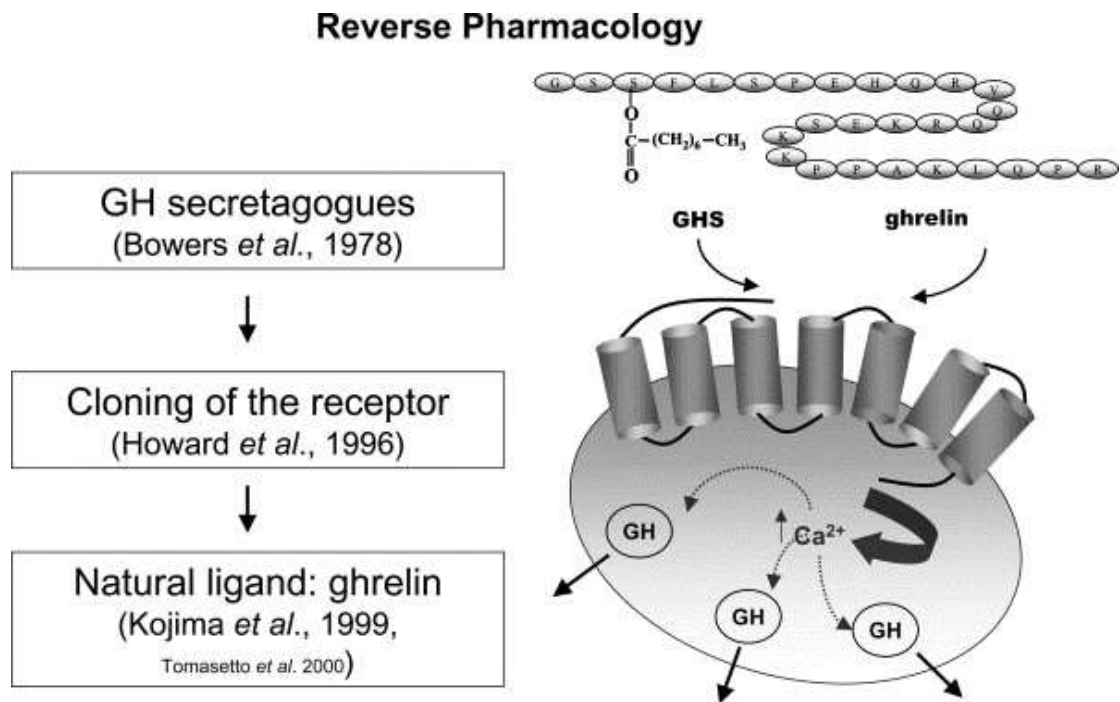
5.1. Ιστορικά Στοιχεία

Το 1976 οι Bowers και Momany παρατήρησαν ότι ορισμένα συνθετικά οπιοειδή παράγωγα παρουσίασαν ελαφρώς θετική επίδραση στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH-Growth Hormone) (Bowers et al., 1998). Αυτό τελικά οδήγησε στην παραγωγή εκκρηκτικών αναλόγων της αυξητικής ορμόνης, τα οποία ονομάζονται Growth Hormone Secretagogues (GHSs, ή GH releasing peptides) (Bowers et al., 1980, Casanueva et al., 1999). Τα αρχικά πεπτίδια είχαν ασθενή GH-εκλυτική ικανότητα. Το πρώτο ισχυρό GHS συντέθηκε το 1980 και ονομάστηκε GHRP-6 (hexarelin) και αποτέλεσε τη βάση για τη σύνθεση νέων σκευασμάτων με ενισχυτική δράση στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Το MK-0677 αποτελεί το πιο ισχυρό από αυτά, έχει δομή διαφορετική από αυτή της εξαρελίνης και είναι αυτό που οδήγησε στη συνέχεια στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των GHS υποδοχέων (Cheng et al., 1993).

Αποδείχτηκε ότι τα GHSs ασκούν τη δράση τους μέσω διαφορετικού υποδοχέα από αυτόν της GHRH (Lengyel, 2006b). Ο υποδοχέας των GHSs ταυτοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε το 1996 από την ομάδα του Howard και των συνεργατών του, οι οποίοι τον εντόπισαν κυρίως στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, αλλά και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην οικογένεια των G-υποδοχέων (G-Protein coupled receptor, GPCR) και αρχικά τον χαρακτήρισαν ως «ορφανό», καθώς δεν είχε γίνει η ταυτοποίηση του ενδογενούς μορίου που συνδέεται μαζί του (Howard et al., 1996).

Τον Δεκέμβριο του 1999 ο Kojima και οι συνεργάτες του απομόνωσαν και ταυτοποίησαν από το στομάχι επίμυων τον ενδογενή παράγοντα για τον GHS-R. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε γκρελίνη (ghrelin) και μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία ορμόνη, μιας και παραγόμενη από το γαστρικό βλενογόνο κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα και ασκεί τη δράση της σε διάφορα όργανα. (Kojima et al., 1999). Η ονομασία προήλθε από το αρχικό "ghre" που στην Πρωτο-Ινδοευρωπαϊκή διάλεκτο αντιστοιχεί στην αγγλική λέξη "grow", ενώ επιπλέον τα αρχικά Ghre (Growth hormone release) περιγράφουν το ότι το πεπτίδιο διεγείρει την παραγωγή της GH.

Συμπερασματικά, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα, η γκρελίνη ανακαλύφθηκε μέσω της διαδικασίας της «ανάστροφης φαρμακολογίας» (Korbonits et al., 2004).

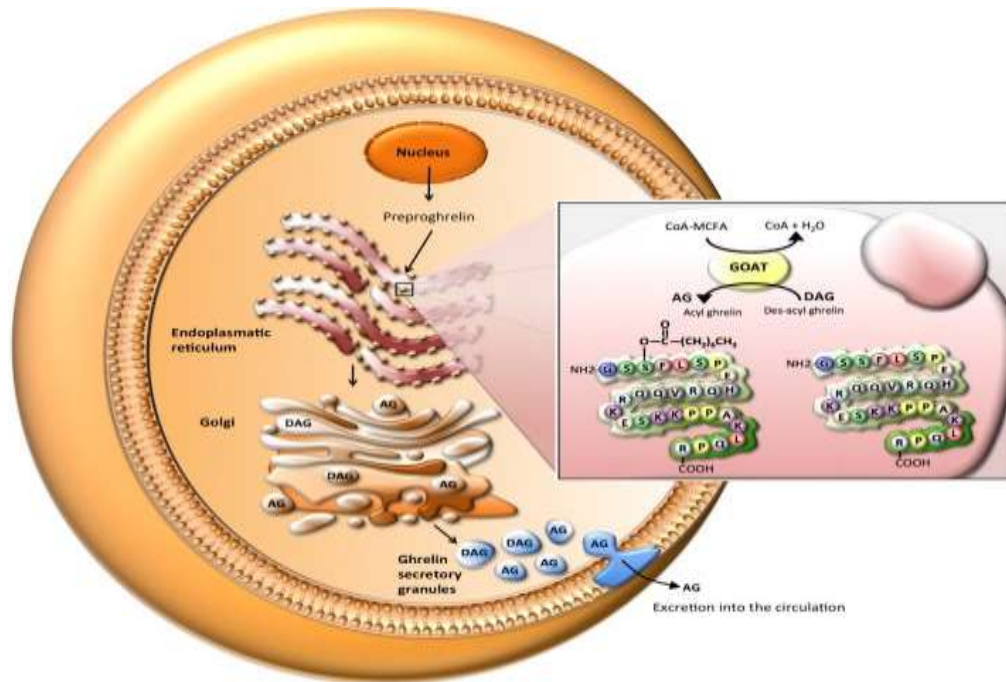


Σχήμα 2. Αναγνώριση των GHS, του υποδοχέα τους και της γκρελίνης (Korbonits et al., 2004).

5.2. Δομή Γκρελίνης

Η γκρελίνη αποτελεί ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων που παράγεται κατόπιν διάσπασης ενός πρόδρομου πεπτιδίου 117 αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα, το ανθρώπινο γονίδιο της γκρελίνης έχει εντοπιστεί πάνω στο χρωμόσωμα 3 (p25-26) (Wang et al., 2004). Το προϊόν της μετάφρασης του γονιδίου είναι η προ-προ-γκρελίνη (αλληλουχία 117 αμινοξέων), η οποία αποτελείται από το σήμα έναρξης (αλληλουχία 23 αμινοξέων) και από την αλυσίδα της προ-γκρελίνης (αλληλουχία 94 αμινοξέων). Η προ-γκρελίνη αποτελείται με τη σειρά της από το ώριμο μόριο της γκρελίνης (αλληλουχία 28 αμινοξέων) και από το σήμα λήξης (αλληλουχία 66 αμινοξέων). Κατά συνέπεια, από τη διάσπαση της προ-γκρελίνης προκύπτει η γκρελίνη, ενώ τα υπόλοιπα 64 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου αποτελούν την C-γκρελίνη, από την οποία είναι πιθανό να παράγεται η ομπεστατίνη. Η ομπεστατίνη έχει αντίθετη δράση από εκείνη της γκρελίνης καθώς μειώνει την πρόσληψη τροφής (Zhang et al., 2005).

Η γκρελίνη αποτελεί την πρώτη ορμόνη η οποία διαπιστώθηκε ότι τροποποιείται από λιπαρό οξύ (Date et al., 2000, Hosoda et al., 2000a). Το 2008 διαπιστώθηκε ότι η ακετυλίωση καταλύεται από το ένζυμο ghrelin-O-acyltransferase (GOAT), το οποίο στον άνθρωπο βρίσκεται κυρίως στον στόμαχο και το πάγκρεας, ενώ στα τρωκτικά στο ευρύτερο γαστρεντερικό σύστημα και στους όρχεις (Yang et al., 2008). Σχετικά με την προέλευση των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιούνται στην ακετυλίωση της γκρελίνης, διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η κύρια πηγή είναι οι τροφές (Gutierrez et al., 2008).

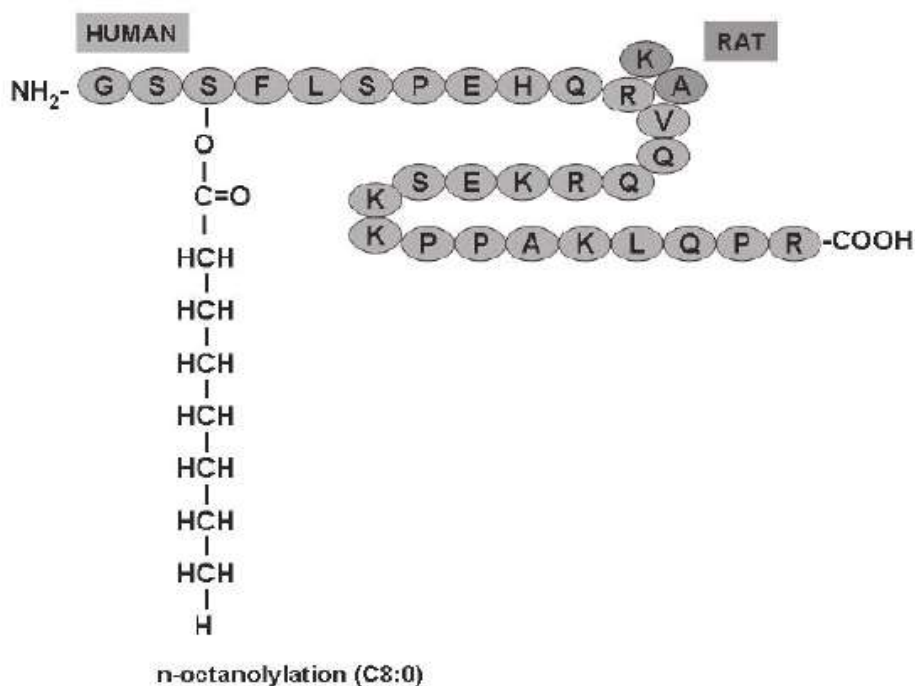


Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μεταφραστικής διαδικασίας και της ακετυλίωσης της γκρελίνης (Müller et al., 2015).

Μάλιστα, η εστεροποίηση της γκρελίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για την άσκηση των βιολογικών της δράσεων και την ικανότητα της να είναι ουσία που διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Nishi et al., 2005 , Kirchner et al., 2009).

Η ακετυλιωμένη μορφή της γκρελίνης (octanoylatedghrelin) συνιστά περίπου το 1,8% του συνολικού ποσού της κυκλοφορούσας γκρελίνης και αποτελεί την κύρια δραστική μορφή της ανθρώπινης γκρελίνης όσον αφορά στην απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης και στην επίδραση στην όρεξη. Από την άλλη, η μη ακετυλιωμένη μορφή της γκρελίνης (desacyl, ή desoctanoyl) δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την απελευθέρωση αυξητικής ορμόνης in vivo. Ωστόσο, ένας όλο και αυξανόμενος αριθμός εργασιών αναφέρουν δράσεις της τελευταίας σε καρδιαγγειακό σύστημα και στις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης κυττάρων (Patterson et al., 2011, Dafopoulos et al., 2009).

Η ακριβής αλληλουχία του μορίου της γκρελίνης στον άνθρωπο και στους επίμους έχει ανακαλυφθεί από τον Hosoda και τους συνεργάτες του. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η δομή της γκρελίνης ανάμεσα στα δύο αυτά είδη διαφέρει μόνο στα αμινοξέα στις θέσεις 11 και 12. Στις θέσεις αυτές στον άνθρωπο υπάρχουν τα αμινοξέα αργινίνη (Arg) και βαλίνη (Val), ενώ στους επίμους λυσίνη (Lys) και αλανίνη (Ala) αντίστοιχα (Kojima et al., 1999; Hosoda et al., 2003). Ακόμα, μία παραλλαγή του μορίου της γκρελίνης είναι αυτή που απουσιάζει το 14ο αμινοξύ, η γλουταμίνη (des-Gln14-ghrelin) και έχει αναγνωρισθεί σε πολύ μικρές ποσότητες στο στομάχι. Μάλιστα, βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο μόριο, το οποίο προκύπτει από το γονίδιο της γκρελίνης με διαφορετική συναρμογή (splicing) είναι ίδιο με αυτό που διεγείρει την έκκριση GH σε επίμους. Τέλος, έχει ανακαλυφθεί και ένα πεπτίδιο 12 αμινοξέων στα κύτταρα όρχεων επίμους ως αποτέλεσμα διαφορετικής συναρμογής (splicing) κατά τη μεταγραφή του γονιδίου της γκρελίνης (Hosoda et al., 2000).

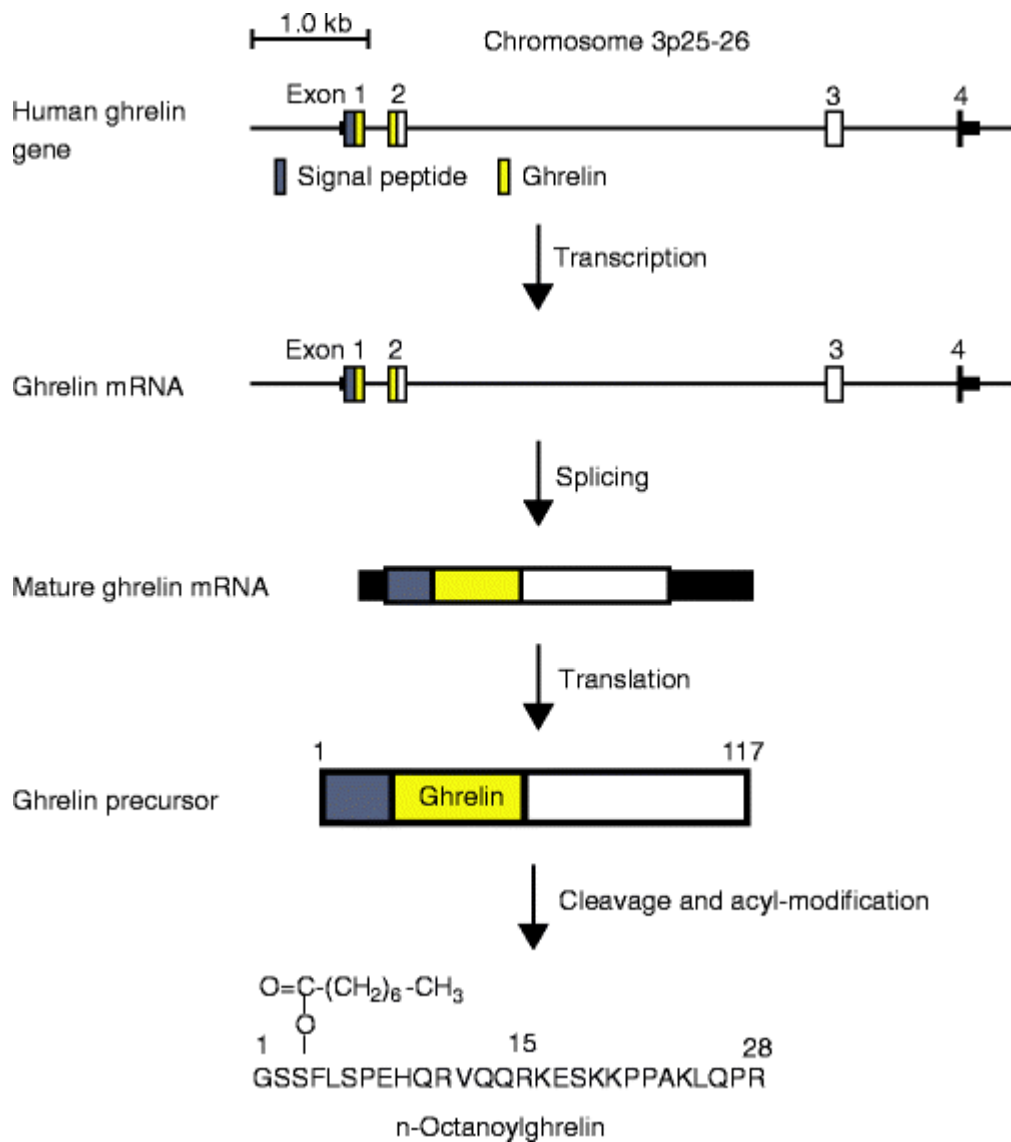


Σχήμα 4. Η αμινοξική αλληλουχία του μορίου της γκρελίνης στον άνθρωπο και στους επίμους. Στον άνθρωπο στις θέσεις 11 και 12 υπάρχουν τα αμινοξέα αργινίνη και βαλίνη. Από την άλλη στους επίμους υπάρχουν αντίστοιχα τα αμινοξέα λυσίνη και αλανίνη (Litwiniec et al., 2008).

5.3. Γονίδιο Γκρελίνης

Στον άνθρωπο το γονίδιο της γκρελίνης χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3p25-26 και αποτελείται από πέντε εξόνια. Το πρώτο εξόνιο περιλαμβάνει μόνο 20 βάσεις και κωδικοποιεί μέρος της 5' αμετάφραστης περιοχής. Οι θέσεις που ξεκινά η μεταγραφή του γονιδίου της γκρελίνης είναι δύο και οποιαδήποτε μετάλλαξη σε αυτές έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία μεταγραφής του γονιδίου της (Wei et al., 2005). Η μία βρίσκεται στο -80 και η άλλη στο -555 σε σχέση με το κωδικόνιο έναρξης ATG, με αποτέλεσμα την παραγωγή δύο διαφορετικών mRNA μετάγραφων (μετάγραφα A και B). Το μετάγραφο A, το προϊόν εναλλακτικού ματίσματος από το εξόνιο 2 έως το εξόνιο 4, είναι η κύρια μορφή του mRNA της γκρελίνης in vivo που μεταφράζεται σε πρόδρομο μόριο 117 αμινοξέων. Τα 28 αμινοξέα του λειτουργικού πεπτιδίου της γκρελίνης κωδικοποιούνται από τα εξόνια 1 και 2 (Kojima and Kangawa, 2005).

Έχει βρεθεί επίσης ότι είναι βασικός ο ρόλος του εξονίου 1 και του εγγύς τμήματος του εσωνίου 1 για την δραστηριότητα του υποκινητή της γκρελίνης του ανθρώπου. Οι bHLH-LZ μεταγραφικοί παράγοντες USF1 και USF2 δεσμεύονται ειδικά σε E-κουτιά στον υποκινητή της γκρελίνης του ανθρώπου ως ετεροδιμερή, πιθανώς παίζοντας ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης της ανθρώπινης γκρελίνης (Kanamoto et al., 2004).



Σχήμα 5. Από το γονίδιο της γκρελίνης στο ενεργό πεπτίδιο (Kojima et al., 2001, Kojima and Kangawa, 2005).

5.4. Παραγωγή και έκκριση γκρελίνης

Κύτταρα που παράγουν γκρελίνη εντοπίζονται σε όλο το μήκος του γαστρεντερικού συστήματος, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση τους στο βλενογόνο του στομάχου. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι τα κύτταρα του στομάχου που παράγουν γκρελίνη και τα οποία ονομάζονται X/A like cells στα τρωκτικά και P/D1 στους ανθρώπους, εντοπίζονται κυρίως στο θόλο του στομάχου και αποτελούν το 20% των οξεοπαραγωγών αδένων του στομάχου (Arisau et al., 2001, Pinkney and Williams, 2002). Η αρχική ονομασία X/A οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν πολλές ομοιότητες με τα κύτταρα A του παγκρέατος και αρχικά δεν ήταν γνωστό (X;) τι παράγουν. Ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε γαστρεκτομή βρέθηκε ότι έχουν 65% μικρότερα ποσοστά γκρελίνης σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (Date et al., 2000). Υπάρχουν μελέτες στις οποίες πιθανολογείται η ύπαρξη δύο τέτοιων ειδών κυττάρων, με διαφορετικές λειτουργίες (Sakata et al., 2002, Lee et al., 2002). Μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν ότι η πυκνότητα των κυττάρων γκρελίνης στο στομάχο (κύτταρα/mm²) είναι 10 -100 φορές υψηλότερη απ' ότι στο κατώτερο πεπτικό. Τα κύτταρα του στομάχου είναι «κλειστού τύπου», δηλαδή δεν επικοινωνούν με τον αυλό του οργάνου, αλλά με τα τριχοειδή αγγεία. Αντίθετα, τα κύτταρα στον υπόλοιπο γαστρεντερικό σωλήνα είναι κυρίως «ανοικτού τύπου» (Date et al., 2000, Sakata et al., 2002). Αν και είναι γνωστό ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά της κυκλοφορούσας γκρελίνης στον οργανισμό είναι στομαχικής προέλευσης (Date et al., 2000), πλέον είναι γνωστό ότι γκρελίνη παράγεται και στην υπόφυση, καθώς και στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου (Korbonits et al., 2001). Μικρότερα ποσοστά γκρελίνης ανιχνεύονται και στον πνεύμονα, στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στο μαστό, στο θυρεοειδή αδένα και στην καρδιά (Gnanapavan et al., 2002). Αξίζει να αναφερθεί ότι ενδοκρινικοί παγκρεατικοί όγκοι βρέθηκε ότι παράγουν γκρελίνη και φέρουν υποδοχείς της ορμόνης, γεγονός που υποδεικνύει κάποιου είδους παρακρινική δράση (Date et al., 2002, Wierup et al., 2002). Το ίδιο ισχύει για κάποια καρκινοειδή του στομάχου και του εντέρου, για διάφορα είδη αδενωμάτων της υπόφυσης και για κύτταρα μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς (Kanamoto et al., 2001). Τέλος, έρευνες υποδεικνύουν την παρουσία γκρελίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Hattori et al., 2001), καθώς και στον πλακούντα διαφόρων θηλαστικών (Gualilloo et al., 2001).

Τα φυσιολογικά επίπεδα γκρελίνης στην κυκλοφορία του ανθρώπου είναι 100-150 fmol/ml για την ολική γκρελίνη (ακυλιωμένη και μη ακυλιωμένη) και 10-20 fmol/ml για την ακυλιωμένη μορφή (Cummings et al., 2001, Shiiya et al., 2002). Τα επίπεδα της γκρελίνης αυξάνονται κατά τη διάρκεια της νηστείας και ελαττώνονται στα χαμηλότερα επίπεδα μία ώρα περίπου μετά τη λήψη τροφής, χωρίς να είναι μέχρι σήμερα αποσαφηνισμένος ο ακριβής μηχανισμός. Κατά συνέπεια, σε παχύσαρκα άτομα παρατηρείται χαμηλή συγκέντρωση κυκλοφορούσας γκρελίνης (Tschöp et al., 2001), ενώ στην περίπτωση της νευρικής ανορεξίας συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο (Dzaja et al., 2004). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα της γκρελίνης δεν επηρεάζονται από τη διάταση του στομάχου από τη λήψη τροφής ή νερού (Yildiz et al., 2004). Η μοναδική περίπτωση που η παχυσαρκία συνδυάζεται με σημαντικά αυξημένα επίπεδα γκρελίνης είναι το σύνδρομο Prader – Willi. Το σύνδρομο οφείλεται σε χρωμοσωμική ανωμαλία και συγκεκριμένα σε έλλειψη ενός ή περισσότερων γονιδίων από την περιοχή q11-13 του χρωμοσώματος 15 και χαρακτηρίζεται από ήπια διανοητική καθυστέρηση, υπερφαγία, κοντό ανάστημα, μυϊκή υποτονία και διαταραχές της συμπεριφοράς. Τέλος, πιθανολογείται ότι μία δυσλειτουργία του μηχανισμού ρύθμισης της όρεξης στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι αυτή που τελικά ευθύνεται για την αυξημένη έκκριση γκρελίνης στο σύνδρομο αυτό (Cummings et al., 2002).

Τέλος, άλλες ορμόνες και διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις επηρεάζουν την έκκριση της γκρελίνης. Ενδεικτικά αναφέρονται η υποθαλαμική ορμόνη TRH (thyrotrophin releasing hormone), νευρομεταβιβαστές όπως η ιντερλευκίνη-1 και η σεροτονίνη, περιφερικοί παράγοντες, όπως η ουροκορτίνη-1 και η χολοκυστοκίνη.

5.5. Υποδοχέας της γκρελίνης (GHS-R)

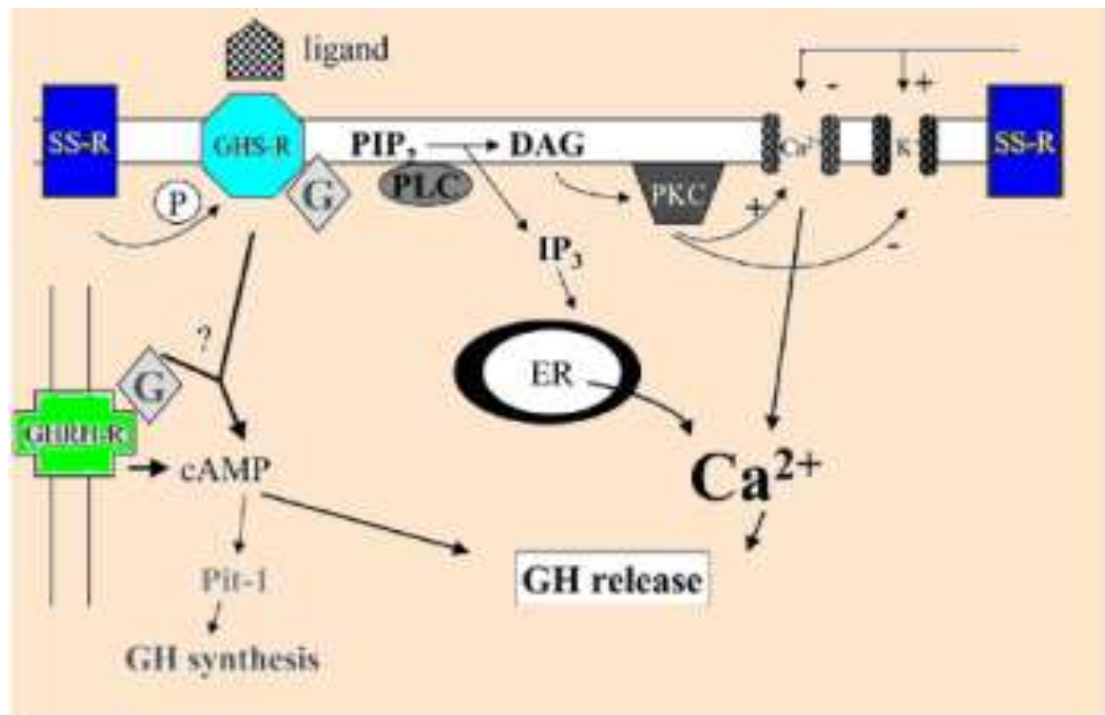
Το γονίδιο του υποδοχέα της γκρελίνης (GHSR) χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3q26.31, αποτελείται από 2 εξώνια και κωδικοποιεί έναν 7 διαμεμβρανικό υποδοχέα της ομάδας των G-πρωτεϊνών. Το GHSR γονίδιο κωδικοποιεί 2 τύπους GHSR mRNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος, GHSR-1a και GSR-1b. Και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται ευρέως, όμως η γκρελίνη προσδένεται στον υποδοχέα GHS-R1a ενώ ο ρόλος του GHS-R1b δεν είναι ακόμα γνωστός, μιας και τουλάχιστον για την γκρελίνη αποτελεί έναν μη λειτουργικό υποδοχέα. Από *in vitro* μελέτες έχει προταθεί ένας ανασταλτικός ρόλος του ετεροδιμερούς GHSR-1a και GHSR-1b (Petersenn et al., 2002). Ο ακριβής μηχανισμός λειτουργίας της γκρελίνης μέσα από τη σύνδεσή της στον υποδοχέα της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Συνοπτικά, η γκρελίνη δεσμεύεται στον υποδοχέα της και ενεργοποιεί το μονοπάτι μετάδοσης σήματος της φωσφολιπάσης C, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) καθώς και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C.

Πιο αναλυτικά, η φωσφολιπάση C υδρολύει

- την 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (αποθηκευμένη στην πλασματική μεμβράνη),
- τον παράγοντα διακυλογλυκερόλη (DAG) και
- την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3).

Οι ινοσιτόλες μετά την δέσμευση τους στον IP3 υποδοχέα του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) απελευθερώνουν ασβέστιο από εσωτερικές αποθήκες. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η IP3 διευκολύνει την απελευθέρωση της GH μέσω προσκόλλησης των GH εκκριτικών κοκκίων στην πλασματική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η μετάδοση του σήματος περιλαμβάνει την DAG, η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C στην πλασματική μεμβράνη. Η τελευταία προκαλεί εκπόλωση στα κανάλια καλίου, με τελικό αποτέλεσμα το άνοιγμα των καναλιών ασβεστίου τύπου L. Τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η είσοδος ιόντων ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον και έτσι επέρχεται η απόκριση στο κυτταρικό ερέθισμα (Casanueva and Dieguez, 2002, Korbonits et al., 2004).

Αρκετοί ιστοί στο ανθρώπινο σώμα εκφράζουν τον υποδοχέα GHSR-1a της γκρελίνης, γεγονός που υποδεικνύει τις ποικίλλες δράσεις της τελευταίας σε διάφορα όργανα. Η γκρελίνη πιθανολογείται ότι δρα και μέσω άλλων υποδοχέων πλην του κύριου υποδοχέα της. Έτσι, για παράδειγμα, η δράση της γκρελίνης στα στεφανιαία αγγεία πραγματοποιείται μέσα από τον υποδοχέα CD36, ο οποίος είναι ένας πολυλειτουργικός υποδοχέας τύπου Β (Bodard et al., 2002).



Σχήμα 6. Σχηματικά τα μεταγωγικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος του GHS-R στα σωματότροπα κύτταρα (Korbonits et al., 2004).

5.6. Δράσεις γκρελίνης

I. Γενικά

Η γκρελίνη αποτελεί ένα πεπτίδιο με πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις. Η πλέον πιο μελετημένη είναι η δράση της στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης, ενώ κύρια είναι και η επίδραση της γκρελίνης στην όρεξη και στην πρόσληψη τροφής (Cummings et al., 2004). Παράλληλα, η γκρελίνη φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, καθώς επηρεάζει την έκκριση της ινσουλίνης και την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ σε πειραματόζωα (Date et al., 2002) και σε ανθρώπους (Broglia et al., 2001). Παράλληλα, όπως φαίνεται και από το παρακάτω σχήμα, σημαντικές είναι οι επιδράσεις της γκρελίνης στο καρδιαγγειακό, στο μυοσκελετικό, στο γαστρεντερικό, στο αναπαραγωγικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην απόπτωση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Kojima and Kangawa, 2005).



Σχήμα 7. Σχηματικά οι επιδράσεις της γκρελίνης στα διάφορα συστήματα (De Vriese and Delporte, 2008).

II. Γκρελίνη και αυξητική ορμόνη

Η εξωγενής χορήγηση γκρελίνης αυξάνει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης και μάλιστα με τρόπο δόσοεξαρτώμενο και αυτό αποδεικνύεται βιβλιογραφικά σε μελέτες τόσο σε ανθρώπους (Arvat et al., 2000, Takaya et al., 2000) όσο και σε πειραματόζωα (Date et al., 2000). Η γκρελίνη και η GHRH δρουν συνεργικά στην έκκριση της GH, με απαραίτητη όμως τη δράση της GHRH στα εκκριτογόνα κύτταρα της GH (Hataya et al., 2003). Η μέγιστη διεγερτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης είναι διπλάσια έως και τριπλάσια ισχυρότερη από την αντίστοιχη επίδραση της GHRH (Arvat et al., 2000). Η απάντηση της GH στη γκρελίνη επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως από τα επίπεδα της γλυκόζης και των λιπιδίων, από χολινεργικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές, από τον IGF-I, καθώς και από τα επίπεδα της ίδιας της αυξητικής ορμόνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε καταστάσεις με παρατεταμένη έκκριση γκρελίνης, όπως είναι για παράδειγμα η νευρική ανορεξία, παρατηρείται μία μειωμένη ευαισθησία των υποδοχέων στη δράση της γκρελίνης (Misra et al., 2005). Η γκρελίνη αυξάνει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης είτε με απευθείας δράση στο σωματοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (Malagon et al., 2003) είτε με δράση στους νευρώνες του υποθαλάμου (Poronic et al., 2003). Μελέτες σε ζώα δείχνουν μια αλληλεπίδραση των συστημάτων GHRH και γκρελίνης σε υποθαλαμικό επίπεδο (Mano-Otagiri et al., 2006) και έρευνα του 2005 υποστηρίζει ότι η γκρελίνη νηστείας είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της βασικής και παλμικής έκκρισης GH (Misra et al., 2005). Επίσης, έρευνα δείχνει ότι σε περίπτωση βαγοτομής η προκαλούμενη από την γκρελίνη αύξηση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης μειώνεται σημαντικά (Williams et al., 2003).

Το να διαχωρίσει κανείς τις άμεσες δράσεις της γκρελίνης από αυτές που σχετίζονται με την αυξητική ορμόνη θα μπορούσε να είναι ένα δύσκολο εγχείρημα. Έρευνα των Sun και συν. του 2003 έδειξε ότι σε επίμυες η χορήγηση γκρελίνης δεν επηρέασε το ρυθμό ανάπτυξης τους (Sun et al., 2003). Από την άλλη, έρευνα δείχνει ότι η περίπτωση του οικογενούς κοντού αναστήματος μπορεί να σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της γκρελίνης (Pantel et al., 2006).

Μελέτη του 2008 δείχνει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ύψους των εκκριτικών αιχμών της GH και της μέσης συγκέντρωσης ακετυλιωμένης γκρελίνης στο διάστημα των 60

λεπτών κατά τη διάρκεια και πριν από την αιχμή της GH (Nass et al., 2008a). Στη συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζεται ότι υπό συνθήκες σίτισης η ακετυλιωμένη γκρελίνη δρα ως ένας θετικός τροποποιητής της απελευθέρωσης GH. Επίσης, η από του στόματος χορήγηση ουσίας που δρα παρόμοια με τη γκρελίνη σε ηλικιωμένους εθελοντές είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παλμικότητας της GH (Nass et al., 2008b). Επίσης, δεδομένα από τον Zizzari και τους συνεργάτες του δείχνουν ότι η εφαρμογή ενός ανταγωνιστή GHSR οδηγεί σε μείωση του εύρους παλμού GH σε τρωκτικά (Zizzari et al., 2005).

Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση των οιστρογόνων στην από την γκρελίνη έκκριση της GH είναι πολύ περιορισμένα. Μελέτη του 2006 δείχνει ότι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η χορήγηση οιστρογόνων αύξησε την κατά ώσεις έκκριση της GH (Veldhuis et al., 2005). Μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη του 2008 δείχνει ότι σε γυναίκες που χορηγήθηκε σταδιακά αυξανόμενη δόση γκρελίνης, η γκρελίνη αύξησε την έκκριση της GH μόνο σε χαμηλές δόσεις (Kok et al., 2008). Από τις δύο παραπάνω μελέτες θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η οιστραδιόλη επηρεάζει τη γκρελίνη στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης μόνο όταν χορηγείται σε χαμηλές δοσολογίες. Οι προαναφερθείσες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και συνεπώς η αύξηση της διεγερτικής δράσεις της γκρελίνης στην GH μετά τη χορήγηση οιστρογόνων ίσως να μην σχετίζεται πραγματικά με τη γκρελίνη, αλλά με μία προσπάθεια αντιρρόπησης του οργανισμού για να αποκαταστήσει μία φυσιολογική ορμονική εικόνα. Γνωρίζουμε επίσης ότι με το πέρασμα των ετών παρατηρείται τόσο μία μείωση της κυκλοφορούσας γκρελίνης στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και μία μειωμένη απάντηση της GH στην γκρελίνη (Chahal and Drake, 2007, Broglio et al., 2003). Σε μελέτη του 2009 στην οποία χορηγήθηκε γκρελίνη ενδοφλέβια σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας σε τρεις φάσεις της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην συγκέντρωση της GH (Messini et al., 2009a).

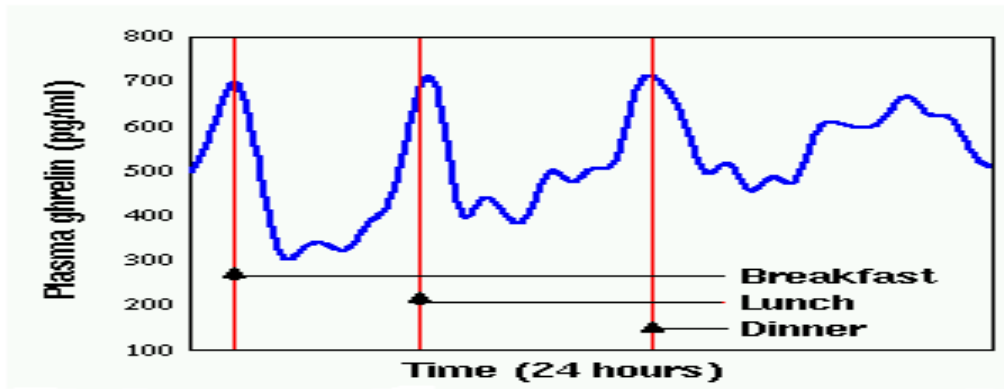
Στην παρούσα μελέτη ένα από τα κύρια ερωτήματα διερεύνησης είναι η επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση της GH μετά τη χορήγηση χαμηλών δόσεων γκρελίνης τόσο σε εμμηνοπαυσιακές, όσο και σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες χορηγήθηκαν εξωγενώς οιστρογόνα, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχουν και εδώ οι προαναφερθέντες προβληματισμοί και περιορισμοί. Στις γυναίκες όμως αναπαραγωγικής ηλικίας, στις οποίες δεν χορηγήθηκαν οιστρογόνα εξωγενώς, οι

ορμονικές τους μετρήσεις αντικατοπτρίζουν τη φυσιολογική σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση οιστρογόνων στην ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου και το κατά πόσο αυτά επηρεάζουν την έκκριση της αυξητικής ορμόνης στον οργανισμό.

III. Επίδραση γκρελίνης στην όρεξη

Η ρύθμιση της διατροφής, της πρόσληψης και κατανάλωσης ενέργειας και του σωματικού βάρους αποτελεί μια ομοιοστατική διαδικασία (Wilding et al., 2002). Ο υποθάλαμος είναι η βασική περιοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος που εμπλέκεται στη ρύθμιση της όρεξης (Murphy and Bloom, 2004). Οι διάφοροι πυρήνες του υποθαλάμου έχουν και διαφορετικό ρόλο στην όλη διαδικασία. Έτσι, ο κορεσμός ελέγχεται από τον μεσοκοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και η πρόσληψη τροφής ελέγχεται από την πλάγια υποθαλαμική περιοχή (Vettor et al., 2002). Ο τοξοειδής πυρήνας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία καθώς περιέχει νευρώνες που παράγουν πεπτίδια με ορεξιογόνο (νευροπεπτίδιο Υ, πεπτίδιο «agouti related protein»-AgrP) και ανορεξιογόνο δράση (ομάδα προ-ομιομελανινοκορτίνης) (Williams et al., 2001). Παράλληλα, στον τοξοειδή πυρήνα δρουν περιφερικά ερεθίσματα που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της όρεξης, όπως είναι οι γαστρικές ορμόνες, με την γκρελίνη να κατέχει κύριο ρόλο ανάμεσα τους (Small and Bloom, 2004). Πειράματα έδειξαν ότι χορήγηση γκρελίνης είτε ενδοφλέβια είτε ενδομυϊκά είτε ενδοκοιλιακά στον εγκέφαλο πειραματόζωων οδήγησε τελικά σε αύξηση της όρεξης (Lawrence et al., 2002). Επίσης, η ενδοφλέβια έγχυση γκρελίνης φαίνεται ότι αυξάνει την όρεξη τόσο σε αδύνατους όσο και σε παχύσαρκους εθελοντές σε ποσοστό περίπου ίδιο μετά από 24ωρη νηστεία (Wren et al., 2001). Ακόμη και υποδόρια έγχυση γκρελίνης σε υγιείς εθελοντές φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα πρόσληψης τροφής (Druce et al., 2006).

Όπως προειπώθηκε, τα επίπεδα της κυκλοφορούσας γκρελίνης σχετίζονται με την πρόσληψη τροφής (αύξηση σε νηστεία και μείωση μεταγευματικά) και ο ρυθμός έκκρισης αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας (Cummings et al., 2001, Marzullo et al., 2006). Οι ώσεις της γκρελίνης είναι του ίδιου μεγέθους πριν από κάθε γεύμα της ημέρας και πιθανολογείται ότι εμπλέκονται στη διαδικασία έναρξης του γεύματος (Lee et al., 2002).



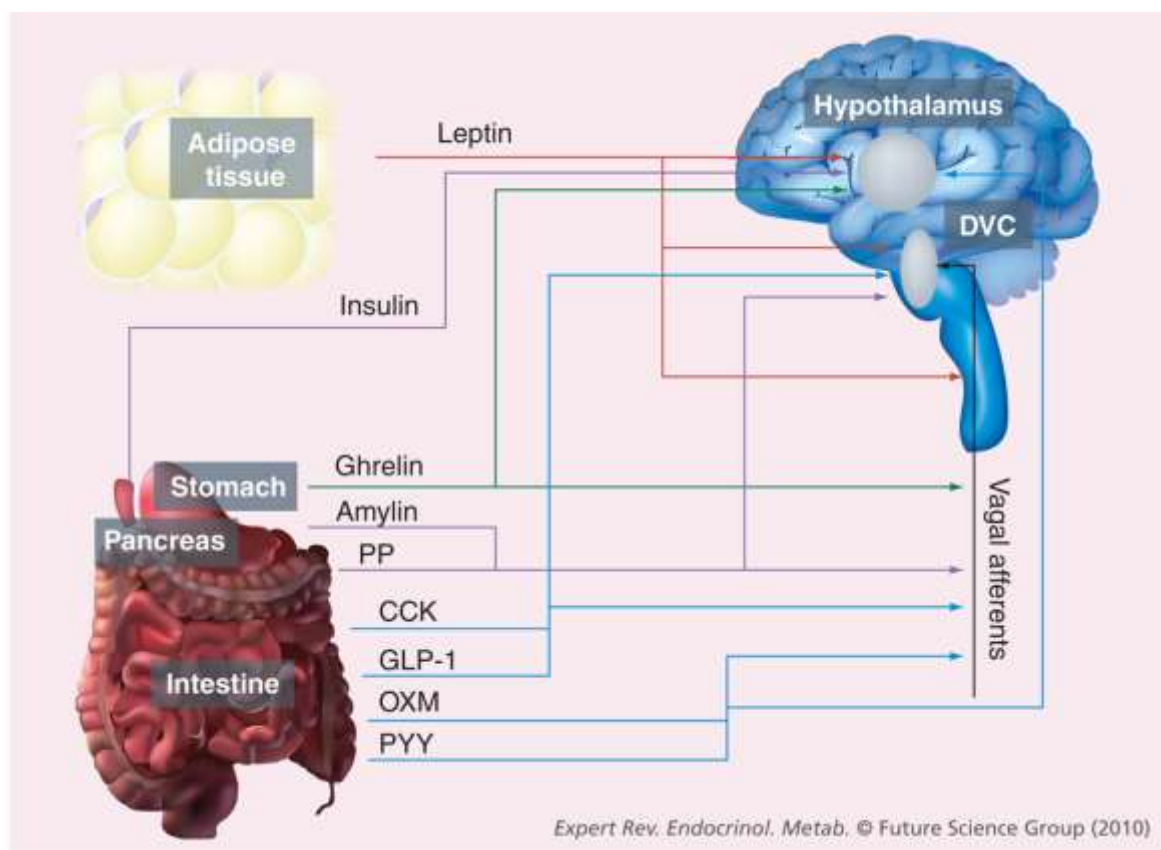
Σχήμα 8. Συγκέντρωση γκρελίνης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια του 24ωρου και συσχέτιση της με τα τρία βασικά γεύματα της ημέρας (Cummings et al., 2001).

Έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα της γκρελίνης βρέθηκαν μειωμένα σε παχύσαρκους ασθενείς που υποβλήθηκαν γαστρικό bypass, γεγονός που πιθανόν να ενισχύει την απώλεια βάρους στους ασθενείς αυτούς (Cummings et al., 2002). Αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με μεταγενέστερες μελέτες, οι οποίες δεν κατέδειξαν κάποια αλλαγή στα κυκλοφορούντα ποσοστά γκρελίνης μετά από ένα τέτοιο χειρουργείο (Ybarra et al., 2009, Garcia-Fuentes et al., 2008).

Σε έρευνα, σε επίμυες η κατάργηση των υποδοχέων της γκρελίνης οδήγησε σε αντίσταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας προκαλούμενης από διατροφή υψηλής θερμιδικής αξίας (Zigman et al., 2005). Η χορήγηση ανταγωνιστή του υποδοχέα της γκρελίνης σε παχύσαρκους αρουραίους τελικά μείωσε το σωματικό τους βάρος μέσα από μείωση της προσλαμβανόμενης τροφής (Esler et al., 2007). Παρόμοιες μελέτες δεν έχουν γίνει σε ανθρώπους, αλλά ο αποκλεισμός των υποδοχέων της γκρελίνης πριν από το γεύμα μπορεί στο μέλλον να αποτελέσει έναν σημαντικό φαρμακευτικό παράγοντα κατά της παχυσαρκίας.

Η ορεξιόγόνος δράση της γκρελίνης φαίνεται να εξασκείται μέσω νευρώνων του τοξοειδούς πυρήνα του υποθαλάμου που εκφράζουν δύο νευροπεπτίδια, το νευροπεπτίδιο Υ (NPY) και την agouti-related protein (AGRP). Η γκρελίνη φτάνει τελικά στους νευρώνες αυτούς είτε διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Williams et

al., 2003) είτε μέσα από την κυκλοφορία του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Hewson et al., 2002). Από την άλλη, η λεπτίνη αποτελεί μία ορμόνη που ανταγωνίζεται αυτή τη δράση της γκρελίνης στον τοξοειδή πυρήνα (Shintani et al., 2001). Εκτός της γκρελίνης και της λεπτίνης υπάρχουν και άλλα πεπτίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της όρεξης. Τα περισσότερα χαρακτηρίζονται από ανορεξιογόνο δράση και τα πιο σημαντικά είναι η χολοκυστοκίνη, το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο, το πεπτίδιο ΥΥ, το Glucagon-Like-peπτίδιο και η οξυνομοντουλίνη (Σχήμα 9).



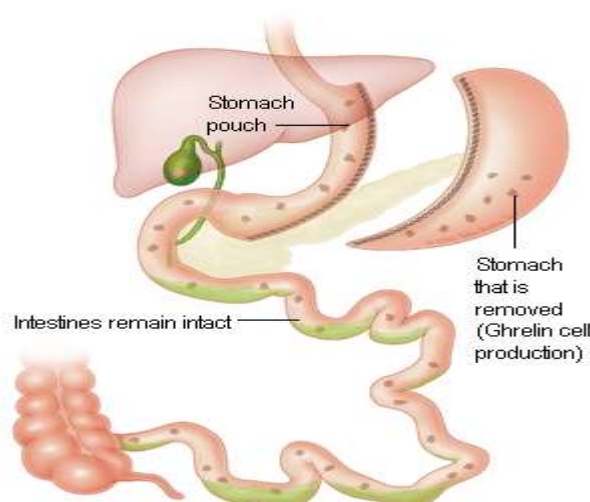
Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση ορμονικών παραγόντων που ρυθμίζουν την όρεξη (Valentino et al., 2010).

εντερικής προέλευσης →
 στομαχικής προέλευσης →
 παγκρεατικής προέλευσης →
 λιπώδους προέλευσης →

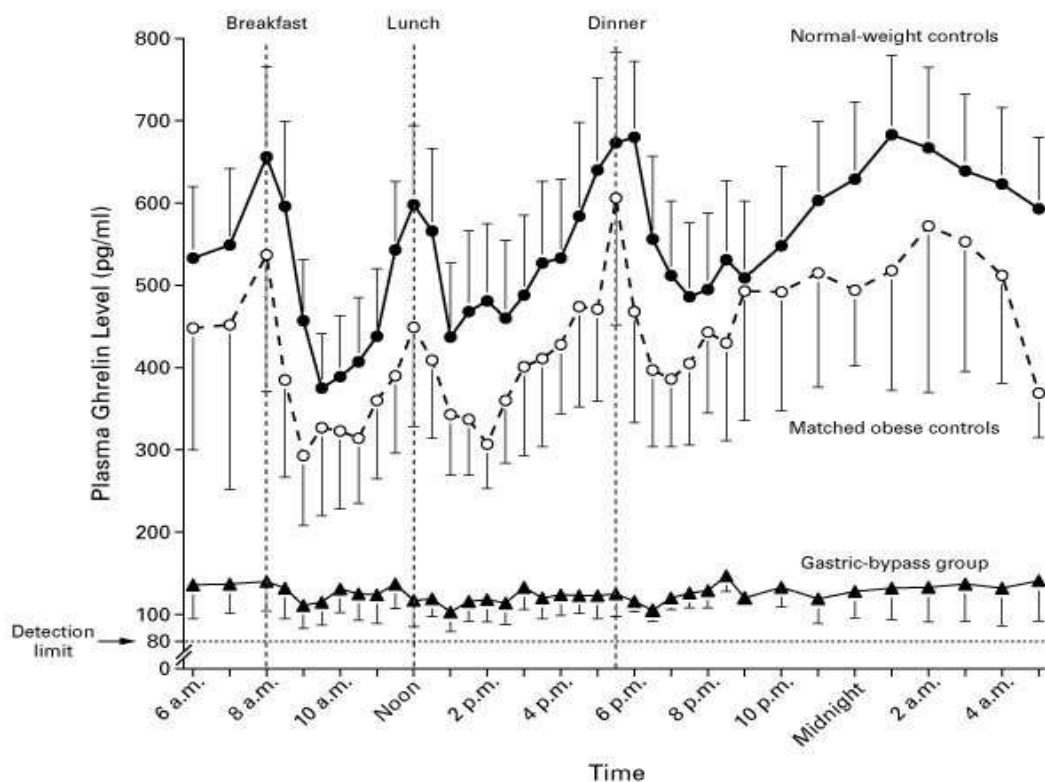
IV. Πιθανές κλινικές εφαρμογές της γκρελίνης, ή των ανταγωνιστών της σε καταστάσεις με διαταραγμένη έκκριση αυξητικής ορμόνης που σχετίζονται με την πρόσληψη, ή τη μη πρόσληψη τροφής.

A) Παχυσαρκία

Η αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας τα τελευταία χρόνια αποτελεί ένα ραγδαία εξελισσόμενο φαινόμενο των τελευταίων που απειλεί την υγεία του ανεπτυγμένου κόσμου. Αυτό σχετίζεται άμεσα με αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας, αλλά σημαντικές είναι και οι προσωπικές, κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες στα άτομα που νοσούν (Hedley et al., 2004). Η χειρουργική προσέγγιση της νοσογόνου παχυσαρκίας με γαστρικό bypass αποτελεί σήμερα την μόνη ίσως αποτελεσματική μέθοδο αντιμετώπισης της κατάστασης αυτής. Όπως προαναφέρθηκε, στην περίπτωση του γαστρικού bypass τα επίπεδα της γκρελίνης βρίσκονται ελαττωμένα, γεγονός που δείχνει ότι μετά από εγχειρήσεις βαριατρικής εκτός των υπολοίπων, η ίδια η γκρελίνη πιθανότατα να παίζει ρόλο στη μείωση του βάρους των ασθενών (Takachi et al., 2006). Αυτό δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένο, καθώς σε άλλες έρευνες δεν αποδεικνύεται κάτι τέτοιο (Ybarra et al., 2009, Garcia-Fuentes et al., 2008).



Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση του γαστρικού bypass και της πιθανής συσχέτισης με τα επίπεδα της γκρελίνης.



Σχήμα 11. Συγκέντρωση γκρελίνης σε πλάσμα κατά τη διάρκεια του 24ωρου μετά από γαστρικό Bypass (Cummings et al., 2002).

Όπως προειπώθηκε, υπάρχει μία αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση της γκρελίνης με το δείκτη μάζας σώματος και το μέγεθος των λιποκυττάρων του οργανισμού (Cummings et al., 2002). Σε πειράματα σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε γκρελίνη υποδορίως αυξήθηκε το σωματικό τους βάρος, καθώς και η ποσότητα του λιπώδους ιστού του σώματος τους (Tschöp et al., 2001). Σε ανθρώπους βρέθηκε ότι τα επίπεδα της γκρελίνης είναι χαμηλότερα σε παχύσαρκα άτομα σε σχέση με φυσιολογικού BMI άτομα και εξαρτώνται από την αντίσταση στην ινσουλίνη (Marzullo et al., 2004). Αντίστοιχα, τα επίπεδα της κυκλοφορούσας GH στα άτομα αυτά είναι χαμηλά και παρουσιάζουν μία μειωμένη απόκριση στα ερεθίσματα της GH, κάτι που φαίνεται να είναι αναστρέψιμο μετά την απώλεια βάρους (Williams et al., 1984). Άλλωστε, τα επίπεδα της GH σχετίζονται αρνητικά με το δείκτη μάζας σώματος και ο χρόνος ημίσειας ζωής της GH, ο ρυθμός έκκρισής της και το ύψος των εκκριτικών αιχμών της ανευρίσκονται μειωμένα στην

παχυσαρκία (Scacchi et al., 1999). Έρευνα στην οποία συγκρίθηκε η διεγερτική επίδραση της GHRH και γκρελίνης στους παχύσαρκους και τους λεπτόσωμους ενήλικες κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα παχύσαρκα άτομα παρουσίασαν μία αυξημένη ανταπόκριση της GH όταν η γκρελίνη χορηγήθηκε μόνη της, ή σε συνδυασμό με GHRH, ενώ στα λεπτόσωμα άτομα η ανταπόκριση αυτή ήταν ακόμα μεγαλύτερη (Alvarez-Castro et al., 2004). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η γκρελίνη θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην μειωμένη έκκριση της GH στην παχυσαρκία. Άλλα δεδομένα έχουν δείξει ότι το σπλαχνικό λίπος είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας των βασικών συγκεντρώσεων γκρελίνης (Sondergaard et al., 2009). Η αυξητική ορμόνη έχει ισχυρή λιπολυτική δράση και σε έρευνα του 1997 η 9μηνη χορήγηση της σε μεσήλικες άνδρες με αυξημένο κοιλιακό/σπλαχνικό λίπος οδήγησε σε μείωση του τελευταίου (Johannsson et al., 1997). Βασισμένοι στις προαναφερθείσες μελέτες οι Nass και συν. χορήγησαν ένα μιμητικό γκρελίνης σε μεσήλικες άνδρες για χρονικό διάστημα ενός έτους προκειμένου να μελετήσουν τα αν θα μειωθεί τελικά το κοιλιακό/σπλαχνικό τους λίπος, κάτι που τελικά δεν επιβεβαιώθηκε (Nass et al., 2008b). Άλλωστε, εκτός της ορεξιόγону δράσης της, η γκρελίνη αυξάνει και τη λιπογένεση στον οργανισμό, κάτι στο οποίο θα γίνει αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης.

Από την άλλη, βάσει της ορεξιόγону και της λιπογενετικής δράσης της γκρελίνης θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η χορήγηση ενός ανταγωνιστή της θα μπορούσε να συμβάλει στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Αρκετές μελέτες σε πειραματόζωα διενεργήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η παραπάνω υπόθεση και τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Ενδεικτικά, θα μπορούσε να αναφερθεί ότι σε έρευνα του 2005 η χορήγηση ανταγωνιστή του υποδοχέα της γκρελίνης οδήγησε σε αύξηση του σωματικού βάρους σε πειραματόζωα (Halem et al., 2005), ενώ σε έρευνα του 2007 οδήγησε σε μείωση του σωματικού βάρους μέσα από τη μείωση της πρόσληψης τροφής (Esler et al., 2007).

Τέλος, υπάρχει μία ολοένα και αυξανόμενη έρευνα σχετικά με γενετικές τροποποιήσεις του γονιδίου της γκρελίνης και το κατά πόσο αυτές συνδέονται με την παχυσαρκία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έχει ταυτοποιηθεί μια μετάλλαξη σε ένα αμινοξύ στη θέση 51 της προ-προ-γκρελίνης σε παχύσαρκα άτομα, ενώ διαπιστώθηκε και ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ μιας μετάλλαξης στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου της προ-προ-

γκρελίνης με μικρότερη ηλικία έναρξης της παχυσαρκίας (Date et al., 2000). Βέβαια, όπως είναι κατανοητό, χρειάζονται αρκετές περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί το ενδεχόμενο μίας πιθανής μελλοντικής γονιδιακής θεραπείας της νοσογόνου παχυσαρκίας.

B) Νευρογενής ανορεξία

Η νευρογενής ανορεξία αποτελεί ένα σοβαρό ψυχιατρικό νόσημα που συναντάται στο 0,9% του γυναικείου πληθυσμού και στο 0,3% του ανδρικού πληθυσμού και αποτελεί το ψυχιατρικό νόσημα με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (Hudson et al., 2007).

Η νευρική ανορεξία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούσας ολικής γκρελίνης πλάσματος ενώ η αύξηση του βάρους τους οδηγεί σε μείωση των υψηλών αυτών επιπέδων γκρελίνης (Nakahara et al., 2007). Τα αυξημένα επίπεδα γκρελίνης πιθανότατα να σχετίζονται είτε με μία μειωμένη σε σχέση με την φυσιολογική μεταγευματική μείωση των επιπέδων της γκρελίνης (Otto et al., 2001) είτε με την ανάπτυξη ανοχής στη γκρελίνη στους ασθενείς αυτούς (Miljic et al., 2006) είτε με αυξημένη έκφραση του γονιδίου της γκρελίνης (Monteleone et al., 2008). Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μελέτη που διερευνήθηκαν τα επίπεδα της ακετυλιωμένης και μη γκρελίνης σε πάσχουσες γυναίκες από νευρική ανορεξία διαπιστώθηκε ότι μόνο τα επίπεδα της μη ακετυλιωμένης γκρελίνης ήταν αυξημένα (Hotta et al., 2004). Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται και από αυξημένα επίπεδα GH και μειωμένα επίπεδα IGF-I (Fazeli et al., 2009). Πρόσφατα δεδομένα από πειράματα σε ζώα δείχνουν ότι η κυκλοφορούσα γκρελίνη είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των επιπέδων της GH και συνεπώς για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα κάτω από συνθήκες υποσιτισμού (Zhao et al., 2010). Αξιοσημείωτο είναι ότι στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται μία ελαττωμένη ευαισθησία στη δράση της γκρελίνης (Misra et al., 2005). Επίσης, πρόσφατη σχετικά μελέτη δείχνει ότι η ενδοφλέβια χορήγηση γκρελίνης επιταχύνει το ρυθμό της γαστρικής κένωσης και προκαλεί γαστρεντερική σύσπαση σε υγιείς εθελοντές (Fujitsuka et al., 2012).

Τα δεδομένα από τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία σχετικά με τη χορήγηση γκρελίνης σε ανθρώπους με νευρική ανορεξία είναι λίγα και πολλές φορές αντιφατικά. Οι περισσότερες συγκλίνουν στο ότι η γκρελίνη μπορεί να έχει θεραπευτικές δυνατότητες σε ασθενείς με τη συγκεκριμένη νόσο που δεν μπορούν να πάρουν βάρος λόγω γαστρεντερικής δυσλειτουργίας (Miljic et al., 2006), όμως περαιτέρω μελέτες είναι ανάγκη να πραγματοποιηθούν προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο παθοφυσιολογικός ρόλος της γκρελίνης στη νευρική ανορεξία.

Τέλος, έρευνες δείχνουν ότι θεραπεία με γκρελίνη θα μπορούσε μελλοντικά να βοηθήσει στην αντιμετώπιση καχεξίας που σχετίζεται με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, συμφορική καρδιακή ανεπάρκεια (Nagaya et al., 2004), σηψαιμία (Hataya et al., 2003) και καρκίνο (Neary et al., 2004).

V) Επίδραση της γκρελίνης στο μεταβολισμό του οργανισμού

Η γκρελίνη έχει έναν ευρύτερο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού όχι μόνο μέσα από την ορεξιγόνο δράση της και την δράση της στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης, αλλά και μέσα από τη δράση της στην έκκριση της ινσουλίνης και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Ο ακριβής ρόλος της γκρελίνης στην έκκριση της ινσουλίνης δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος (Salehi et al., 2004, Egidio et al., 2002, Broglio et al., 2003). Σε επίμυες η γκρελίνη φαίνεται ότι διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε κατάσταση νορμογλυκαιμίας (Date et al., 2002). Συνεπώς, τα επίπεδα της γλυκόζης πιθανόν να σχετίζονται με τη δράση της γκρελίνης στην έκκριση ινσουλίνης. Ωστόσο, σε έρευνα του 2007 η χορήγηση ανταγωνιστή του υποδοχέα της γκρελίνης σε αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης, τη βελτίωση των μηχανισμών ομοιόστασης της γλυκόζης, τη μείωση της πρόσληψης τροφής και τέλος, την απώλεια βάρους (Esler et al., 2007). Έρευνα σε αρουραίους που στερούνται ακετυλιωμένης γκρελίνης χάνουν τον γλυκαιμικό έλεγχο και μετά από μείωση της τροφής τους κατά 60% είναι ετοιμοθάνατα μέσα στο χρονικό διάστημα 1 εβδομάδας, ένα αποτέλεσμα που μπορεί να αντιστραφεί

με έγχυση είτε ακετυλιωμένης γκρελίνης, είτε GH καθ 'όλη αυτή την περίοδο 1 εβδομάδας (Zhao et al., 2010). Η πλειοψηφία των ερευνών σε ανθρώπους υποστηρίζει ότι η ενδοφλέβια χορήγηση γκρελίνης μειώνει τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος, με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση υπεργλυκαιμίας (Egido et al., 2002, Broglio et al., 2001). Πιθανόν η γκρελίνη να μειώνει την έκκριση της ινσουλίνης αλλάζοντας την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη (Castañeda et al., 2010). Παράλληλα, αξίζει να αναφερθεί ότι η γκρελίνη ασκεί διεγερτική επίδραση στη νεογλυκογένεση συμβάλλοντας και με αυτόν τον τρόπο στην ομοιοστασία της γλυκόζης (Tassone et al., 2003).

Τέλος, η γκρελίνη θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικά έναν χρήσιμο δείκτη για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και γενικότερα του μεταβολικού συνδρόμου (Churm et al., 2017). Άλλωστε, σύμφωνα με έρευνες διάφοροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της γκρελίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Ikezaki et al., 2002, Shiiya et al., 2002).

Η γκρελίνη φαίνεται να διεγείρει τη λιπογένεση και να ανταγωνίζεται τη λιπόλυση (Muccioli et al., 2002). Παράλληλα, βρέθηκε ότι η γκρελίνη αυξάνει την εναπόθεση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (Barazzoni et al., 2005). Τέλος, σε έρευνα του 2004 βρέθηκε ότι η γκρελίνη αυξάνει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων (Kim et al., 2004).

VI. Επίδραση γκρελίνης στο αναπαραγωγικό σύστημα γυναικών και ανδρών.

Μελέτες της τελευταίας δεκαπενταετίας προτείνουν ότι η γκρελίνη θα μπορούσε έχει ρυθμιστικό ρόλο στο αναπαραγωγικό σύστημα ανδρών και γυναικών (Garcia et al., 2007) και πράγματι, πολλές μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι η γκρελίνη ασκεί τη δράση της σε διάφορα επίπεδα του άξονα του υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδες. Υποδοχείς γκρελίνης υπάρχουν τόσο στον υποθάλαμο και στην υπόφυση όσο και στις ωοθήκες (Gaytan et al., 2003;2005). Παρακάτω θα εξηγηθεί αναλυτικά η πιθανή επίδραση της γκρελίνης στην αναπαραγωγική λειτουργία μέσω δράσεων της στις περιοχές αυτές.

1. Γκρελίνη και εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion - GnRH)

Ο υποθάλαμος έχει αναγνωριστεί ως η κύρια πηγή γκρελίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Παράλληλα, mRNA του υποδοχέα GHS-R1a έχει βρεθεί σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Σε αρουραίους η συστηματική χορήγηση γκρελίνης μειώνει in vivo τη συχνότητα παλμών GnRH. Σε μελέτη η χορήγηση ανταγωνιστή του υποδοχέα του νευροπεπτιδίου NPY κατάργησε την επίδραση της γκρελίνης στην παλμική έκκριση της GnRH (Lebrethon et al., 2007). Μελέτη σε τρωκτικά που είχαν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή έδειξε ότι η έκκριση GnRH αναστέλλεται μετά τη χορήγηση γκρελίνης (Fernandez-Fernandez et al., 2007). Τόσο στα θηλαστικά, όσο και στα μη θηλαστικά είδη η γκρελίνη επηρεάζει την έκκριση των γοναδοτροπινών δρώντας τόσο στον υποθάλαμο όσο και απευθείας στην υπόφυση (Fernandez-Fernandez et al., 2005).

2. Γκρελίνη και έκκριση γοναδοτροπινών

Σχετικά με την επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα προέρχονται κυρίως από μελέτες σε πειραματόζωα, ενώ η έρευνα στους ανθρώπους είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και συχνά με αντιφατικά αποτελέσματα.

Σχετικά με την LH, η γκρελίνη φαίνεται ότι μειώνει τη συχνότητα των ώσεων της σε διάφορα πειραματόζωα (Fernandez-Fernandez et al., 2007, Fernandez-Fernandez et al., 2004), αλλά και στον άνθρωπο (Lafranco et al., 2008). Έγχυση γκρελίνης στις κοιλίες του εγκεφάλου σε αρουραίους που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή και τους είχε χορηγηθεί οιστραδιόλη προκάλεσε ταχεία καταστολή της κατά ώσεις έκκριση της LH (Futura et al., 2001). Ο Martini και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η χορήγηση γκρελίνης σε νεαρά αρσενικά ποντίκια μείωσε τις συγκεντώσεις της LH, αλλά και την εκκριτικής απάντησης της LH στον παράγοντα kisspeptin-1 (Martini et al., 2006). Σε συνέχεια με το προηγούμενο, το 2009 ο Forbes και οι συνεργάτες του απέδειξαν την ικανότητα της γκρελίνης να μειώνει την έκφραση της Kisspeptin-1 στην μέση προοπτική περιοχή του υποθαλάμου σε θηλυκούς αρουραίους, κάνοντας έτσι πολύ πιθανή την υπόθεση αυτό να

αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της καταστολής της LH από την γκρελίνη (Forbes et al., 2009). Υπάρχουν αρκετές μελέτες σε θηλαστικά πειραματόζωα και ψάρια που δείχνουν αύξηση της έκκρισης της LH από τη γκρελίνη (Unniappan and Peter, 2004, Sokolowska-Mikolajczyk et al., 2009).

Η γκρελίνη φαίνεται να ασκεί κατασταλτική δράση όχι μόνο στην LH, αλλά και στην FSH (Vulliémoz et al., 2008). Σε έρευνα σε άρρενα ποντίκια παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της FSH μετά από 7 ημέρες χορήγησης γκρελίνης (Lanfranco et al., 2008). Στην ίδια έρευνα ωστόσο η FSH δεν φάνηκε να επηρεάζεται μετά τη χορήγηση γκρελίνης τόσο σε θήλεα φυσιολογικά ποντίκια, όσο και σε θήλεα και αρσενικά ποντίκια που είχαν υποστεί γοναδεκτομή (Lanfranco et al., 2008). Από την άλλη η χορήγηση GnRH είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της υποφυσιακής έκκρισης της LH, ενώ η FSH μειώθηκε μόνο στην περιωθυλακιωρηκτική φάση του κύκλου (Fernandez-Fernandez et al., 2005). Σε έρευνα από την ίδια ομάδα το 2006, η γκρελίνη αύξησε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την βασική έκκριση της FSH και της LH από την υπόφυση ιστών *in vitro*, ενώ ταυτόχρονα διαπιστώθηκαν πολλές διακυμάνσεις των επιπέδων του mRNA του υποδοχέα της γκρελίνης στην υπόφυση (Fernandez-Fernandez et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση γκρελίνης σε πρόβατα και αγελάδες έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκκρισης LH και FSH στα ζώα αυτά (Donolou et al., 2013, Chouzouris et al., 2016).

Έρευνα σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έδειξε ότι η χορήγηση γκρελίνης δεν επηρεάζει τη βασική και την προκαλούμενη από την GnRH έκκριση LH και FSH (Messini et al., 2009b). Σε άλλη έρευνα η από του στόματος χορήγηση ενός μιμητικού της γκρελίνης δε φάνηκε να επηρεάζει την έκκριση των γοναδοτροπινών, αλλά αύξησε τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης (Garcia and Polvino, 2009), ενώ ο Kluge και η ομάδα του υποστήριξαν σε έρευνα ότι τα επίπεδα της FSH μειώνονται μετά από εξωγενή χορήγηση γκρελίνης σε φυσιολογικούς άνδρες (Kluge et al., 2009). Μεταγενέστερη μελέτη της ίδιας ομάδας έδειξε κατασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση FSH και LH σε γυναίκες στις οποίες έγινε έγχυση πολλαπλών μικρών δόσεων γκρελίνης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Kluge et al., 2012). Σε μελέτη του 2013 στην οποία γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας ακολούθησαν για χρονικό διάστημα τριών μηνών συγκεκριμένο πρόγραμμα σωματικής άσκησης και διατροφής χαμηλής θερμιδικής αξίας

διαπιστώθηκε ότι αυξήθηκαν τα ημερήσια επίπεδα της γκρελίνης στον ορό και ότι μειώθηκε η έκκριση της LH στις γυναίκες αυτές (Scheid et al., 2013).

Η επίδραση των οιστρογόνων στη δράση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών είναι ένα από τα ερωτήματα που η παρούσα μελέτη διερευνά με το πειραματικό της κομμάτι.

3. Γκρελίνη και στεροειδείς ορμόνες του φύλου

Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των στεροειδών ορμονών του φύλου καθώς και η επίδραση των στεροειδών του φύλου στην έκκριση και δράση της γκρελίνης είναι ένα πεδίο έρευνας με συχνά αντιφατικά αποτελέσματα.

Τα ανδρογόνα φαίνεται ότι δρουν τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες ως ανεξάρτητοι ρυθμιστές στην έκκριση της γκρελίνης (Pagotto 2002, Gambineri et al., 2003). Σε επίμυες υπάρχει διαφοροποίηση στην δράση της γκρελίνης σε διάφορες φάσεις του κύκλου, κάτι που μπορεί να επηρεάζεται από τις ωθητικές ορμόνες (Fernández-Fernández et al., 2007). Μεταγενέστερη μελέτη σε επίμυες έδειξε αύξηση των επιπέδων της γκρελίνης μετά από ωθηκεκτομή και μείωση μετά τη χορήγηση οιστρογόνων (Matsubara et al., 2004). Μελέτη του πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έδειξε ότι δεν παρατηρούνται μεταβολές στις τιμές της γκρελίνης κατά τη διάρκεια φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Daforoulou et al., 2010). Η γκρελίνη βρέθηκε να είναι αυξημένη σε γυναίκες με αμηνόρροια λόγω νευρογενούς ανορεξίας (Tolle et al., 2003; Tanaka et al., 2003) και τα επίπεδα της βρέθηκε να μειώνονται κατά την αύξηση του σωματικού τους βάρους (Otto et al., 2001). Έρευνα των Grinspoon και συν. έδειξε ότι στις γυναίκες με την παραπάνω διαταραχή η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων, ή ανασυνδυασμένου IGF-1 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της κυκλοφορούσας γκρελίνης στο πλάσμα τους (Grinspoon et al., 2004).

Παράλληλα, αρκετές έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη μελέτη της επίδρασης των οιστρογόνων στην έκκριση της γκρελίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω: Χορήγηση οιστρογόνων από το στόμα για 6 μήνες σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες αύξησε τα επίπεδα της γκρελίνης, κάτι που δεν

παρατηρήθηκε μετά από διαδερμική χορήγηση της ορμόνης (Kellokoski et al., 2005). Άλλη μελέτη δείχνει ότι σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες πάσχουσες από μεταβολικό σύνδρομο στις οποίες χορηγήθηκαν οιστρογόνα είτε από το στόμα είτε διαδερμικά παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των επιπέδων της γκρελίνης (Chu et al., 2006). Πιο πρόσφατη μελέτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δε δείχνει μεταβολή των επιπέδων της γκρελίνης μετά τη χορήγηση σε αυτές διαφόρων συνδυασμών οιστρογόνων και προγεσταγόνων (Labrinoudaki et al., 2008). Τέλος, σε μελέτη του 2008, στην οποία χορηγήθηκαν οιστρογόνα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν μελετήθηκε απλά η συγκέντρωση της ολικής γκρελίνης, αλλά έγινε διαχωρισμός μεταξύ ακετυλιωμένης και μη γκρελίνης. Στην μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η χορήγηση οιστρογόνων σχετίζεται θετικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της ακετυλιωμένης γκρελίνης (Paulo et al., 2008).

Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, μία κατάσταση που, όπως είναι γνωστό, χαρακτηρίζεται εκτός των άλλων και από υπερανδρογοναιμία και χρόνια ανωοθυλακιορρηξία. Σε έρευνα σε παχύσαρκες γυναίκες με PCOS βρέθηκε να έχουν οι γυναίκες αυτές ακόμη χαμηλότερα επίπεδα γκρελίνης από ό, τι αναμενόταν με βάση τον παχύσαρκο φαινότυπο τους και επίσης περιγράφηκε από τους ερευνητές μία ισχυρά αρνητική συσχέτιση μεταξύ γκρελίνης και κυκλοφορούντων ανδρογόνων, ιδίως ανδροστενδιόνης (Pagotto, 2002). Άλλη έρευνα δείχνει ότι στις γυναίκες αυτές η μακροχρόνια χορήγηση ανδρογόνων μειώνει τα επίπεδα γκρελίνης (Gambineri et al., 2003). Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι σε μελέτη πάλι του Pagotto και συν. βρέθηκε ότι τα επίπεδα γκρελίνης ήταν σημαντικά μειωμένα σε παχύσαρκους άνδρες με υπογοναδισμό και περιγράφηκε θετική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης γκρελίνης και συγκέντρωσης ελεύθερης τεστοστερόνης (Pagotto et al., 2003).

Τέλος, η μέτρηση της γκρελίνης στο πλάσμα γυναικών κατά την προχωρημένη ωοθυλακική φάση είναι 3 φορές μεγαλύτερη από την τιμή της στο πλάσμα των ανδρών (Barkan et al., 2003). Για τη διαφορά αυτή πιθανόν να παίζουν κάποιο ρόλο οι υψηλές τιμές των κυκλοφορούντων ανδρογόνων στους άνδρες, αλλά ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης αυτής μεταξύ των ανδρογόνων, των οιστρογόνων και της γκρελίνης δεν είναι ακόμα γνωστός.

Η μελέτη της επίδρασης της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης και των γοναδοτροφινών σε γυναίκες αναπαραγωγικής και εμμηνοπαυσιακής ηλικίας και το πώς αυτό σχετίζεται με τα οιστρογόνα αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

4. Γκρελίνη και ωθητική στεροειδογένεση

Τόσο η γκρελίνη όσο και ο υποδοχέας της ανιχνεύονται στην ανθρώπινη ωθήκη και αυτό υποδεικνύει ένα ρόλο της γκρελίνης στην ωθητική λειτουργία. Συγκεκριμένα, γκρελίνη βρέθηκε στα κύτταρα της πύλης και μετά τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, ενώ ο υποδοχέας της εντοπίστηκε τόσο στο ωχρό σωματίο όσο και στο ωθυλάκιο. Η έκφραση της γκρελίνης στον άνθρωπο φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα μεγάλα κοιλιακά ωθυλάκια (Gaytan et al., 2003;2005).

Σε καλλιέργειες ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων, η γκρελίνη φάνηκε να ασκεί ανασταλτική δράση στη στεροειδογένεση (παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης) απουσία ή παρουσία hCG δρώντας μέσω του λειτουργικού υποδοχέα της GHS-R1a (Vianni et al., 2008). Μελέτη σε ωχρινοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι η γκρελίνη επηρεάζει τη σχέση μεταξύ ωχρινολυτικών και ωχρινοτρόφων παραγόντων μειώνοντας την παραγωγή προγεστερόνης και αυξάνοντας την παραγωγή προσταγλανδινών (Tropea et al., 2007). Επιπλέον, σε καλλιέργεια ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων κουνελιών που τους χορηγήθηκε γκρελίνη παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης, αλλά επίσης και IGF-1 και προσταγλανδίνης F, σε σχέση με την παραγωγή των αντίστοιχων ορμονών σε control δείγματα (χωρίς χορήγηση γκρελίνης) (Rak et al., 2009). Σχετικά πρόσφατη μελέτη σε χοίρους διαπίστωσε κατασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην βασική και προκαλούμενη από τις γοναδοτροπίνες παραγωγή και έκκριση οιστρογόνων στα πειραματόζωα αυτά (Rak-Mardyla et al., 2015). Υπάρχουν βέβαια και έρευνες σε πειραματόζωα που υποστηρίζουν αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή την επαγωγή της παραγωγής οιστραδιόλης από την γκρελίνη (Sirotkin and Grossmann, 2008).

5. Γκρελίνη και πολλαπλασιασμός και απόπτωση ωθητικών κυττάρων

Ο ευρύτερος ρόλος της γκρελίνης ως τροποποιητής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των όγκων είναι κάτι που έχει μελετηθεί σε αρκετές έρευνες (Jeffery et al., 2002). Σε *in vitro* μελέτη σε ωθήκες από κοτόπουλα η γκρελίνη φάνηκε να επάγει δείκτες πολλαπλασιασμού και να αναστέλλει δείκτες απόπτωσης των ωθητικών κυττάρων (Sirotkin and Grossmann, 2008).

Για τη διερεύνηση αυτής της δράσης της γκρελίνης στις ανθρώπινες ωθήκες και γενικότερα στα όργανα του γυναικείου γεννητικού συστήματος διενεργήθηκαν έρευνες για τη μελέτη της έκφρασης του GHS-R1A σε ομάδες κανονικών, μεταπλαστικών και νεοπλασματικών ιστών γυναικείου γεννητικού συστήματος (Gaytan et al., 2005). Στην έρευνα αυτή διαπιστώθηκε GHS-R1A ανοσοεντοπισμός σε ολόκληρη την επιφάνεια του ωθητικού και του σαλπγγικού επιθηλίου. Τέλος, λειτουργικές κύστεις από το επιφανειακό επιθήλιο και καλοήθεις όγκοι των οποίων το επιθήλιο μοιάζει με ορώδες επιθήλιο σάλπιγγας ήταν επίσης θετικοί, ενώ τα ορώδη κυσταδενοκαρκινώματα έδειξαν GHS-R1A έκφραση μόνο σε διαφοροποιημένα δείγματα. Η περαιτέρω έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο πεδίο παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς θα μπορούσε ίσως μελλοντικά να δημιουργήσει νέες προοπτικές για την αντιμετώπιση νεοπλασματικών όγκων του γυναικείου γεννητικού συστήματος.

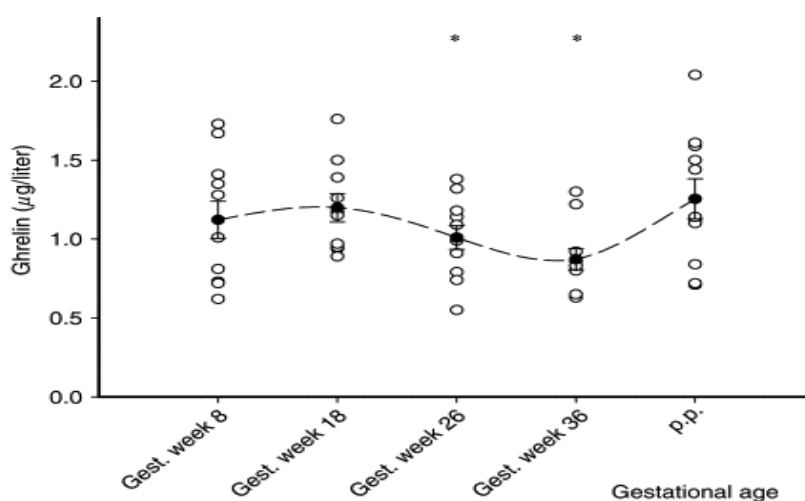
6. Γκρελίνη και : ωρίμανση του ωοθυλακίου, ανάπτυξη του εμβρύου και κύηση

Μελέτη υποστηρίζει ότι σε αρουραίους η γκρελίνη ασκεί ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου κατά τη φάση της αρχόμενης κύησης (Kawamura et al., 2003). Σε *in vitro* μελέτη χοίρειων ωοκυττάρων η γκρελίνη φάνηκε να αναστέλλει την ωρίμανση των ωοθυλακίων (Suzuki et al., 2010). Από την άλλη, έρευνα επίσης σε χοίρεια ωοκύτταρα που γονιμοποιήθηκαν *in vitro* δείχνει ότι η γκρελίνη θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στη βιωσιμότητα της βλαστοκύστης (Zhang et al., 2007)

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη του 2006 έδειξε ότι σε πειραματόζωα η χορήγηση γκρελίνης στη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης αυξάνει τη συγκέντρωση της γκρελίνης στο έμβρυο και οδηγεί σε αυξημένο βάρος γέννησης του τελευταίου (Nakahara et al., 2006).

Σε έρευνα σε ανθρώπινα έμβρυα διαπιστώθηκε ότι η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης σχετίζεται θετικά με χαμηλά ποσοστά κυκλοφορούσας γκρελίνης στην εμβρυική κυκλοφορία (Cortelazzi et al., 2003). Έρευνα έδειξε ότι στον ομφάλιο λώρο πρόωρων νεογνών η τιμή της γκρελίνης είναι χαμηλότερη σε σχέση με την τιμή της κυκλοφορούσας γκρελίνης στη μητέρα (Lanji et al., 2008), ενώ φαίνεται ότι συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο σε τελειόμηνα έμβρυα (Bellone et al., 2006). Ακόμη, φαίνεται σε έρευνα ότι πρόωρα νεογνά με κανονικό για την ηλικία κύησης βάρος έχουν υψηλότερα επίπεδα γκρελίνης σε σχέση με πρόωρα νεογνά με καθυστερημένη ενδομήτρια ανάπτυξη (Chiesa et al., 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η συγκέντρωση της γκρελίνης είναι σχετικά υψηλή σε τελειόμηνα νεογνά με χαμηλό για την ηλικία κύησης βάρος (Farquhar et al., 2003). Σε έρευνα του 2005 διαπιστώθηκαν υψηλότερες τιμές γκρελίνης στην ομφαλική αρτηρία παρά φλέβα, κάτι που πιθανότατα σημαίνει παραγωγή της από το έμβρυο (Fuglsang et al., 2005). Τέλος, νεογνά από καπνίστριες γυναίκες, τα οποία συνήθως χαρακτηρίζονται από χαμηλό βάρος γέννησης, εμφανίζουν σχετικά υψηλότερα ποσοστά γκρελίνης στην κυκλοφορία τους σε σχέση με νεογνά μη καπνιστριών γυναικών (Bouhours-Noue et al., 2006).

Σχετικά με τις διακυμάνσεις της γκρελίνης στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης (Σχήμα 13), έρευνα δείχνει ότι τα επίπεδα της σταδιακά αυξάνονται μέχρι τη μέση της κύησης και ότι μετά αρχίζουν να μειώνονται, για να παρατηρηθούν οι χαμηλότερες τιμές γκρελίνης στο τέλος της (Fuglsang et al., 2008).



Σχήμα 12. Τα επίπεδα της γκρελίνης κατά τη διάρκεια της κύησης (Fuglsang, 2008)

7. Γκρελίνη και ανδρικό γεννητικό σύστημα (συνοπτικά)

Δεδομένα από την μέχρι στιγμής βιβλιογραφία δείχνουν ότι η γκρελίνη διαδραματίζει κάποιον ρυθμιστικό ρόλο στην λειτουργία των όρχεων, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα (Tena-Sempere et al., 2002, Barreiro et al., 2002, Fernandez-Fernandez et al., 2005, Martini et al., 2006).

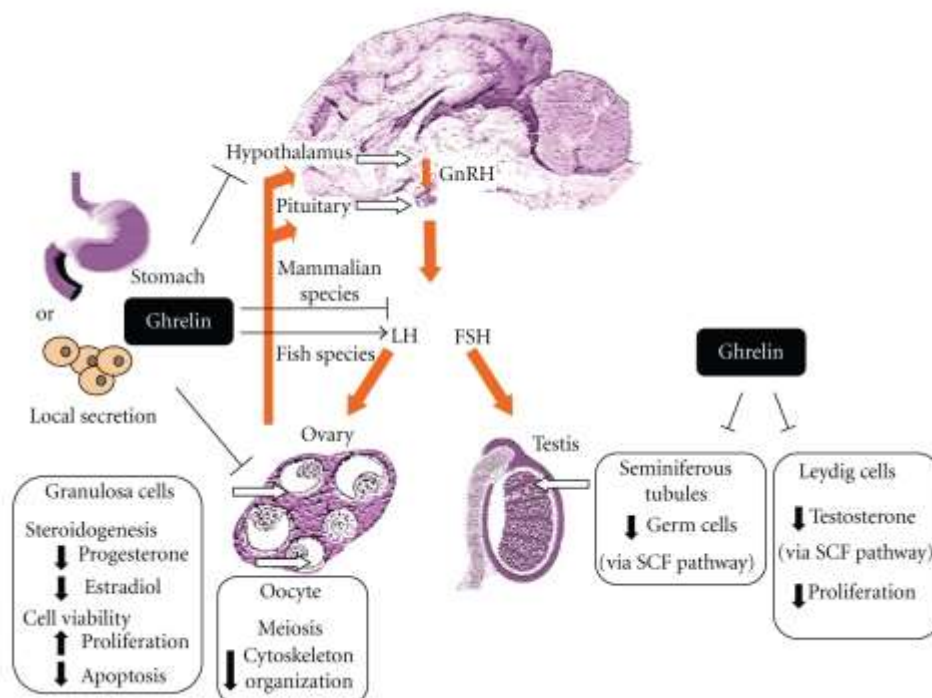
Έκφραση γκρελίνης έχει βρεθεί σε κύτταρα Leydig αρουραίων και προβάτων (Tena-Sempere et al., 2002, Barreiro et al., 2002). Στις προαναφερθέντες έρευνες βρέθηκε ότι η γκρελίνη ασκεί *in vitro* ανασταλτική δράση στην από την LH προκαλούμενη έκκριση της τεστοστερόνης στα πειραματόζωα αυτά. Οι Barreiro και συν. σε μελέτη το 2003 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στους επίμυες η έκφραση της γκρελίνης των όρχεων ρυθμίζεται από την LH, ενώ η ρύθμιση του υποδοχέα της γκρελίνης πραγματοποιείται από την ίδια την γκρελίνη και από την FSH (Barreiro et al., 2003). Σε έρευνα σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ορχικούς ιστούς διαπιστώθηκε η ύπαρξη του υποδοχέα της γκρελίνης στα κύτταρα του Leydig και στα κύτταρα Sertoli αλλά όχι στα γεννητικά κύτταρα (Gaytan et al., 2004). Σε αντίθεση με τα δεδομένα στον άνθρωπο και στους επίμυες, έρευνα σε όρχεις προβάτων έδειξε ύπαρξη γκρελίνης όχι μόνο στα κύτταρα Leydig και Sertoli αλλά και στα γεννητικά κύτταρα και μάλιστα με ένδειξη αυξημένης ανοσοαντιδραστικότητας γκρελίνης στα κύτταρα αυτά (Miller et al., 2005). Συνεπώς, μεταξύ των διαφόρων ειδών υπάρχουν διαφοροποιήσεις στον εντοπισμό της γκρελίνης στους όρχεις.

Η γκρελίνη φαίνεται ότι παίζει ρόλο και στη σπερματογένεση καθώς στους επίμυες ο υποδοχέας της εκφράζεται και στα σπερματοδόχα σωληνάρια των όρχεων τους (Barreiro et al., 2003). Υπάρχουν ενδείξεις ότι και στον άνθρωπο η γκρελίνη μπορεί να έχει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη σπερματογένεση (Ishikawa et al., 2007). Ενδοορχική έγχυση γκρελίνης σε επίμυες ανέστειλε την έκφραση του mRNA του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα βλαστικών κυττάρων (SCF), παράγοντας βασικός για την παραγωγή γεννητικών κυττάρων και την ανάπτυξη των κυττάρων Leydig (Barreiro et al., 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι και στον άνθρωπο η γκρελίνη μπορεί να έχει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη σπερματογένεση (Ishikawa et al., 2007).

Η νίνο ενδοορχική έγχυση γκρελίνης σε επίμυες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ανώριμων κυττάρων Leydig (Barreiro et al., 2004). Τέλος, τόσο η γκρελίνη όσο και ο υποδοχέας της έχουν ανιχνευτεί σε ορχικούς όγκους Gaytan et al., 2004).

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η γκρελίνη ασκεί πολλαπλές δράσεις και στο ανδρικό γεννητικό σύστημα. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα για αυτό το ρόλο της γκρελίνης, ιδίως στον άνθρωπο, είναι ιδιαίτερα περιορισμένα και είναι απαραίτητο να υπάρξουν περαιτέρω έρευνες προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της σε παθοφυσιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με το ανδρικό γεννητικό σύστημα.

Σχηματική αναπαράσταση επιδράσεων γκρελίνης σε όλα τα επίπεδα του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες:



Σχήμα 13. Η γκρελίνη δρά στο επίπεδο του υποθαλάμου και του ΚΝΣ και καταστέλλει την έκκριση της LH, είτε άμεσα αλλά και έμμεσα (π.χ. μέσω διαφοροποίησης της CRH) μέσω αναστολής της απελευθέρωσης της GnRH από τον υποθάλαμο. Επίσης, αναστέλλει την από την GnRH προκαλούμενη έκκριση LH από την υπόφυση, αλλά ενισχύει άμεσα τη βασική απελευθέρωση LH και FSH από αυτό το σημείο. Τόσο η γκρελίνη όσο και οι συγγενείς υποδοχείς της (GHSR1a) εκφράζονται στους όρχεις, όπου η γκρελίνη ρυθμίζει τη στεροειδογένεση, τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων Sertoli και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Leydig. Γκρελίνη και GHSR1a επίσης εκφράζονται στις ωθήκες, όπου η γκρελίνη έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει τη στεροειδογένεση, τη λειτουργία του ωχρού σωματίου, και το πολλαπλασιασμό των κυττάρων. (Dupont et al., 2010).

VII. Συνοπτικά άλλες δράσεις της γκρελίνης

Μελέτες δείχνουν ότι η γκρελίνη διεγείρει την έκκριση της προλακτίνης σε μικρό όμως βαθμό (Arvat et al., 2001). Μάλιστα, η δράση της αυτή φαίνεται να μην επηρεάζεται από τα ενδογενή οιστρογόνα σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (Messini et al., 2009a).

Τόσο η γκρελίνη, όσο και ο υποδοχέας της έχουν ανιχνευτεί στο θυρεοειδή σε διάφορες παθοφυσιολογικές συνθήκες (Gnanapavan et al., 2002). Ωστόσο, το κατά πόσο η γκρελίνη επηρεάζει την ικανότητα του θυρεοειδούς να παράγει ορμόνες ή το κατά πόσο επηρεάζει την λειτουργία των ορμονών αυτών στην περιφέρεια είναι κάτι που μέχρι στιγμής δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Οι μελέτες είναι αντικρουόμενες σχετικά με την παρουσία ή όχι γκρελίνης στα επινεφρίδια (Andreis et al., 2003). Έχει προταθεί η υπόθεση ότι η γκρελίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα των επινεφριδιακών κυττάρων (Tortorella et al., 2003).

Οι δράσεις της γκρελίνης στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι σχετικά καλά μελετημένες. Οι περισσότερες έρευνες συγκλίνουν σε μία θετική επίδραση της γκρελίνης στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, στη βελτίωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου, στην αύξηση της καρδιακής παροχής, στην μείωση του βαθμού αθηροσκλήρυνσης και στην ενίσχυση του αγγειακού ενδοθηλίου (Lilleness και Frishman, 2016).

Σχετικά με τον ρόλο της γκρελίνης στο ανοσοποιητικό σύστημα, φαίνεται να υπάρχει επίδραση της γκρελίνης στην παραγωγή προφλεγμονωδών και φλεγμονωδών ουσιών όπως IL-1, TNF-α και IL-6, αλλά παραμένει άγνωστο το αν η παραγωγή κυτταροκινών μέσω της δράσης της γκρελίνης στα T- λεμφοκύτταρα οδηγεί και σε ενεργή ανοσιακή απάντηση (Baatar et al., 2011).

Έχει μελετηθεί επίσης ο ρόλος της γκρελίνης στον οστικό μεταβολισμό. Φαίνεται ότι η γκρελίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Θα μπορούσε με αυτό τον τρόπο να θεωρηθεί ότι η γκρελίνη ασκεί μία θετική επίδραση στην αύξηση της οστικής πυκνότητας. Βέβαια, στον οστικό μεταβολισμό και στην οστεοπόρωση συμμετέχουν πολλοί μηχανισμοί με αποτέλεσμα ο βαθμός και η βαρύτητα της δράσης της γκρελίνης να μην έχει μελετηθεί ακόμη πλήρως (Sun et al., 2003, Bewick et al., 2009).

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως η μακροχρόνια χορήγηση γκρελίνης θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση αγχώδους συμπεριφοράς ή διαταραχών που μιμούνται αυτήν (Date et al., 2001).

Μελέτες δείχνουν ότι η γκρελίνη στους ανθρώπους προάγει τη φάση των βραδέων κυμάτων του ύπνου και πιθανολογείται η συμμετοχή της στην διαταραχή της αϋπνίας (Weikel et al., 2003).

Τέλος, σε πειράματα σε επίμυες στους οποίους εγχύθηκε γκρελίνη σε ιππόκαμπο, στην αμυγδαλή και στη ραχιαία ραφή του πυρήνα του εγκεφάλου αυξήθηκε με τρόπο δόσοεξαρτώμενο η διατήρηση της μνήμης (Asakawa et al., 2001a).

6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μετά την παραπάνω αναφορά στα βιβλιογραφικά δεδομένα, σχετικά με την αυξητική ορμόνη, τη γκρελίνη και τις γοναδοτροφίνες, προκύπτουν τα παρακάτω ερωτήματα:

1. Ποιός είναι ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη διεγερόμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης.
2. Ποιά είναι η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών της υποφύσεως και ποιός είναι ο ρόλος των οιστρογόνων.
3. Ποιός είναι ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη διεγερόμενη έκκριση της προλακτίνης.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να δώσει απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα, δηλαδή ποιά είναι η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των παραπάνω ορμονών σε γυναίκες υπό διάφορες συνθήκες οιστρογονικής επίδρασης. Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες γυναικών. Η πρώτη περιέλαβε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και η δεύτερη μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλες οι ασθενείς ενημερώθηκαν σχετικά με τη μελέτη και λήφθηκε έγγραφη συγκατάθεσή τους σχετικά με την συμμετοχή τους σε αυτή.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η εργασία περιέλαβε 20 φυσιολογικές εθελόντριες γυναίκες, οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ομάδα 1 και ομάδα 2. Η ομάδα 1 περιέλαβε 10 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, 20-35 ετών, ενώ η ομάδα 2 περιέλαβε 10 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ηλικίας 55-65 ετών. Και στις δύο ομάδες η μελέτη έγινε σε 2 φάσεις, όπως αναλύεται παρακάτω. Στις πειραματικές διαδικασίες, που περιγράφονται παρακάτω, οι χορηγηθείσες δόσεις της γκρελίνης χαρακτηρίστηκαν ως «υπομέγιστες» (submaximal).

ΟΜΑΔΑ 1

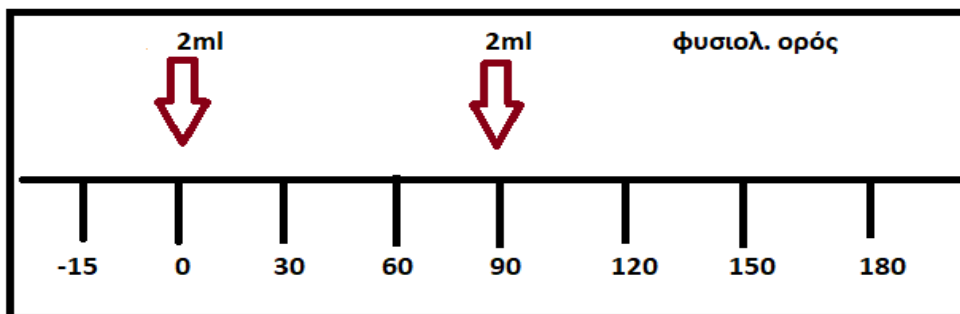
Στην ομάδα αυτή, όπως αναφέρθηκε, περιλήφθηκαν 10 φυσιολογικές εθελόντριες γυναίκες, ηλικίας 20-35 ετών (22.8 ± 1.2 έτη, $\text{mean} \pm \text{SEM}$). Όλες οι γυναίκες ήταν υγιείς, δηλαδή δεν έπασχαν από συστηματικά ή άλλα νοσήματα ή διαταραχές της λειτουργίας των ενδοκρινών αδένων. Επίσης, οι γυναίκες δεν υποβάλλονταν σε κάποια θεραπεία ή δεν είχαν λάβει ορμονικά σκευάσματα κατά τους τελευταίους 6 μήνες πριν από την είσοδο τους στη μελέτη. Ακόμη, οι γυναίκες είχαν φυσιολογική λειτουργία θυρεοειδούς και επινεφριδίων και φυσιολογικά επίπεδα προλακτίνης αίματος. Όλες οι γυναίκες είχαν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (BMI) ($21.0 \pm 1.1 \text{ kg/m}^2$) και φυσιολογικό γεννητικό κύκλο διάρκειας 27-28 ημερών. Η ωοθυλακιόρρηξια επιβεβαιώθηκε σε όλες τις γυναίκες με μέτρηση της προγεστερόνης στο αίμα την 21η ημέρα ενός από τους αμέσως προηγούμενους κύκλους. Οι γυναίκες μελετήθηκαν σε δύο κύκλους ως εξής:

- **1ος κύκλος (μαρτύρων):** Πραγματοποιήθηκε πειραματική διαδικασία δύο φορές στην ωοθυλακική φάση του κύκλου, δηλαδή στην αρχόμενη ωοθυλακική και συγκεκριμένα την 2η ημέρα του κύκλου και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση και συγκεκριμένα, όταν το ωοθυλάκιο έφτασε το μέγεθος των 16-17 mm, όπως αυτό εκτιμήθηκε υπερηχογραφικά (Σχήμα 14). Η κάθε πειραματική διαδικασία διήρκεσε 210 min και περιελάμβανε 15 min ανάπαυσης της κάθε γυναίκας, τη λήψη ενός πρώτου δείγματος αίματος αμέσως μετά (χρόνος -15 min), τη λήψη ενός δεύτερου δείγματος αίματος 15 min αργότερα (χρόνος 0 min) και αμέσως

μετά την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση φυσιολογικού ορού 2 ml (οξεία χορήγηση) (χρόνος 0 min) και επανάληψη της χορήγησης 90 min αργότερα (χρόνος 90 min) (Σχήμα 15).



Σχήμα 14. ΦΟ- φυσιολογικός ορός , ΑΩ- αρχόμενη ωθυλακική φάση, ΠΩ= προχωρημένη ωθυλακική φάση.

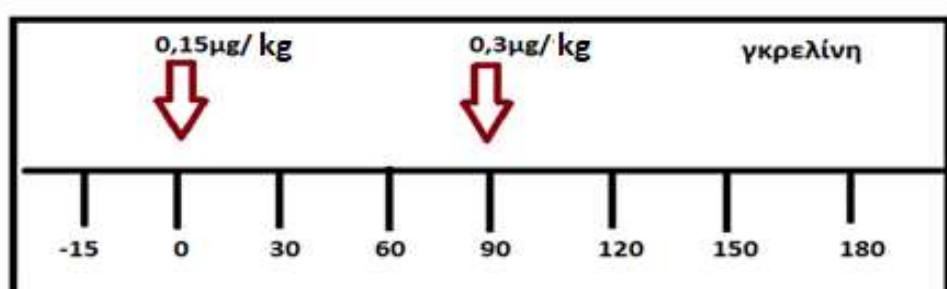


Σχήμα 15. Πειραματική διαδικασία με οξεία χορήγηση φυσιολογικού ορού (χρόνοι από -15 έως 180 min).

- **2ος κύκλος (μελέτης):** Πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία, που περιγράφηκε παραπάνω, τόσο στην αρχόμενη όσο και στην προχωρημένη ωθυλακική φάση (Σχήμα 16). Αντί όμως του φυσιολογικού ορού, στις γυναίκες χορηγήθηκε γκρελίνη στους αντίστοιχους χρόνους, δηλ. σε χρόνο 0 min και 90 min. Συγκεκριμένα, η γκρελίνη χορηγήθηκε με τη μορφή οξείας ενδοφλέβιας έγχυσης μέσω σύριγγας στη δόση των 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (χρόνος 0 min) και 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 90 min από τη χορήγηση της πρώτης δόσης (χρόνος 90 min) (Σχήμα 17).



Σχήμα 16. ΑΩ- αρχόμενη ωοθυλακική φάση, ΠΩ= προχωρημένη ωοθυλακική φάση.



Σχήμα 17. Πειραματική διαδικασία με οξεία χορήγηση γκρελίνης (χρόνοι από -15 έως 180 min).

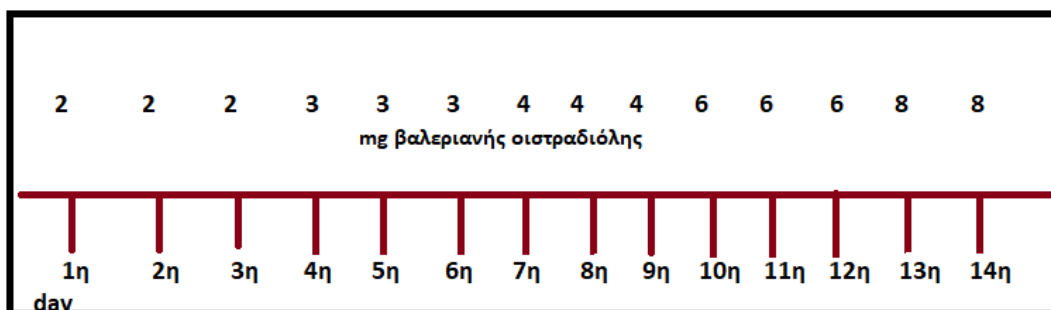
Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν το πρωί και συγκεκριμένα μεταξύ των ωρών 10.00 και 12.00 μετά από ολονύκτια νηστεία των γυναικών. Σε κάθε πειραματική διαδικασία, δείγματα αίματος λήφθηκαν από όλες τις γυναίκες σε χρόνους, ως προς την ένεση του φυσιολογικού ορού ή της γκρελίνης (χρόνος 0), -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 και 180 min. Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 g επί 15 min και το πλάσμα και ο ορός φυλάχτηκαν χωριστά σε -20°C μέχρι να γίνουν οι κατάλληλες ορμονικές μετρήσεις.

Στο πλάσμα, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ολικής γκρελίνης στους χρόνους -15 έως και 120 min, ενώ στον ορό όλων των δειγμάτων αίματος μετρήθηκαν η αυξητική ορμόνη, η FSH, η LH και η οιστραδιόλη. Η προγεστερόνη μετρήθηκε στο δείγμα αίματος που λήφθηκε στο χρόνο 0 min. Δεν παρατηρήθηκε καμία παρενέργεια κατά ή μετά τη χορήγηση της γκρελίνης.

ΟΜΑΔΑ 2

Η ομάδα αυτή περιέλαβε τις 10 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας 55-65 ετών. Οι γυναίκες ήταν υγιείς, ενώ δεν ελάμβαναν φαρμακευτική θεραπεία που να σχετίζεται με τους ενδοκρινείς αδένες, δεν είχαν δε καμία σοβαρή γυναικολογική ή άλλη πάθηση, όπως ήπατος, νεφρών, κακοήθεια κλπ. Ακόμη, η λειτουργία του θυρεοειδούς και των επινεφριδίων ήταν φυσιολογική καθώς και φυσιολογικά τα επίπεδα της προλακτίνης στο αίμα.

Στις γυναίκες, χορηγήθηκε βαλεριανική οιστραδιόλη από το στόμα για 14 ημέρες. Η ημέρα χορήγησης της πρώτης δόσης θεωρήθηκε ως ημέρα 1. Η δόση της οιστραδιόλης ήταν 2 mg τις ημέρες 1-3, 3 mg τις ημέρες 4-6, 4 mg τις ημέρες 7-9, 6 mg τις ημέρες 10-12 και 8 mg τις ημέρες 13 και 14. Η διάρκεια των 14 αυτών ημερών ονομάστηκε «εξομειωτική ωοθυλακική φάση», επειδή ο στόχος ήταν η μίμηση της ωοθυλακικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου από πλευράς στάθμης της οιστραδιόλης (Σχήμα 18). Μετά παρέλευση ενός μηνός, στις γυναίκες χορηγήθηκε και πάλι βαλεριανική οιστραδιόλη στο ίδιο δοσολογικό σχήμα με το παραπάνω.



Σχήμα 18. Εξομειωτική ωοθυλακική φάση μετά από εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Στις δύο χρονικές περιόδους χορήγησης της οιστραδιόλης (Α και Β), σε όλες τις γυναίκες πραγματοποιήθηκαν 4 πειραματικές διαδικασίες διάρκειας 210 min η κάθε μία (Experimental Procedures - Exp):

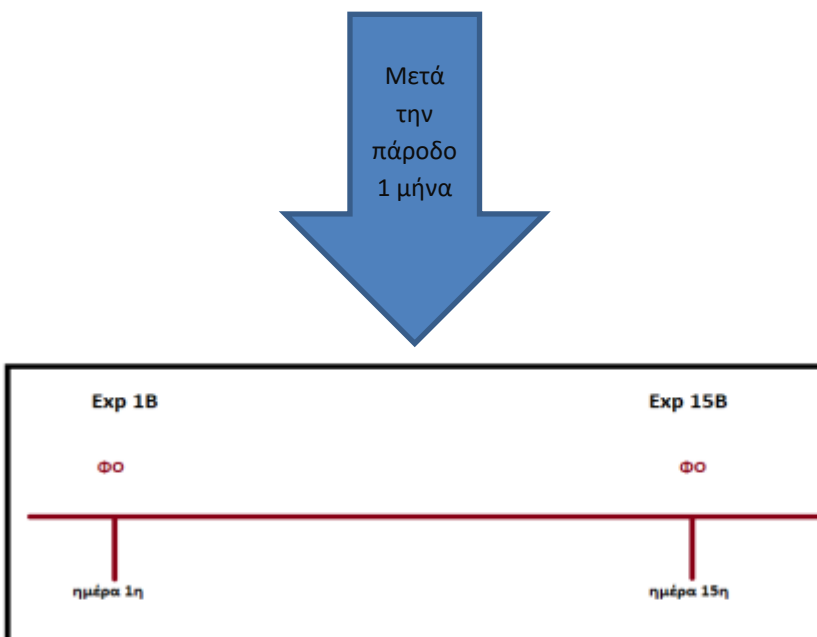
- 2 πειραματικές διαδικασίες με χορήγηση γκρελίνης (Exp 1A και Exp 15A) και

- 2 πειραματικές διαδικασίες με χορήγηση φυσιολογικού ορού (Exp 1B και Exp 15B). Συγκεκριμένα, η Exp 1A και η Exp 1B πραγματοποιήθηκαν την 1^η ημέρα των χρονικών περιόδων A και B αντίστοιχα, ενώ η Exp 15A και η Exp 15B πραγματοποιήθηκαν την 15^η ημέρα των χρονικών περιόδων χορήγησης οιστραδιόλης A και B αντίστοιχα.

Οι πειραματικές διαδικασίες στην ομάδα 2 ήταν ίδιες με τις παραπάνω περιγραφείσες πειραματικές διαδικασίες στην ομάδα 1. Συγκεκριμένα, στις Exp 1A και Exp 15A (Σχήμα 19), μετά από ολονύκτια νηστεία, χορηγήθηκε στις γυναίκες το πρωί των ημερών 1 και 15 (ώρες 10.00-12.00) γκρελίνη σε εφάπαξ ενδοφλέβια δόση των 0.15 μg/kg (χρόνος 0 min). Μία δεύτερη δόση γκρελίνης των 0.30 μg/kg χορηγήθηκε επίσης ενδοφλεβίως 90 min αργότερα (χρόνος 90 min). Δείγματα αίματος λήφθηκαν, σε σχέση με τη χορήγηση της πρώτης δόσης γκρελίνης (χρόνος 0), σε χρόνους -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 και 180 min. Μετά από παρέλευση ενός μηνός, όπως αναφέρθηκε, στις γυναίκες χορηγήθηκε και πάλι οιστραδιόλη για 14 ημέρες (χρονική περίοδος B). Στη δεύτερη αυτή χρονική περίοδο, πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες Exp 1B και Exp 15B, οι οποίες ήταν ίδιες με τις Exp 1A και Exp 15A, με τη διαφορά ότι αντί γκρελίνης χορηγήθηκε ενδοφλεβίως εφάπαξ φυσιολογικός ορός 2 ml στις ίδιες χρονικές στιγμές (0 και 90 min) (Σχήμα 20). Δείγματα αίματος λήφθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω.



Σχήμα 19. Πειραματικές διαδικασίες στη χρονική περίοδο Α χορήγησης οιστραδιόλης.



Σχήμα 20. Πειραματικές διαδικασίες στη χρονική περίοδο Β χορήγησης οιστραδιόλης.

Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα και ο ορός φυλάχτηκαν χωριστά σε -20°C μέχρι να μετρηθούν στο πλάσμα η γκρελίνη και στον ορό η αυξητική ορμόνη, η προλακτίνη, η FSH, η LH και η οιστραδιόλη.

8. ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν. Σε περίπτωση διαφοράς στα δύο αποτελέσματα μεγαλύτερη της τάξης του 5% οι μετρήσεις επαναλαμβάνονταν.

- Η **ολική γκρελίνη** μετρήθηκε στο πλάσμα με τη χρήση ραδιοανασοβιολογικής μεθόδου (KIPMR90, DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml.
- Η μέτρηση της αυξητικής ορμόνης (**GH**) στον ορό έγινε με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (hGH-IRMA, IMMUNOTECH S.A.S., Marseille Cedex, France) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.
- Η μέτρηση της **οιστραδιόλης** στον ορό έγινε με ραδιοανασοβιολογική μέθοδο (RIA-ESTRADIOL, IMMUNOTECH S.A.S., Marseille Cedex, France) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml.
- Η μέτρηση της **προγεστερόνης** στον ορό έγινε με ραδιοανασοβιολογική μέθοδο (PROG-RIA-CT, DIASource ImmunoAssays S.A., Louvain-la-Neuve, Belgium) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.
- Η μέτρηση των **FSH και LH** στον ορό έγινε με ανοσοραδιομετρικές μεθόδους (IRMA, IMMUNOTECH S.A.S., Prague, Czech Republic) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε IU/L.
- Η μέτρηση της **προλακτίνης** στον ορό έγινε με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (IRMA, IMMUNOTECH S.A.S., Prague, Czech Republic) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mIU/L.

Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης γκρελίνης, οιστραδιόλης, προγεστερόνης, FSH, LH, προλακτίνης και αυξητικής ορμόνης ήταν 40 pg/ml, 9.5 pg/ml, 0.05 ng/ml, 0.17 IU/L, 0.2 IU/L, 0.5 ng/ml και 0.1mIU/L αντίστοιχα. Η διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών μετρήσεων (inter-assay) και μέσα στην ίδια μέτρηση (intra-assay) ήταν 3.2% και 2.9%, 8.5% και 7.5%, 6.8% και 4.2%, 8.2% και 4.0%, 3.7% και 6.7%, 10.1% και 7.0% και 7.0% και 2.7% αντίστοιχα.

9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι τιμές των ορμονών έδειξαν ομαλή κατανομή (one sample Kolmogorov-Smirnov test). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) και ANOVA κατά ένα παράγοντα, ακολουθούμενες από Bonferroni post hoc testing και paired t-test. Το επίπεδο α στατιστικής σημαντικότητας ήταν το 0.05. Όλες οι μετρήσεις εκφράζονται ως mean±SEM. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

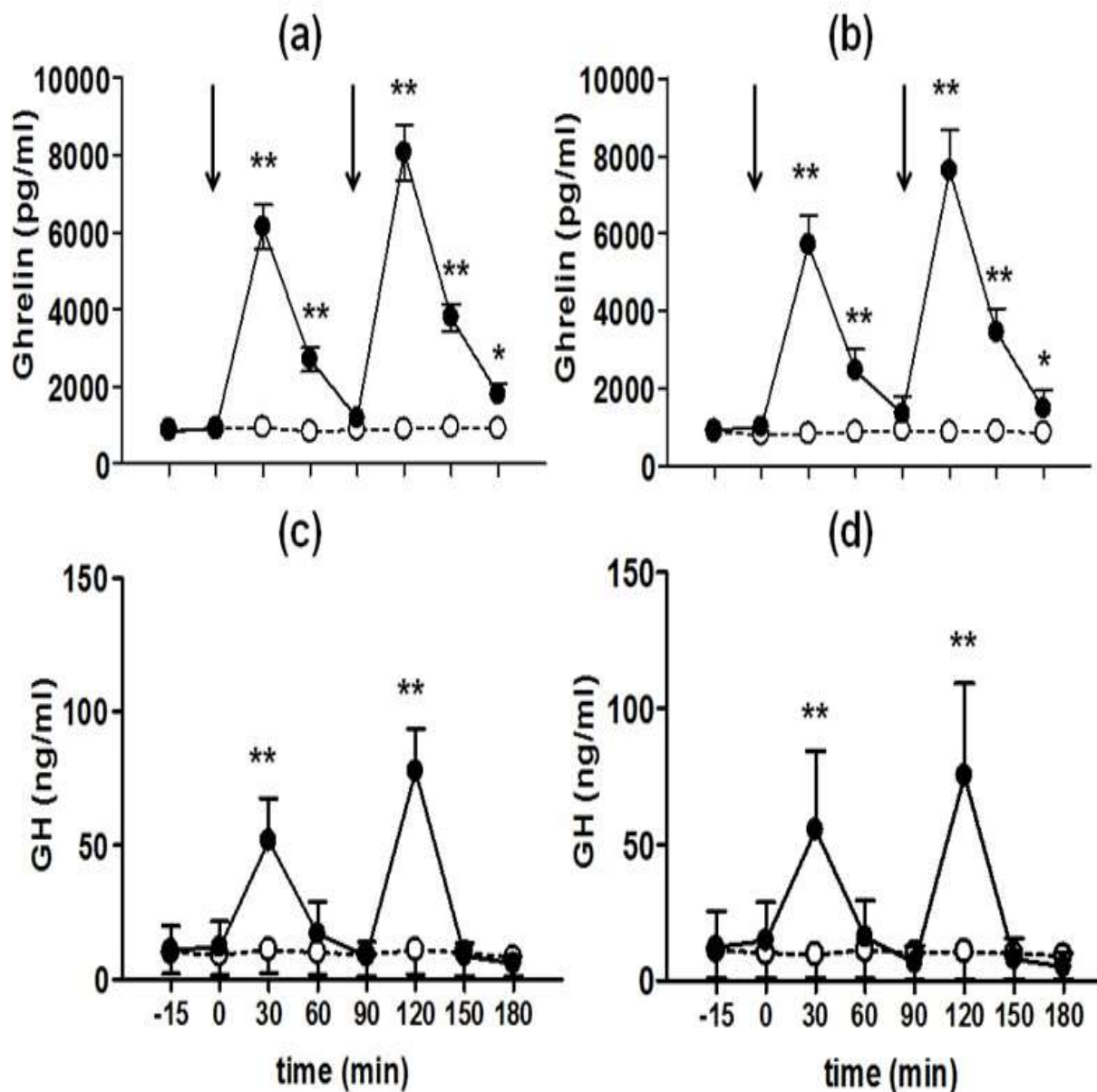
Συνολικά και στις δύο ομάδες γυναικών, πραγματοποιήθηκαν 80 πειραματικές διαδικασίες διάρκειας 210 min η κάθε μία. Χορηγήθηκαν συνολικά 80 δόσεις γκρελίνης και αντίστοιχα 80 δόσεις φυσιολογικού ορού.

A) Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας.

Για την απάντηση αυτού του ερωτήματος χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την ομάδα 1 γυναικών (10 φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας).

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό του αίματος την ημέρα 2 του κύκλου ήταν παρόμοια στους δύο κύκλους. Η μέτρηση αφορούσε στο χρόνο 0 min, δηλ. πριν τη χορήγηση του φυσιολογικού ορού (1^{ος} κύκλος-μαρτύρων) ή της γκρελίνης (2^{ος} κύκλος-μελέτης) (τιμές στον κύκλο μαρτύρων: 30.5 ± 5.0 pg/ml, τιμές στον κύκλο μελέτης: 26.1 ± 4.6 pg/ml). Το μέγεθος των ωοθυλακίων και η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο χρόνο 0 min του πειράματος στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση ήταν παρόμοια τόσο στον κύκλο με τη χορήγηση του φυσιολογικού ορού (μαρτύρων), όσο και στον κύκλο με τη χορήγηση γκρελίνης (μελέτης) (16.4 ± 0.2 mm και 16.5 ± 0.2 mm και 133.1 ± 22.6 pg/ml και 126.5 ± 23.4 pg/ml αντίστοιχα). Τα επίπεδα της οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση παρά στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση και στους δύο κύκλους ($P < 0.001$). Τα επίπεδα της προγεστερόνης ήταν πολύ χαμηλά και στις δύο φάσεις του κύκλου, χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κύκλων (< 1.0 ng/ml).

Το Σχήμα 21 δείχνει τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος και της αυξητικής ορμόνης του ορού κατά τη διάρκεια των δύο πειραματικών διαδικασιών στους δύο κύκλους.



Σχήμα 21. Τα επίπεδα της γκρελίνης (Ghrelin) και της αυξητικής ορμόνης (GH) στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (a και c) και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (b και d) πριν (-15 και 0 min) και μετά την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση (βέλη) : (●) γκρελίνης (0.15 μg/kg σε χρόνο 0 min και 0.30 μg/kg σε χρόνο 90 min) ή (○) φυσιολογικού ορού (2 ml σε χρόνο 0 και 90 min). **P<0.001, *P<0.05 (διαφορά από πειραματική διαδικασία φυσιολογικού ορού).

Τα επίπεδα της γκρελίνης ήταν παρόμοια στους δύο κύκλους τόσο στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (Σχήμα 21a) όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (Σχήμα 21b) κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (χρόνος 0 min). Τα επίπεδα της

γκρελίνης σε κάθε γυναίκα αυξήθηκαν σημαντικά μετά από κάθε ενδοφλέβια ένεση της ουσίας, με μέγιστες τιμές να παρατηρούνται σε χρόνους 30 min (αρχόμενη ωοθυλακική 6049 ± 181 pg/ml, προχωρημένη ωοθυλακική 5703 ± 362 pg/ml) και 120 min (αρχόμενη ωοθυλακική 8010 ± 228 pg/ml, προχωρημένη ωοθυλακική φάση 7613 ± 370 pg/ml), με την τιμή στα 120 min να είναι σημαντικά υψηλότερη από την τιμή στα 30 min και στις δύο φάσεις του κύκλου ($P < 0.001$). Οι μέγιστες τιμές της γκρελίνης στους δύο αυτούς χρόνους ήταν παρόμοιες τόσο στην αρχόμενη όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (Σχήμα 22a και Σχήμα 22b). Τέλος, οι τιμές της γκρελίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο χρόνο 90 min σε σχέση με αυτές στα 30 min και στα 150 και 180 min σε σχέση με αυτές στα 120 min (Σχήμα 21, $P < 0.001$).

Στην πειραματική διαδικασία στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, τα επίπεδα της γκρελίνης δεν αυξήθηκαν, αλλά παρέμειναν σταθερά τόσο στην αρχόμενη όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση, χωρίς διαφορές μεταξύ αυτών σε όλους τους χρόνους (Σχήμα 21).

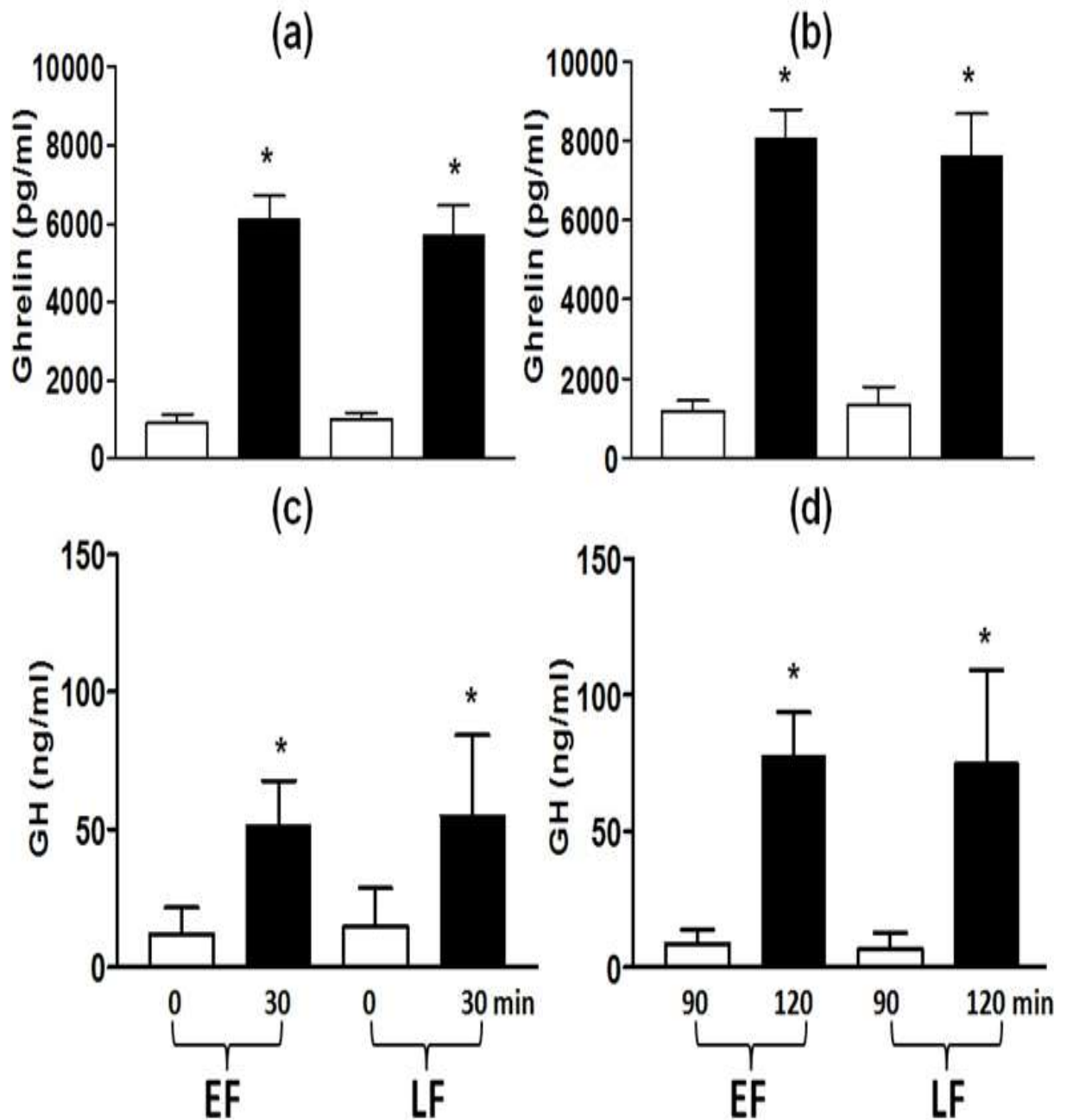
Οι τιμές της γκρελίνης ήταν σημαντικά υψηλότερες στις πειραματικές διαδικασίες του 2^{ου} κύκλου παρά του 1^{ου} κύκλου στους χρόνους 30, 60, 120 και 150 min ($P < 0.001$), καθώς και στο χρόνο 180 min ($P < 0.05$) και στις δύο φάσεις του κύκλου (Σχήμα 21a και 21b).

Τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης ήταν παρόμοια στον χρόνο 0 min και στις δύο φάσεις του κύκλου τόσο στον κύκλο μαρτύρων, όσο και στον κύκλο μελέτης (Σχήμα 21). Στον κύκλο μελέτης, μετά την πρώτη χορήγηση γκρελίνης, τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης αυξήθηκαν σημαντικά στα 30 min τόσο στην αρχόμενη (51.0 ± 5.1 ng/ml, $P < 0.001$, Σχήμα 21c) όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (55.3 ± 4.7 ng/ml, $P < 0.001$, Σχήμα 21d). Στη συνέχεια, τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης επέστρεψαν στη βασική τους τιμή στους χρόνους 60 και 90 min ($P < 0.001$), για να αυξηθούν ξανά στα 120 min μετά τη δεύτερη χορήγηση γκρελίνης. Αυτό συνέβη τόσο στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (76.0 ± 5.0 ng/ml, $P < 0.001$, Σχήμα 21c) όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (75.2 ± 11.3 ng/ml, $P < 0.001$, Σχήμα 21d). Και στις 2 φάσεις του κύκλου, η μέγιστη τιμή της αυξητικής ορμόνης στα 120 min ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτήν στα 30 min ($P < 0.001$). Η τιμή της αυξητικής ορμόνης μειώθηκε σημαντικά στα 150 και 180 min σε σύγκριση με την τιμή της στα 120 min και στις 2 φάσεις του κύκλου ($P < 0.001$, Σχήμα 21c).

and 21d). Οι μέγιστες τιμές της αυξητικής ορμόνης στα 30 και 120 min στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση δεν διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες τιμές στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (Σχήμα 22).

Στις πειραματικές διαδικασίες με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού, οι τιμές της αυξητικής ορμόνης παρέμειναν σταθερές χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φάσεων του κύκλου σε όλους τους χρόνους μέτρησής της. Τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης στους χρόνους 30 και 120 min ήταν σημαντικά υψηλότερα στους κύκλους με τη χορήγηση γκρελίνης σε σύγκριση με τους κύκλους με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού και στις δύο φάσεις του κύκλου ($P < 0.001$, Σχήμα 21c and 21d).

Τέλος, οι αυξομειώσεις των τιμών της γκρελίνης και της αυξητικής ορμόνης ήταν σχεδόν πανομοιότυπες και στις δύο φάσεις του κύκλου στις πειραματικές διαδικασίες στις οποίες χορηγήθηκε γκρελίνη.



Σχήμα 22. Επίπεδα γκρελίνης (Ghrelin) και αυξητικής ορμόνης (GH) στην αρχόμενη ωοθυλακική (earlyfollicular-EF) και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου (latefollicular- LF) : (□) πριν (χρόνοι -15 και 0 min) και (■) μετά (χρόνοι 30 και 120 min) την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση γκρελίνης (0.15 μg/kg στα 0 min και 0.30 μg/kg στα 90 min) ή (□) φυσιολογικού ορού (2 ml στα 0 και 90 min). **P<0.001 (διαφορά μεταξύ 30 και 0 min και μεταξύ 120 και 90 min).

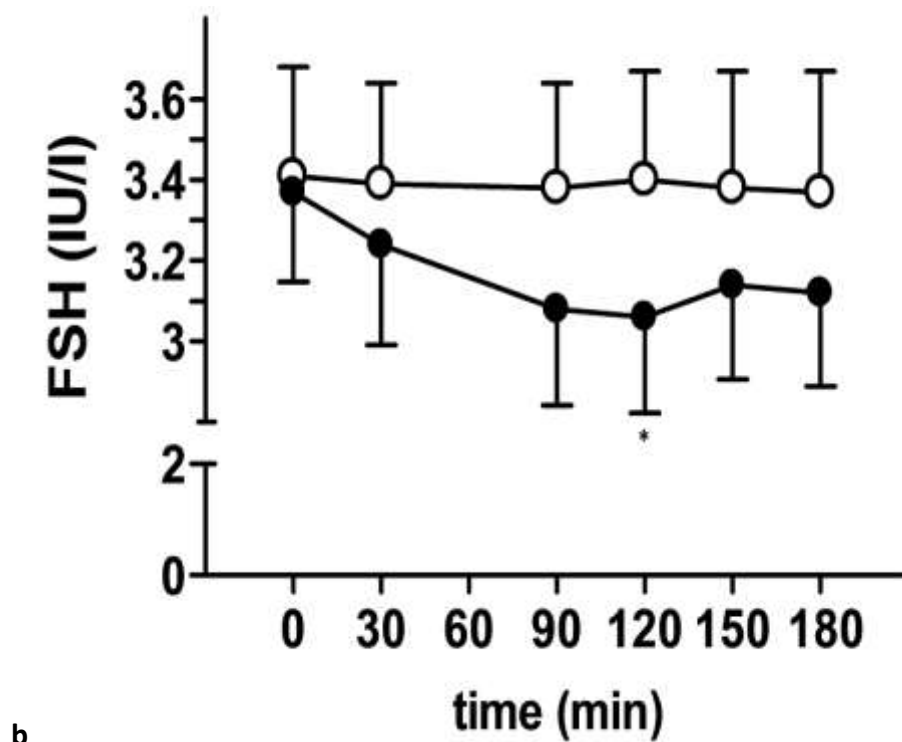
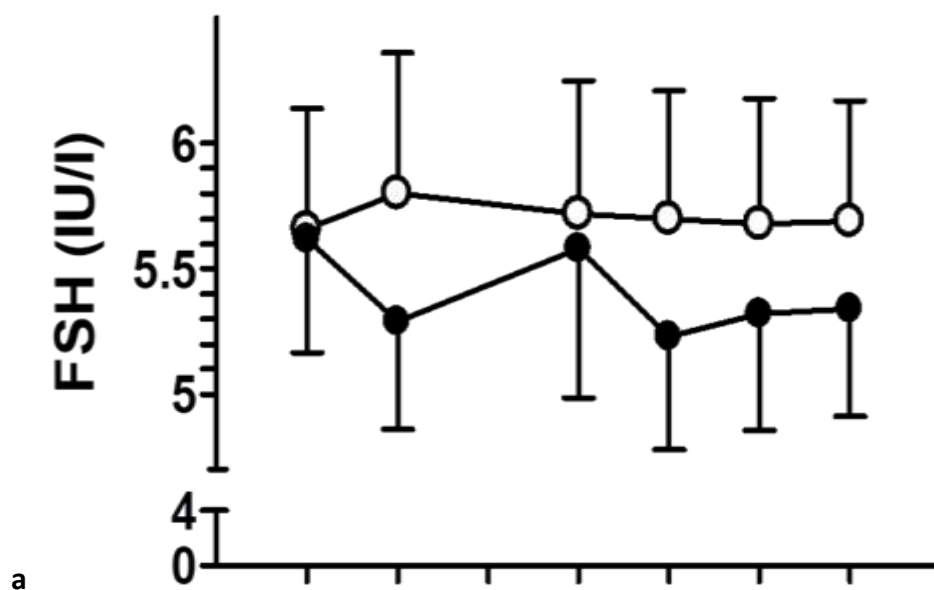
B) Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας.

Για την απάντηση αυτού του ερωτήματος χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την ομάδα 1 γυναικών (10 φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας).

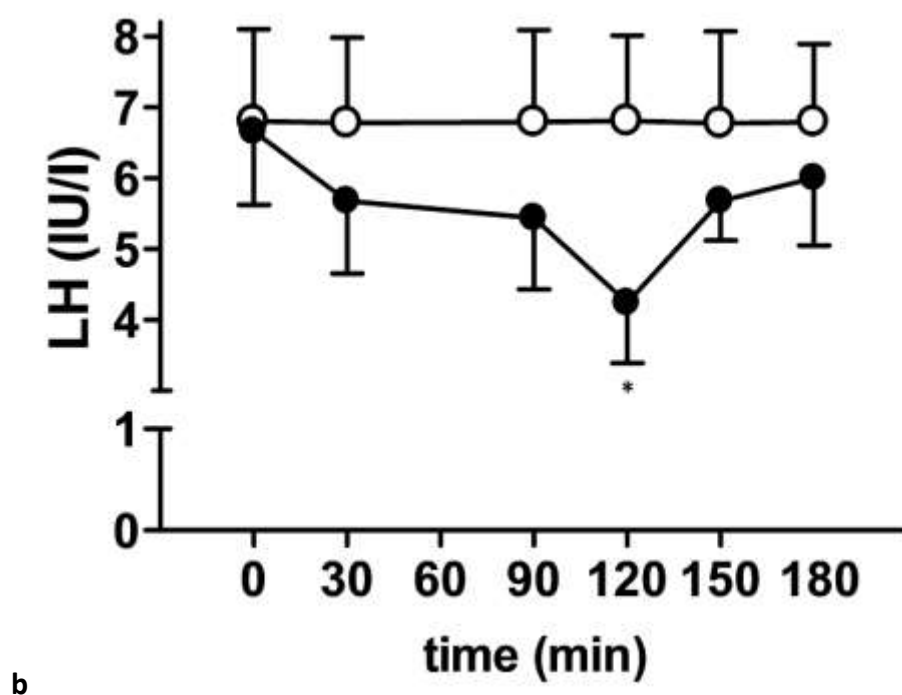
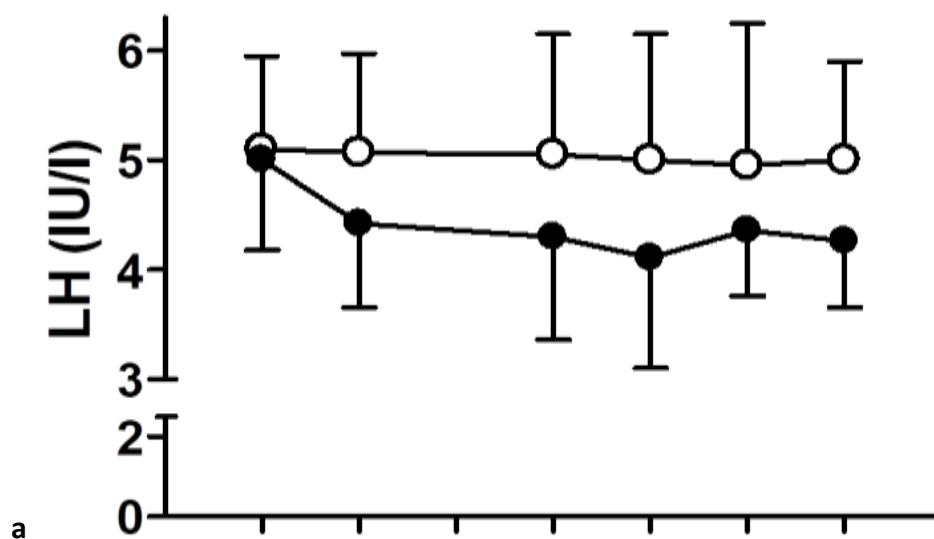
Τα επίπεδα της γκρελίνης, της οιστραδιόλης, της αυξητικής ορμόνης και της προγεστερόνης της ομάδας 1 των γυναικών σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες περιγράφηκαν αναλυτικά παραπάνω.

Οι βασικές τιμές (αναφοράς) των FSH και LH σε κάθε πειραματική διαδικασία υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή ανάμεσα σε -15 και 0 min.

Τα επίπεδα της FSH στον κύκλο μελέτης ήταν στατιστικά χαμηλότερα στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (3.40 ± 0.21 IU/L) από ό,τι στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (5.64 ± 0.45 IU/L, $P < 0.01$, Σχήμα 23). Στον κύκλο μελέτης, οι τιμές της FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (Σχήμα 23a) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στα 30 min ($p < 0.05$), εν συνεχεία επάνοδο στη βασική τους τιμή στα 90 min, για να μειωθούν ξανά στα 120 min ($p < 0.05$), οπότε και παρέμειναν σταθερές μέχρι το χρόνο 180 min. Στον αντίστοιχο κύκλο μαρτύρων, τα επίπεδα της FSH ήταν παρόμοια σε όλους τους χρόνους της διαδικασίας και γενικά, ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα της FSH στην πειραματική διαδικασία με τη χορήγηση γκρελίνης, παρόλο που αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 23a). Στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου μελέτης (Σχήμα 23b), οι τιμές της FSH μειώνονταν σταδιακά από την αρχή (0 min) έως το χρόνο 90 min ($p < 0.001$) για να παραμείνουν τελικά σταθερά χαμηλές μέχρι το τέλος της διαδικασίας ($p < 0.01$). Αντίθετα, στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου μαρτύρων (Σχήμα 23b), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση της FSH στον ορό των γυναικών κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Στην πειραματική διαδικασία με τη χορήγηση γκρελίνης, οι τιμές της FSH ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο χρόνο 120 min από τις αντίστοιχες τιμές της ορμόνης στην πειραματική διαδικασία με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού ($p < 0.05$, Σχήμα 23b).



Σχήμα 23. Επίπεδα FSH α στην αρχόμενη ωιθυλακική (ημέρα 2) και β στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου (μέγεθος ωοθυλακίου 16-17mm), πριν (χρόνος 0 min) και μετά την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση των δύο δόσεων (●) γκρελίνης (0.15μg/kg στα 0 min και 0.30 μg/kg στα 90 min), ή (ο) φυσιολογικού ορού (2 ml στα 0 και 90 min). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mean±SEM. *P<0.05 (pairedt-test).



Σχήμα 24. Επίπεδα LHα στην αρχόμενη ωοθυλακική (ημέρα 2) και b στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου (μέγεθος ωοθυλακίου 16-17mm), πριν (χρόνος 0 min) και μετά την εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση των δύο δόσεων (●) γκρελίνης (0.15μg/kg στα 0 min και 0.30 μg/kg στα 90 min), ή (ο) φυσιολογικού ορού (2 ml στα 0 και 90 min). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mean±SEM. *P<0.05 (pairedt-test).

Το Σχήμα 24 δείχνει τα επίπεδα της LH στον ορό των γυναικών κατά τη διάρκεια των δύο πειραματικών διαδικασιών. Τα επίπεδα της LH στον κύκλο μελέτης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (6.64 ± 0.72 IU/L) σε σύγκριση με τα επίπεδα της στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (5.04 ± 0.82 IU/L, $p < 0.01$). Στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου μελέτης (Σχήμα 24a), η χορήγηση γκρελίνης δεν είχε καμία επίδραση στις τιμές της LH, οι οποίες παρέμειναν αμετάβλητες καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση στον κύκλο μαρτύρων, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της LH ανάμεσα στις δύο πειραματικές διαδικασίες σε όλη τη διάρκεια τους στους αντίστοιχους χρόνους. Στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου μελέτης (Σχήμα 24b), τα επίπεδα της LH μειώθηκαν σημαντικά στους χρόνους 90min ($p < 0.01$) και 120 min ($p < 0.001$) σε σύγκριση με τις βασικές τιμές της ορμόνης. Από την άλλη, στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου μαρτύρων, τα επίπεδα της LH παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Στην πειραματική διαδικασία με τη χορήγηση γκρελίνης, οι τιμές της LH ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο χρόνο 120 min συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές της LH στη διαδικασία με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού ($p < 0.05$) (Σχήμα 24b)

Γ) Η επίδραση «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης στα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης, των γοναδοτροπινών και της προλακτίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Για τη διερεύνηση του παραπάνω ερωτήματος χρησιμοποιήθηκαν οι 10 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες της ομάδας 2.

Τα χαρακτηριστικά των γυναικών, που συμμετείχαν στην ομάδα 2 της παρούσης μελέτης, φαίνονται στον Πίνακα 1.

Αριθμ. Γυναικών	10
Ηλικία (έτη)	63.6±2.5
Ηλικία (έτη) κατά την εμμηνόπαυση	49.6±0.8
Ετη από την εμμηνόπαυση	14.0±3.2
BMI (kg/m²)	25.9±1.3
FSH (IU/L)	52.2±6.1
LH (IU/L)	31.6±3.8

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, που συμμετείχαν στη μελέτη (mean±SEM)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κάθε γυναίκα υποβλήθηκε συνολικά σε 4 πειραματικές διαδικασίες, τις **Exp 1A, Exp 15A, Exp 1B** και **Exp 15B**.

Τα επίπεδα των FSH, LH, οιστραδιόλης και αυξητικής ορμόνης στον ορό του αίματος στο χρόνο 0 min ήταν παρόμοια στην έναρξη της Exp 1A (περίοδος A με χορήγηση γκρελίνης, ημέρα 1A) και στην έναρξη της Exp 1B (περίοδος B με χορήγηση φυσιολογικού ορού, ημέρα 1B), όπως αυτό φαίνεται στον Πίνακα 2.

	Exp1A	Exp15A	Exp1B	Exp15B
Estradiol pg/ml	27.4±2.6	142.5±22.4*	18.9±2.9	150.5±21.0**
Ghrelin pg/ml	630±26	699±55	571±51	624±36
FSH IU/L	54.0±5.5	32.8±4.1***	55.3±6.4	34.0±5.1 [†]
LH IU/L	31.7±3.8	26.3±4.5	29.6±4.7	25.3±4.4
GH mIU/L	0.67±0.23	1.32±0.46	1.31±0.42	1.45±0.50
PRL ng/ml	4.08±0.28	7.90±0.69 ^{††}	5.20±0.41	7.62±0.68 ^{†††}

*P<0.001 (difference from Exp 1A).

**P<0.001 (difference from Exp 1B).

***P<0.001 (difference from Exp 1A).

† P<0.01 (difference from Exp 1B).

†† P<0.01 (difference from Exp 1A).

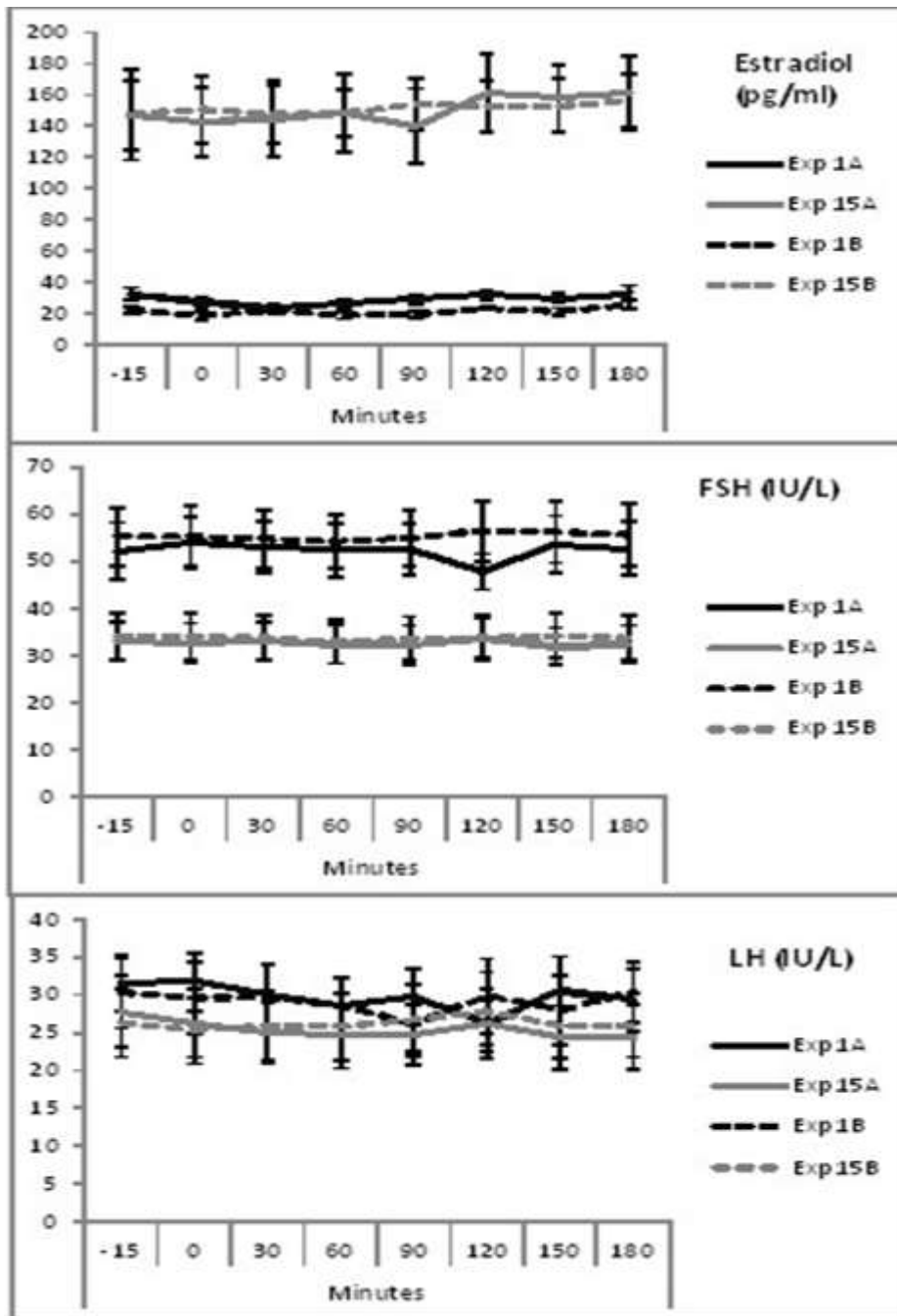
††† P<0.01 (difference from Exp 1B).

Πίνακας 2. Βασικά επίπεδα των ορμονών στο χρόνο 0 min στις 4 πειραματικές διαδικασίες (mean±SEM).

Από τον Πίνακα 2 προκύπτει ότι μετά την εξωγενή χορήγηση της οιστραδιόλης στις γυναίκες, οι συγκεντρώσεις της ορμόνης αυτής αυξήθηκαν σημαντικά και συγκεκριμένα από 27.4±2.6 pg/mL την ημέρα 1A σε 142.5±22.4 pg/mL την ημέρα 15A και από 18.9±2.9 pg/mL την ημέρα 1B σε 150.5±21.0 pg/mL την ημέρα 15B (P<0.001), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο περιόδους στους αντίστοιχους χρόνους. Στο τέλος της χορήγησης της οιστραδιόλης και στις 2 περιόδους, οι συγκεντρώσεις της FSH μειώθηκαν σημαντικά τις ημέρες 15A και 15B συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τις ημέρες 1A και 1B αντίστοιχα (P<0.05), ενώ οι συγκεντρώσεις των LH και της αυξητικής ορμόνης δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της προλακτίνης αυξήθηκαν σημαντικά από τις ημέρες 1A και 1B στις ημέρες 15A (P<0.001) και 15B αντίστοιχα (P<0.05) (Πίνακας 2).

Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από το χρόνο -15 min στο χρόνο 180 min σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες (Σχήμα 25). Όμως, οι συγκεντρώσεις της ορμόνης αυτής ήταν σε όλους τους αντίστοιχους χρόνους μεγαλύτερες στις πειραματικές διαδικασίες Exp 15A και Exp 15B συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις στις διαδικασίες Exp 1A και Exp 1B ($P < 0.001$, Σχήμα 25). Μετά την εξωγενή ενδοφλέβια χορήγηση της γκρελίνης, τα επίπεδα της ορμόνης αυτής στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά τόσο κατά τη πειραματική διαδικασία Exp 1A (από 630 ± 26 pg/mL στα 0 min σε 5111 ± 135 pg/mL στα 30 min και 5190 ± 158 pg/mL στα 120 min, $P < 0.001$) όσο και κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας Exp 15A (από 699 ± 55 pg/mL στα 0 min σε 5053 ± 512 pg/mL στα 30 min και 5804 ± 274 pg/mL στα 120 min, $P < 0.001$).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 25, τα επίπεδα της FSH στον ορό του αίματος δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από τα -15 στα 180 min σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Τα επίπεδα όμως της ορμόνης αυτής ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε όλους τους αντίστοιχους χρόνους στις πειραματικές διαδικασίες Exp 15A και Exp 15B συγκριτικά με τα επίπεδά της στις διαδικασίες Exp 1A και Exp 1B ($P < 0.05$). Σχετικά με την LH, οι συγκεντρώσεις της ορμόνης αυτής ήταν σχετικά σταθερές κατά τη διάρκεια της κάθε πειραματικής διαδικασίας χωριστά, αλλά σε αντίθεση με την FSH, οι συγκεντρώσεις της LH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 4 πειραματικών διαδικασιών στους αντίστοιχους χρόνους (Σχήμα 25). Αν και οι τιμές των FSH και LH δεν μεταβλήθηκαν μετά την ενδοφλέβια χορήγηση της γκρελίνης, εν τούτοις υπολογίστηκε η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC). Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά στις τιμές της FSH AUC μεταξύ των πειραματικών διαδικασιών Exp 1A (-866 ± 107 IU/L/180 min) και Exp 1B (-882 ± 137 IU/L/180min) και των διαδικασιών Exp 15A (-470 ± 98 IU/L/180min) και Exp 15B (-538 ± 104 IU/L/180min). Αντίστοιχα, για την LH, οι τιμές AUC ήταν -675 ± 191 , -673 ± 139 , -463 ± 125 και -410 ± 120 IU/L/180min, χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



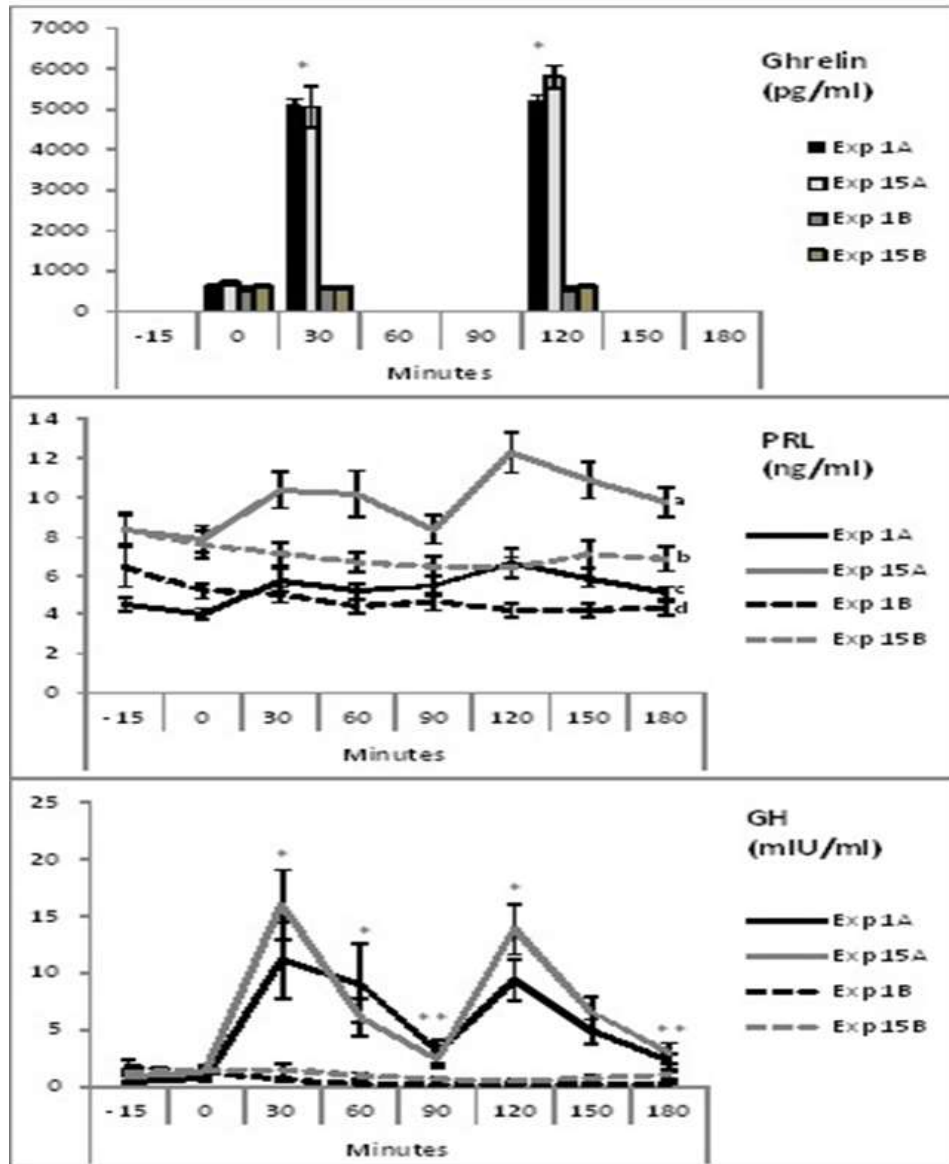
Σχήμα 25. Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης, της FSH και της LH στον ορό των γυναικών και στις 4 πειραματικές διαδικασίες (mean±SEM)

Σε απάντηση στις 2 ενδοφλέβιες δόσεις της γκρελίνης, τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης αυξήθηκαν σημαντικά με μέγιστες τιμές στους χρόνους 30 min και 120 min, τόσο στην πειραματική διαδικασία Exp 1A ($F_{7,62}=4.37$, $P<0.001$) όσο και στην πειραματική διαδικασία Exp 15A ($F_{7,64}=11.69$, $P<0.001$, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των δύο πειραματικών διαδικασιών (Σχήμα 26). Στις πειραματικές διαδικασίες Exp 1B και Exp 15B, τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης παρέμειναν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των διαδικασιών. Συγκριτικά με τις πειραματικές διαδικασίες Exp 1B και Exp 15B, οι τιμές της αυξητικής ορμόνης στις πειραματικές διαδικασίες Exp 1A και Exp 15A ήταν σημαντικά υψηλότερες στους χρόνους 30 ($P<0.001$), 60 ($P<0.001$), 90 ($P<0.05$), 120 ($P<0.001$) και 150 min ($P<0.05$) (Σχήμα 26). Η AUC της αύξησης της αυξητικής ορμόνης μετά τις 2 ενδοφλέβιες δόσεις γκρελίνης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των πειραματικών διαδικασιών Exp 1A (1^η δόση: -526.6 ± 179.8 mIU/L/90min, 2^η δόση: -361.2 ± 57.8 mIU/L/90min) και Exp 15A (-557.6 ± 118.0 και -491.1 ± 88.9 mIU/L/90min, αντιστοίχως) ή μεταξύ των δύο δόσεων μέσα σε κάθε πειραματική διαδικασία.

Τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό αυξήθηκαν σημαντικά μετά τις δύο δόσεις γκρελίνης τόσο στην πειραματική διαδικασία Exp 1A (από το χρόνο 0 min μέχρι τους χρόνους 30 min και 120 min, $F_{2,23}=3.57$, $P<0.05$) όσο και στην πειραματική διαδικασία Exp 15A (από -15 μέχρι 180 min, $F_{7,64}=3.87$, $P<0.01$). Οι μέγιστες τιμές της προλακτίνης σημειώθηκαν στους χρόνους 30 min και 120 min στις δύο αυτές πειραματικές διαδικασίες (Σχήμα 26). Σε αντίθεση με τις πειραματικές διαδικασίες Exp 1A και Exp 15A, στις διαδικασίες Exp 1B και Exp 15B τα επίπεδα της προλακτίνης δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές καθ' όλη τη διάρκεια τους (Σχήμα 26). Τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό των γυναικών ήταν μεγαλύτερα στην πειραματική διαδικασία Exp 15A σε σύγκριση με τα επίπεδα στη διαδικασία Exp 1A και στη διαδικασία Exp 15B σε σύγκριση με τα επίπεδα στην διαδικασία Exp 1B σε όλους τους αντίστοιχους χρόνους μέτρησης της ορμόνης ($P<0.001$). Επιπρόσθετα, στην πειραματική διαδικασία Exp 15A, οι συγκεντρώσεις της προλακτίνης ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις στη διαδικασία Exp 15B, από το χρόνο 30 min μέχρι το χρόνο 180 min ($P<0.001$) καθώς και στη διαδικασία Exp 1A σε σύγκριση με τη διαδικασία Exp 1B στους χρόνους 120 min και 150 min ($P<0.05$) (Σχήμα 26). Η AUC της αύξησης της προλακτίνης μετά τις δόσεις της γκρελίνης ήταν μεγαλύτερη στη διαδικασία Exp 15A (1^η δόση: 140.3 ± 42.7 ng/mL/90min,

2^η δόση: 189.4±45.2 ng/mL /90min) παρά στη διαδικασία Exp 1A(16.6±36.4 και 41.5±35.9 ng/mL/90min αντίστοιχα, P<0.05), χωρίς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο δόσεων της κάθε πειραματικής διαδικασίας. Για να αποκλεισθεί η πιθανότητα λάθους στον υπολογισμό της AUC, λόγω των υψηλότερων αρχικών τιμών της προλακτίνης στο χρονικό σημείο 0 min, στη διαδικασία Exp 15A σε σύγκριση με τη διαδικασία Exp 1A, η διαφορά στις τιμές της προλακτίνης μεταξύ των δύο αυτών πειραματικών διαδικασιών υπολογίστηκε χωριστά σε κάθε χρονική στιγμή (καθαρή αύξηση -ΔPRL). Διαπιστώθηκε ότι η ΔPRL στα 120 min (7.25±1.04 ng/mL) και στα 150 min (6.08±0.75 ng/mL) ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την τιμή στη χρονική στιγμή 0 min (3.84±0.70 ng/mL, F_{1,16}=7.32 και F_{1,16}=4.76, αντίστοιχα, P<0.05).

Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην τιμή της ΔPRL στους χρόνους 0 min και 180 min (5.35±0.70 ng/mL).



Σχήμα 26 . Οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης, της προλακτίνης και της αυξητικής ορμόνης στις 4 πειραματικές διαδικασίες (mean±SEM).

Γράφημα Ghrelin (γκρελίνης): * $P < .001$ (διαφορά από χρόνο 0 min όλων των πειραματικών διαδικασιών και από 30 min και 120 min των Exp 1B και 15B)

Γράφημα PRL (προλακτίνης): “a” δείχνει διαφορά από “c” σε όλες τις χρονικές στιγμές ($P < .001$) και από “b” από 30 min μέχρι 180 min ($P < .001$); “b” δείχνει διαφορά από “d” σε όλες τις χρονικές στιγμές ($P < .001$); “c” δείχνει διαφορά από “d” σε χρόνους 120 min και 150 min ($P < .05$).

Γράφημα GH (αυξητικής ορμόνης): * $P < .001$, ** $P < .05$ (διαφορά ανάμεσα στις τιμές σε Exp 1A και Exp 15A και εκείνων σε Exp 1B και Exp 15B)

11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A) Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας.

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι η εξωγενής χορήγηση μίας δόσης γκρελίνης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης αυξάνοντας σημαντικά τα επίπεδα της στο αίμα (Takaya et al., 2000, Messini et al., 2009a). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες, αλλά φαρμακολογικές δόσεις γκρελίνης και διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της αυξητικής ορμόνης ήταν δοσοεξαρτώμενη.

Προηγούμενες μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκαν εξωγενώς οιστρογόνα προκαλώντας έτσι ένα «τεχνητό μοντέλο ωοθυλακικής φάσης – εξομοίωση ωοθυλακικής φάσης», έχουν δείξει ότι η επίδραση μίας ή πολλαπλών μικρότερων δόσεων γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης προκάλεσε σημαντική αύξηση, η οποία γινόταν μεγαλύτερη όσο αυξανόταν η συγκέντρωση στο αίμα των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων (Veldhuis et al., 2006, Kok et al., 2008). Αυτό, ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, σύμφωνα με την οποία η διεγερτική επίδραση μίας δόσης γκρελίνης (1 μg/kg) στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης δεν επηρεάστηκε από αλλαγές του ορμονικού προφίλ των γυναικών, όπως η σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Messini et al., 2009a). Από τα δεδομένα αυτά, πιθανολογήθηκε ότι η χορήγηση μικρότερων πολλαπλών δόσεων γκρελίνης είναι πιο κοντά στο «φυσιολογικό» σε σχέση με τη χορήγηση μίας μόνο μεγαλύτερης δόσης. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη, στην οποία χορηγήθηκαν 2 μικρότερες δόσεις γκρελίνης στις γυναίκες, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης ανάμεσα στις δύο φάσεις του κύκλου. Παράλληλα, σε μία προηγούμενη μελέτη, στην οποία σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, χορηγήθηκε για 60 ημέρες συνδυασμός 2mg οιστραδιόλης και 10mg διδρογεστερόνης, βρέθηκε ότι η έκκριση της αυξητικής ορμόνης ως απάντηση στη χορήγηση εφάπαξ 1 μg/kg γκρελίνης ενισχύθηκε από τα παραπάνω στεροειδή (Villa et al., 2008). Συνεπώς, προκύπτει ότι ο παράγοντας, που διαφοροποιεί

τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης από τα αποτελέσματα άλλων μελετών, δεν είναι η ποσότητα της χορηγούμενης γκρελίνης.

Είναι ενδιαφέρον να τονισθεί ότι στις προηγούμενες μελέτες η θετική επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης μετά τη χορήγηση γκρελίνης παρατηρήθηκε μετά την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων, ενώ στην παρούσα μελέτη υπήρξαν μόνο ενδογενή οιστρογόνα. Επιπλέον, στις προηγούμενες μελέτες ο ρόλος των ενδογενών οιστρογόνων δεν διερευνήθηκε, ενώ οι γυναίκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μετεμμηνοπαυσιακές. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι το μοντέλο των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών μπορεί να μην είναι το πλέον κατάλληλο, επειδή, λόγω της μακροχρόνιας έλλειψης οιστρογόνων, η λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης μπορεί να επηρεασθεί. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μία μείωση της κυκλοφορούσας αυξητικής ορμόνης με την ηλικία (Chahal and Drake, 2007), ενώ η απάντηση της αυξητικής ορμόνης στη γκρελίνη αμβλύθηκε στα ηλικιωμένα σε σύγκριση με νεώτερα άτομα (Broglia et al., 2003). Κατά συνέπεια, είναι πιθανόν η θετική επίδραση της υψηλής στάθμης οιστρογόνων στο αίμα στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης μετά τη χορήγηση γκρελίνης, που παρατηρήθηκε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, να εξηγείται με βάση την αποκατάσταση της μειωμένη λειτουργίας της υπόφυσης στο φυσιολογικό από τα χορηγούμενα στεροειδή, τα οποία κατέστησαν τα υποφυσιακά κύτταρα περισσότερο ευαίσθητα στα διάφορα εκκριτογόνα ερεθίσματα. Επιπλέον, προηγούμενη έρευνα έχει δείξει ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εμφανίζουν μία μειωμένη απάντηση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης στα διάφορα εκκριτογόνα ερεθίσματα σε σύγκριση με γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας (Veldhuis et al., 2007). Επίσης, σύμφωνα με μία μελέτη, στην οποία χορηγήθηκαν εξωγενώς οιστρογόνα και γκρελίνη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αυξήθηκε η νυχτερινή παραγωγή ακετυλιωμένης γκρελίνης, πιθανόν στο πλαίσιο της αυξημένης σύνθεσης της και/ή της ακετυλίωσης του πεπτιδίου της γκρελίνης από την οιστραδιόλη (Paulo et al., 2008). Το εάν τα ενδογενή οιστρογόνα θα μπορούσαν να έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα στη σύνθεση της γκρελίνης είναι κάτι που μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί.

Σχετικά με τη χρήση άλλων εκκριτογόνων ουσιών της αυξητικής ορμόνης εκτός από τη γκρελίνη, τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα. Η πλειοψηφία αυτών συμφωνεί στο ότι η διέγερση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης από αυτούς τους

παράγοντες ενισχύθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης, ακόμα και όταν η χρησιμοποιούμενη δόση των εκκριτογόνων ουσιών ήταν αρκετά μεγάλη. Για παράδειγμα, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η διεγερτική επίδραση της εφάπαξ χορήγησης 3 μg/kg GHRP-2 στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης ενισχύθηκε από τη χορήγηση οιστραδιόλης (Anderson et al., 2001). Σε αντίθεση με αυτό, δεν παρατηρήθηκε παρόμοια ενισχυτική δράση των διαδερμικά χορηγούμενων οιστρογόνων στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης μετά τη χορήγηση hexarelin σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Arvat et al., 1997). Σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν εξετάσθηκε η επίδραση των ενδογενών οιστρογόνων.

Πιθανότατα η παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε με την παρουσία φυσιολογικά αυξανόμενων επιπέδων οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας, να υποδεικνύει έναν πιο φυσιολογικό τρόπο διερεύνησης των ενδοκρινικών επιδράσεων της γκρελίνης, παρά κατά την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων. Είναι φανερό ότι η παρούσα είναι μία «φαρμακολογική» μελέτη και τα αποτελέσματα της δεν μπορούν υποχρεωτικά να εξηγήσουν τα φυσιολογικά φαινόμενα. Η διερεύνηση της παλμικής έκκρισης της ακετυλιωμένης γκρελίνης σε συνδυασμό με την έκκριση της αυξητικής ορμόνης θα μπορούσε να είναι αντικείμενο επόμενης μελέτης, με διαφορετικό σχεδιασμό. Αν και θα μπορούσε ακόμη να ειπωθεί ότι η από την γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης επηρεάζεται διαφορετικά από τα ενδογενή και τα εξωγενή οιστρογόνα, η κατανόηση του ρόλου της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου απαιτεί μία πιο σύνθετη προσέγγιση παρά μία απλουστευμένη διαδικασία, όπως είναι η χρήση διαφόρων φαρμακολογικών δόσεων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας η έκκριση της αυξητικής ορμόνης μετά τη χορήγηση δύο διαδοχικών «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης είναι παρόμοια τόσο στην αρχόμενη όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου. Καθώς οι ορμονικές διαφορές μεταξύ των δύο φάσεων του κύκλου είναι μεγάλες, είναι πιθανόν ότι η οιστραδιόλη δεν εμπλέκεται στη φυσιολογική διαδικασία, που ρυθμίζει την από τη γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης στις γυναίκες αυτές.

B) Η επίδραση «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν μια ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των FSH και LH στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας, κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η επίδραση αυτή ήταν ιδιαίτερα εμφανής στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση, παρόλο που μία στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της FSH κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παρατηρήθηκε και στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που διερεύνησε την επίδραση της εξωγενούς χορήγησης γκρελίνης στην ημερήσια διακύμανση των επιπέδων των FSH και LH σε διαφορετικές φάσεις του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου και τα αποτελέσματα της παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες εκείνων μιας πρόσφατης εργασίας, στην οποία εξετάστηκε η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών κατά τη διάρκεια της νύχτας (Kluge et al., 2012). Μεταξύ των δύο αυτών μελετών υπάρχουν διαφορές που αφορούν στο σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως το πρωί δύο υπομέγιστες δόσεις γκρελίνης με μεσοδιάστημα 90 min η μία από την άλλη, ενώ στην προαναφερθείσα μελέτη χορηγήθηκαν το βράδυ ενδοφλεβίως τέσσερις δόσεις γκρελίνης με μεσοδιάστημα μίας ώρας ανάμεσα σε κάθε χορήγηση. Στην μελέτη των Kluge και συν (2012), η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα κατά την αρχόμενη προς μέση ωοθυλακική φάση και κάθε φορά ολοκληρωνόταν μέσα σε δύο διαδοχικές νύκτες, οπότε δεν αναμενόταν σημαντικές μεταβολές στο ορμονικό προφίλ των γυναικών. Αντίθετα, στην δική μας μελέτη ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία σε δύο διαφορετικά στάδια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, δηλαδή στην αρχόμενη και την προχωρημένη ωοθυλακική φάση, οι οποίες χαρακτηρίζονται από σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση της οιστραδιόλης στον ορό. Το γεγονός πως η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης ήταν πιο έντονη κατά την προχωρημένη ωοθυλακική φάση δείχνει πως το ενδοκρινικό περιβάλλον παίζει κάποιο ρόλο σε αυτό, με τα οιστρογόνα πιθανώς να διευκολύνουν την επίδραση αυτή της γκρελίνης. Από τα παραπάνω αποτελέσματα

προκύπτει πως η γκρελίνη έχει πιθανώς ενεργό ρόλο στην έκκριση των γοναδοτροπινών κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου γυναικών.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Messini et al., 2009b), της οποίας όμως ο σχεδιασμός ήταν διαφορετικός. Στη μελέτη αυτή, χορηγήθηκε οξέως μία εφάπαξ δόση γκρελίνης 1 μg/kg ενδοφλεβίως σε τρία διαφορετικά στάδια του κύκλου, δηλαδή στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση και στη μέση ωχρινική φάση και δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στις τιμές των FSH και LH σε καμία από αυτές, παρόλες τις σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των ωοθηκικών στεροειδών στις τρεις αυτές φάσεις του κύκλου. Το γεγονός ότι προηγούμενες μελέτες σε ζώα και σε άνδρες έδειξαν μία ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών (Futura et al., 2001, Vulliémoz et al., 2004, Iqbal et al., 2006, Kluge et al., 2007, Kluge et al., 2009, Lafranco et al., 2008, Martini et al., 2006) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι στην παρούσα μελέτη πιθανόν η δόση της γκρελίνης να ήταν αρκετά υψηλή, το δε χρονικό διάστημα της πειραματικής διαδικασίας πολύ σύντομο (2 ώρες). Επειδή η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στη μελέτη σε άνδρες παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση πολλαπλών δόσεων της ουσίας αυτής (Kluge et al., 2009) αναπτύχθηκε τότε η υπόθεση ότι η χορήγηση μικρότερων δόσεων γκρελίνης σε περισσότερες από μία ενέσεις, όπως στην παρούσα εργασία, θα ήταν πλησιέστερα στο φυσιολογικό τρόπο έκκρισης και δράσης της ορμόνης αυτής. Έτσι, θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί περισσότερο ο φυσιολογικός ρόλος της γκρελίνης στη λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού άξονα.

Λόγω της έλλειψης δεδομένων στη βιβλιογραφία ως προς τον ορισμό «χαμηλών δόσεων» γκρελίνης, στην παρούσα εργασία επιλέξαμε τυχαία δύο «υπομέγιστες» δόσεις της ουσίας αυτής, ώστε να μελετηθεί το αν θα παρατηρηθούν δόσοεξαρτώμενα αποτελέσματα. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν πως παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα αυξήθηκαν ανάλογα με τη χορηγηθείσα δόση, η ελάττωση των επιπέδων των LH και FSH παρατηρήθηκε με τη κατ' αρχήν χορηγηθείσα μικρότερη δόση της γκρελίνης (0.15 μg/kg), ενώ μετά τη δεύτερη δόση (0.30 μg/kg) παρατηρήθηκε μία μικρή περαιτέρω πτώση των επιπέδων των γοναδοτροπινών και περισσότερο της LH. Εάν αυτό σχετίζεται με πιθανή «προς τα κάτω ρύθμιση» των υποδοχέων δεν είναι γνωστό.

Επίσης, δεν είναι γνωστό ποιά θα ήταν η απάντηση των γοναδοτροπινών στη γκρελίνη εάν η μεγαλύτερη δόση της γκρελίνης χορηγούνταν πρώτη. Αν και κάτι τέτοιο θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί, αυτό απαιτεί περαιτέρω έρευνα στο πλαίσιο δοσοεξάρτησης.

Ο μηχανισμός της καταστολής της έκκρισης των γοναδοτροπινών από τη γκρελίνη δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η γκρελίνη μειώνει την συχνότητα των ώσεων της LH σε ζώα και ανθρώπους (Vulliamoz et al., 2004, Kluge et al., 2007, Lafranco et al., 2008, Kluge et al., 2012), γεγονός που σημαίνει ότι η γκρελίνη ασκεί τη δράση της στην έκκριση της GnRH στον υποθάλαμο. Επίσης, πρόσφατη έρευνα έχει δείξει πως τα αυξημένα επίπεδα γκρελίνης που προκλήθηκαν σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μετά από ένταξη των γυναικών σε τρίμηνο πρόγραμμα άσκησης και διατροφής σχετίζονταν με καταστολή της κατά ώσεις έκκρισης της LH (Scheid et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, η διαφορετική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των LH και FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα σε γυναίκες έχουν δείξει μία ασθενέστερη επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της FSH παρά της LH (Kluge et al., 2012). Η διαφορά με τα παρόντα ευρήματα ίσως να οφείλεται στον διαφορετικό πειραματικό σχεδιασμό, αφού στην προηγούμενη μελέτη εξετάσθηκε η επίδραση της γκρελίνης στη νυκτερινή διακύμανση των δυο γοναδοτροπινών, χρονική περίοδος κατά την οποία οι ώσεις της LH είναι περισσότερο διακριτές από τις ώσεις της FSH.

Η εκδήλωση της ανασταλτικής επίδρασης της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ενδογενών οιστρογόνων αποτελεί μία ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση. Βέβαια, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης επιτεύχθηκαν κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες και ίσως να μην αντανακλούν τις φυσιολογικές συνθήκες. Εντούτοις, η συνέπεια των παρόντων αποτελεσμάτων με εκείνα προηγούμενων μελετών σε ζώα και ανθρώπους ενισχύουν την άποψη ότι η σχέση της γκρελίνης με τα οιστρογόνα αποτελούν μέρος μιας φυσιολογικής διαδικασίας. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει την ικανότητα των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων να ενισχύουν τη διεγερτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Veldhuis et al., 2006, Kok et al., 2008). Ωστόσο, ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης των ενδογενών οιστρογόνων

με την επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τέλος, το ενδεχόμενο η καταστολή των επιπέδων των γοναδοτροπινών να οφείλεται σε επίδραση των ωοθηκών μέσω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης πρέπει να θεωρηθεί ελάχιστα πιθανό, αφού σε μία προηγούμενη μελέτη δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο αίμα μέχρι 2 ώρες παρατήρησης από τη χορήγηση μίας μεγάλης δόσης γκρελίνης (Messini et al., 2009b).

Ως ένας περιορισμός της παρούσης μελέτης θα μπορούσε να θεωρηθεί η σχετικά μικρή χρονική διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών, αφού η καταστολή των FSH και LH δεν άρχισε νωρίτερα από τις 2 ώρες μετά την ένεση της γκρελίνης. Στην μελέτη των Kluge και συν. (2012), οι χαμηλότερες τιμές των γοναδοτροπινών παρατηρήθηκαν μετά τις πρώτες 4 ώρες από τη χορήγηση της γκρελίνης. Επίσης, στην παρούσα μελέτη η κατά ώσεις έκκριση της LH δεν εξετάστηκε.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά την επίδραση μικρών δόσεων γκρελίνης στην ημερήσια έκκριση των γοναδοτροπινών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η μελέτη δείχνει ότι στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου η γκρελίνη ασκεί μία ανασταλτική δράση στην έκκριση τόσο της FSH όσο και της LH. Από αυτά προκύπτει πως η γκρελίνη μπορεί να συμμετέχει στη φυσιολογική διαδικασία, που ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και πως η οιστραδιόλη διευκολύνει τη δράση αυτή.

Γ) Η επίδραση «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης στα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης, των γοναδοτροπινών και της προλακτίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δείχνουν ότι η εξωγενής χορήγηση δύο μικρών δόσεων γκρελίνης δεν επηρεάζει την έκκριση των γοναδοτροπινών, τουλάχιστον στο πλαίσιο της τριώρης διάρκειας των πειραματικών διαδικασιών. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα επίσης της παρούσης μελέτης, τα οποία όμως προέκυψαν από πειραματικές διαδικασίες κατά την ωοθυλακική φάση

του κύκλου καθώς και με τα δεδομένα μίας προγενέστερης μελέτης, τα οποία δείχνουν μία ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των FSH και LH (Kluge et al., 2012). Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσης εργασίας, η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης ήταν ισχυρότερη στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με την αρχόμενη ωοθυλακική φάση, κάτι που υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα μπορεί να ενισχύουν τη δράση αυτή της γκρελίνης, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Τα παρόντα αποτελέσματα της μη καταστολής των επιπέδων των γοναδοτροπινών από τη γκρελίνη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που έχουν στερηθεί οιστρογόνων για μεγάλο χρονικό διάστημα, υποστηρίζουν την άποψη ότι τα οιστρογόνα παίζουν κάποιο ρόλο. Το γεγονός όμως ότι η εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης σε αυτές τις γυναίκες δεν «ανέστρεψε» την κατάσταση της «μη-ανασταλτικής» επίδρασης της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Υπάρχουν, ωστόσο, διάφορες πιθανές εξηγήσεις.

Αν και το πρότυπο της αύξησης των επιπέδων της οιστραδιόλης δεν παρουσιάσθηκε στην παρούσα μελέτη, το πρωτόκολλο χορήγησης της ορμόνης αυτής, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν παρόμοιο με το πρωτόκολλο μίας προηγούμενης μελέτης από ορισμένους ερευνητές της ίδιας ομάδας και της Κλινικής (Dafopoulos et al., 2004). Σύμφωνα με αυτό, η χορήγηση της οιστραδιόλης διήρκεσε 14 ημέρες, δηλ. κατ' αντιστοιχία με τη μέση διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου, ενώ τα επίπεδα της οιστραδιόλης, τα οποία επιτεύχθηκαν ήταν παρόμοια με εκείνα στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση. Θα μπορούσε όμως να ειπωθεί ότι η χορηγηθείσα ποσότητα οιστρογόνων ήταν ανεπαρκής, ώστε να αντισταθμίσει τη μακροχρόνια έλλειψη οιστρογονικής επίδρασης στην υπόφυση. Από την άλλη μεριά, είναι αρκετά δύσκολο να αναπαράγει κανείς με ακρίβεια το πρότυπο έκκρισης των οιστρογόνων κατά τη φυσιολογική ωοθυλακική φάση με την εξωγενή τους χορήγηση σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ οι λειτουργούσες ωοθήκες στο φυσιολογικό κύκλο παράγουν εκτός από τα οιστρογόνα και μία σειρά άλλων ουσιών, οι οποίες επίσης παίζουν κάποιο ρόλο.

Επιπλέον, το ενδοκρινικό περιβάλλον των υψηλών βασικών επιπέδων των γοναδοτροπινών στις γυναίκες της παρούσης μελέτης πιθανόν να αποτέλεσε εμπόδιο στην ανάδειξη τυχόν αλλαγών στα επίπεδα της FSH και της LH, σε αντίθεση με τη φυσιολογική ωοθυλακική φάση, στην οποία ακόμη και μικρές, αλλά σημαντικές

μεταβολές των τιμών, μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν με στατιστικές μεθόδους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι γυναίκες της παρούσης μελέτης βρίσκονταν σε προχωρημένη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο, οπότε λόγω της γήρανσης η υπόφυση τους μπορεί να ήταν λιγότερο ευαίσθητη σε κατασταλτικούς παράγοντες των γοναδοτροπινών, όπως συμβαίνει φυσιολογικά στο μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορύθμισης (Dimitraki et al., 2015). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει και το ότι δεν ελαττώθηκαν οι τιμές της LH κατά τη θεραπεία με οιστρογόνα. Μειωμένη ευαισθησία της έκκρισης της LH στα εξωγενή οιστρογόνα έχει δείχθει σε μία προηγούμενη μελέτη σε ακόμη νεότερες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Daforoulios et al., 2004). Στη μελέτη αυτή, η μείωση των τιμών της FSH ήταν μεγαλύτερη εκείνων της LH, οι οποίες όμως ελαττώθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό εκείνων της FSH όταν στο οιστρογόνο προστέθηκε και προγεστερόνη (Daforoulios et al., 2004). Η παρατήρηση αυτή χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Τέλος, δεν αποκλείεται το χρονικό διάστημα των τριών ωρών των πειραματικών διαδικασιών να μην ήταν επαρκές για να ανιχνευτούν μεταβολές στα επίπεδα της LH ως απάντηση στη χορήγηση της γκρελίνης, λαμβάνοντας επίσης υπόψη ότι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι ώσεις της LH διαφοροποιούνται. Μία προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η καταστολή της LH παρατηρήθηκε όχι νωρίτερα από 3 ώρες μετά τη δεύτερη δόση της γκρελίνης, αν και στη μελέτη αυτή χορηγήθηκαν συνολικά τέσσερις δόσεις γκρελίνης (Kluge et al., 2012). Κατά συνέπεια, είναι πιθανό να υπάρχει διαφορά στην επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών σε γυναίκες προ- και μετεμμηνοπαυσιακής ηλικίας.

Στην παρούσα μελέτη, η κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροπινών δεν διερευνήθηκε, κάτι που ενδεχομένως θα μπορούσε να δείξει πολύ μικρές μεταβολές στην έκκριση τους, οι οποίες με ημερήσιες αιμοληψίες δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευτούν. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη στην ωοθυλακική φάση του κύκλου, η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ανιχνεύτηκε με ημερήσιες αιμοληψίες, ενώ στη μελέτη των Kluge και συν. (2012), στην οποία δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε 20 min επί 9 ώρες, η FSH μειώθηκε από την γκρελίνη μόνο σε μία χρονική στιγμή. Κατά συνέπεια, η διερεύνηση του ρόλου της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών καθώς και του ρόλου των οιστρογόνων στη διαδικασία αυτή πιθανόν να απαιτεί ένα περισσότερο σύνθετο πρωτόκολλο.

Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση της γκρελίνης αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό των γυναικών, κάτι που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Takaya et al., 2000, Messini et al., 2009a, Messini et al., 2010). Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που διερεύνησε την επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της προλακτίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η μελέτη δείχνει όχι μόνο τη διεγερτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της προλακτίνης μετά την εμμηνόπαυση αλλά και ότι αυτή η δράση ενισχύθηκε από την εξωγενή χορήγηση της οιστραδιόλης. Το αν αυτό σημαίνει ότι η οιστραδιόλη ευαισθητοποιεί τα γαλακτοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης στη γκρελίνη δεν είναι γνωστό. Η άποψη αυτή δεν φαίνεται να υποστηρίζεται από τα ευρήματα μίας προηγούμενης μελέτης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, στις οποίες η απάντηση της προλακτίνης σε μία μεγάλη δόση γκρελίνης δεν διέφερε μεταξύ αρχόμενης και προχωρημένης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Messini et al., 2009b). Είναι, ωστόσο, γνωστό ότι τα οιστρογόνα αποτελούν έναν ανεξάρτητο διεγερτικό παράγοντα της έκκρισης της προλακτίνης τόσο *in vivo* (Joseph et al., 1986, Messinis and Templeton, 1988) όσο και *in vitro*, δρώντας στα γαλακτοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Ellerkmann et al., 1991). Η διεγερτική επίδραση της οιστραδιόλης στην έκκριση της προλακτίνης επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη, στην οποία τα σχετικά χαμηλά επίπεδα της προλακτίνης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση του ωοθηκικού αυτού στεροειδούς. Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση οιστρογόνων και γκρελίνης και διαπιστώθηκε η ενισχυτική επίδραση των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της προλακτίνης (AUC, μέγιστες τιμές, καθαρή αύξηση). Ο ακριβής μηχανισμός όμως χρήζει περαιτέρω έρευνας. Το αν αυτό αποτελεί ίδιον της γκρελίνης δεν είναι ακόμη γνωστό, αν και μία προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης αύξησε την απάντηση της προλακτίνης στην TRH, ενός άλλου διεγέρτη της έκκρισης της προλακτίνης (Joseph et al., 1986). Η φυσιολογική σημασία της διεγερτικής επίδρασης της γκρελίνης στην έκκριση της προλακτίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μακρόχρονη στέρηση οιστρογονικής δράσης δεν είναι γνωστή και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη διερεύνηση της.

Όπως αναμενόταν, η χορήγηση της γκρελίνης στις γυναίκες της παρούσης μελέτης διέγειρε την έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Η επίδραση αυτή της γκρελίνης δεν φάνηκε

να επηρεάζεται από τα οιστρογόνα, καθώς η έκκριση της αυξητικής ορμόνης ήταν παρόμοια πριν και μετά τη χορήγηση του στεροειδούς αυτού. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσης μελέτης στην ωοθυλακική φάση του κύκλου, με τη χρησιμοποίηση του ίδιου πρωτόκολλου χορήγησης γκρελίνης καθώς και με τα ευρήματα μίας προηγούμενης μελέτης, στην οποία χορηγήθηκε μία εφάπαξ μεγάλη δόση γκρελίνης, όπου η αύξηση της αυξητικής ορμόνης ήταν παρόμοια στην αρχόμενη και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Messini et al., 2009b). Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με οιστρογόνα, έχουν δείξει μία ενισχυτική δράση της οιστραδιόλης στη διεγερτική επίδραση πέντε κλιμακωτά αυξανόμενων «φυσιολογικών» αλλά όχι φαρμακολογικών δόσεων γκρελίνης στην κατά ώσεις έκκριση της αυξητικής ορμόνης (Kok et al., 2008, Veldhuis et al., 2006). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε μόνο η βασική έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Δεν αποκλείεται ο διαφορετικός σχεδιασμός της παρούσης μελέτης από τις προηγούμενες να ευθύνεται για τα διαφορετικά αποτελέσματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μία πρόσφατη μελέτη, στην οποία χορηγήθηκε φουλβεστράντη, ένας ισχυρός ανταγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες όμως δεν χορηγήθηκαν οιστρογόνα, αυξήθηκε σημαντικά η προκαλούμενη από τη νηστεία και η προκαλούμενη από τη γκρελίνη έκκριση της αυξητικής ορμόνης (Veldhuis et al., 2014). Είναι φανερό από τα παραπάνω ότι ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη διεγερόμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσης μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι η εξωγενής ενδοφλεβια χορήγηση δύο μικρών διαδοχικών δόσεων γκρελίνης δεν επηρεάζει τα επίπεδα των FSH και LH σε υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, στις οποίες προηγουμένως χορηγήθηκε θεραπεία με οιστρογόνα, αλλά διεγείρει την έκκριση της προλακτίνης, δράση η οποία ενισχύεται από τα οιστρογόνα. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η οιστραδιόλη πιθανόν να αλληλεπιδρά με τη γκρελίνη, επηρεάζοντας τη δράση της στην υπόφυση, αν και ο ακριβής μηχανισμός χρήζει περαιτέρω έρευνας.

12. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η οξεία ενδοφλέβια χορήγηση γκρελίνης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας προκάλεσε παρόμοια σημαντική αύξηση των επιπέδων της γκρελίνης στο πλάσμα των γυναικών στην αρχόμενη και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου.
2. Η οξεία ενδοφλέβια χορήγηση δύο «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης με μεσοδιάστημα 90 min σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας κατά τη διάρκεια της αρχόμενης και της προχωρημένης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου διέγειρε την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, αυξάνοντας σημαντικά τα επίπεδα της ορμόνης αυτής στον ορό των γυναικών.
3. Η αύξηση της αυξητικής ορμόνης, ως αποτέλεσμα χορήγησης της γκρελίνης, ήταν δοσοεξαρτώμενη και παρόμοια τόσο στην αρχόμενη όσο και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου.
4. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι η οιστραδιόλη δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη φυσιολογική διαδικασία, που ρυθμίζει την από τη γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας.
5. Η γκρελίνη χορηγούμενη ενδοφλεβίως με τη μορφή δύο μικρών («υπομέγιστων») δόσεων σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της ημερήσιας έκκρισης των FSH και LH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του γεννητικού κύκλου.
6. Η επίδραση αυτή της γκρελίνης ήταν πιο έντονη στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση, υποδηλώνοντας ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των οιστρογόνων, που παρατηρούνται στη φάση αυτή του κύκλου, ενδεχομένως ενισχύουν την κατασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών από την υπόφυση.
7. Η οξεία ενδοφλέβια χορήγηση δύο μικρών («υπομέγιστων») δόσεων γκρελίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες έλαβαν από το στόμα βαλεριανή οιστραδιόλη για 14 ημέρες, με σκοπό τη μίμηση της ωοθυλακικής φάσης του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου από πλευράς στάθμης οιστραδιόλης, αύξησε τα επίπεδα της γκρελίνης στο

πλάσμα σε παρόμοιο βαθμό πριν την έναρξη και μετά το τέλος της χορήγησης της οιστραδιόλης.

8. Η με τον παραπάνω τρόπο χορηγούμενη γκρελίνη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διέγειρε την έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Η επίδραση αυτή της γκρελίνης δεν επηρεάστηκε από τα οιστρογόνα, καθώς η έκκριση της αυξητικής ορμόνης ήταν παρόμοια πριν και μετά τη χορήγηση του στεροειδούς αυτού.

9. Η εξωγενής χορήγηση δύο μικρών («υπομέγιστων») δόσεων γκρελίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μακρόχρονη στέρωση οιστρογόνων δεν επηρέασε την έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών τουλάχιστον στο πλαίσιο της τριώρης διάρκειας των πειραματικών διαδικασιών.

10. Η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων στις γυναίκες αυτές δεν μετέβαλε την έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών ως απάντηση στην εξωγενώς χορηγούμενη γκρελίνη.

10. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των πειραματικών διαδικασιών κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου στην παρούσα μελέτη, τα οποία έδειξαν κατασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των FSH και LH.

11. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν τον πιθανό ρόλο των οιστρογόνων στην επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της FSH και της LH στις γυναίκες.

12. Η εξωγενής χορήγηση γκρελίνης αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Η δράση αυτή της γκρελίνης ενισχύθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης στις γυναίκες αυτές.

13. Είναι πιθανόν η οιστραδιόλη να ευαισθητοποιεί τα γαλακτοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης στη γκρελίνη.

14. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης παρέχουν σημαντικές νέες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της γκρελίνης στη γυναικεία αναπαραγωγική λειτουργία, μέσω της επίδρασης της τελευταίας στην έκκριση των ορμονών του πρόσθιου λοβού της υποφύσεως.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος χαμηλών δόσεων γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης σε γυναίκες υπό διάφορες συνθήκες οιστρογονικής επίδρασης.

Μαρία Χ. Μαλανδρή

Η γκρελίνη αποτελεί ένα ορμονικό πεπτίδιο που αποτελείται από 28 αμινοξέα και παράγεται κατά κύριο λόγο από το στομάχο, αλλά έχει διαπιστωθεί ότι εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, όπως είναι το πάγκρεας, οι νεφροί, οι πνεύμονες, ο υποθάλαμος, η υπόφυση και οι γονάδες. Η γκρελίνη αποτελεί τον ενδογενή παράγοντα (ligand) για τον υποδοχέα των εκκριτογόνων αναλόγων της αυξητικής ορμόνης και κατά συνέπεια αποτελεί ισχυρό διεγέρτη έκκρισης της τελευταίας. Το γεγονός ότι η γκρελίνη εκκρίνεται όχι μόνο από το στομάχο, αλλά εκφράζεται και σε άλλους ιστούς σημαίνει ότι ασκεί διάφορες ενδοκρινείς, εξωκρινείς και παρακρινείς επιδράσεις στους ιστούς αυτούς. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η γκρελίνη επηρεάζει και την αναπαραγωγική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού κυρίως μέσα από τις δράσεις της στην υπόφυση και στις ωθήκες. Η παρούσα μελέτη έγινε προκειμένου να διερευνηθεί **1)** Ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη προκαλούμενη έκκριση της αυξητικής ορμόνης, **2)** Η επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών και ποιος είναι ο ρόλος των οιστρογόνων σε αυτή τη λειτουργία της και **3)** Ο ρόλος των οιστρογόνων στην από τη γκρελίνη διεγερόμενη έκκριση της προλακτίνης.

Υλικό και μέθοδος: Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες γυναικών. Η πρώτη περιέλαβε 10 υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (ομάδα 1) και η δεύτερη 10 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ομάδα 2). Χρησιμοποιήθηκαν δύο «υπομέγιστες» (submaximal) δόσεις γκρελίνης.

Ομάδα 1. Η κάθε γυναίκα μελετήθηκε σε δύο κύκλους και πραγματοποιήθηκαν 4 πειραματικές διαδικασίες. Στον πρώτο κύκλο (μαρτύρων), πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία σε δύο φάσεις του κύκλου, δηλαδή στην αρχόμενη ωοθυλακική και συγκεκριμένα τη 2η ημέρα του κύκλου και στην προχωρημένη ωοθυλακική φάση (μέγεθος ωοθυλακίου 16 mm). Στον κύκλο αυτό, σε κάθε πειραματική διαδικασία, μετά ολονύκτια νηστεία, χορηγήθηκε στις γυναίκες το πρωί εφάπαξ ενδοφλεβίως

φυσιολογικός ορός 2 ml δύο φορές, δηλ. σε χρόνους 0 min και 90 min. Στο δεύτερο κύκλο (μελέτης) πραγματοποιήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία, που περιγράφηκε παραπάνω, στις ίδιες φάσεις του κύκλου, αντί όμως του φυσιολογικού ορού, στις γυναίκες χορηγήθηκε γκρελίνη στις αντίστοιχες ώρες στη δόση των 0.15 μg/kg (χρόνος 0 min) και 0.30 μg/kg (χρόνος 90 min). Σε κάθε πειραματική διαδικασία, δείγματα αίματος λήφθηκαν από όλες τις γυναίκες σε χρόνους, ως προς την ένεση του φυσιολογικού ορού ή της γκρελίνης (χρόνος 0min), -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 και 180 min.

Ομάδα 2. Στις γυναίκες της ομάδας αυτής χορηγήθηκε βαλεριανική οιστραδιόλη από το στόμα σε δύο χρονικές περιόδους, Α και Β, διάρκειας 14 ημερών η κάθε μία με μεσοδιάστημα 1 μήνα. Στις δύο αυτές χρονικές περιόδους χορήγησης της οιστραδιόλης, σε όλες τις γυναίκες πραγματοποιήθηκαν οι 4 πειραματικές διαδικασίες, που περιγράφηκαν παραπάνω, οι δύο με χορήγηση γκρελίνης (Exp 1A και Exp 15A) και οι δύο με χορήγηση φυσιολογικού ορού (Exp 1B και Exp 15B). Συγκεκριμένα, η Exp 1A και η Exp 1B πραγματοποιήθηκαν την 1η ημέρα των χρονικών περιόδων Α και Β αντίστοιχα, ενώ η Exp 15A και Exp 15B πραγματοποιήθηκαν την 15η ημέρα των χρονικών περιόδων χορήγησης οιστραδιόλης Α και Β αντίστοιχα. Στις Exp 1A και Exp 15A, μετά από ολονύκτια νηστεία, χορηγήθηκε στις γυναίκες το πρωί των ημερών 1 και 15 γκρελίνη σε εφάπαξ ενδοφλέβια δόση των 0.15 μg/kg (χρόνος 0 min) και μία δεύτερη δόση γκρελίνης των 0.30 μg/kg 90 min αργότερα. Μετά την παρέλευση ενός μηνός, πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες Exp 1B και Exp 15B, οι οποίες ήταν ίδιες με τις Exp 1A και Exp 15A, με τη διαφορά ότι αντί γκρελίνης χορηγήθηκε ενδοφλεβίως εφάπαξ φυσιολογικός ορός 2 ml στις ίδιες χρονικές στιγμές (0 και 90 min). Δείγματα αίματος λήφθηκαν, σε σχέση με τη χορήγηση γκρελίνης ή φυσιολογικού ορού (χρόνος 0), σε χρόνους -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 και 180 min και στις τέσσερις πειραματικές διαδικασίες. Και στις δύο ομάδες, στο πλάσμα, μετρήθηκε η ολική γκρελίνη και στον ορό η αυξητική ορμόνη, η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη, οι γοναδοτροπίνες (FSH και LH) και η προλακτίνη. Οι μετρήσεις έγιναν αναλόγως της ουσίας με ραδιοανοσοβιολογικές ή ανοσοραδιομετρικές μεθόδους και το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NCSS 2001.

Αποτελέσματα: Η ολική γκρελίνη του πλάσματος αυξήθηκε σημαντικά μετά την ενδοφλέβια χορήγηση της ουσίας αυτής παρόμοια τόσο στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας όσο και στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, χωρίς η αύξηση να επηρεάζεται από τα οιστρογόνα. Επίσης, η προκαλούμενη από τη γκρελίνη αύξηση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης δεν επηρεάστηκε από το διαφορετικό οιστρογονικό περιβάλλον των πειραματικών διαδικασιών και στις δύο ομάδες των γυναικών. Στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας (ομάδα 1), η χορήγηση της γκρελίνης άσκησε κατασταλτική επίδραση στην έκκριση των γοναδοτροπινών, δράση που ενισχύθηκε από τα οιστρογόνα. Αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ομάδα 2), στις οποίες η χορήγηση γκρελίνης δεν επηρέασε την έκκριση των γοναδοτροπινών. Τέλος, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η εξωγενώς χορηγούμενη γκρελίνη αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της προλακτίνης, δράση που ενισχύθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων στις γυναίκες της ομάδας αυτής.

Συμπεράσματα: Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι η διεγερτική επίδραση δύο διαδοχικών «υπομέγιστων» δόσεων γκρελίνης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης: 1) δεν επηρεάζεται από το οιστρογονικό περιβάλλον, 2) σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, αλλά όχι σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καταστέλλει την ημερήσια έκκριση των γοναδοτροπινών, η δράση δε αυτή ενισχύεται από την οιστραδιόλη και 3) σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αυξάνει την έκκριση της προλακτίνης από την υπόφυση, η επίδραση δε αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής παρουσία υψηλών επιπέδων οιστρογόνων στην κυκλοφορία. Πιθανολογείται ότι η οιστραδιόλη αλληλεπιδρά με τη γκρελίνη στην έκκριση υποφυσιακών ορμονών. Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας παρέχουν νέες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της γκρελίνης στην έκκριση των ορμονών του πρόσθιου λοβού της υποφύσεως γυναικών.

SUMMARY

The role of submaximal doses of ghrelin in the secretion of growth hormone in women under various conditions of estrogenic effect.

Maria Ch. Malandri

Ghrelin is a 28-amino acid protein, which is produced mainly in the mucosa of the stomach, but it is also expressed in other tissues. Ghrelin is considered the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. Recent studies have shown that ghrelin affects the reproductive function, mainly through its actions on the pituitary gland and the ovaries. This study was conducted to investigate **1)** The role of estrogen in ghrelin-induced secretion of growth hormone, **2)** The effect of ghrelin on the secretion of gonadotropins and the role of estrogen and **3)** The role of estrogen in ghrelin stimulated secretion of prolactin.

Materials and methods: The study included 20 women allocated to group 1 and group 2. Group 1 included 10 healthy women of reproductive age and group 2 10 healthy postmenopausal women. Two submaximal dosages of ghrelin were used.

Group 1: All women were investigated in two cycles. In the first cycle (control cycle), an experimental procedure was carried out in the early follicular phase (cycle day 2) and was repeated in the late follicular phase. During both experimental procedures, 2 ml of normal saline was given i.v. as an acute injection (time 0 min) and it was repeated 90 min later (time 90 min). In the second cycle (study cycle), the same experimental procedures were performed as described above, but instead of normal saline, the women were given ghrelin as an acute i.v. injection at the corresponding times at the dose of 0.15 µg/kg (0 min) and 0.30 µg/kg (90 min). In each experimental procedure, blood samples were obtained from all women in relation to (time 0) at -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min.

Group 2: The women received estradiol valerate per os for 14 days twice, a month apart. At the two time periods of estradiol administration (A and B), four experimental procedures were performed in all women, two with ghrelin administration (Exp 1A and Exp 15A) and two with normal saline administration (Exp 1B and Exp 15B).

In particular, Exp 1A and Exp 1B were performed on day 1 of time periods A and B respectively, while Exp 15A and Exp 15B were performed on the day 15 of time periods A and B of the estradiol administration respectively. In Exp 1A and Exp 15A, after overnight fasting, ghrelin was administered to women on day 1 and 15 at a single i.v. dose of 0.15 µg/kg (time 0 min) and a second ghrelin dose of 0.30 µg/kg 90 min later (time 90 min). After one month, the experimental procedures Exp 1B and Exp 15B were performed. These procedures were identical to Exp 1A and Exp 15A in terms of the timing, but instead of ghrelin a single dose of 2 ml saline was administered at the corresponding times (0 and 90 min). Blood samples were obtained in all four experimental procedures in relation to (time 0 min) -15, 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min.

Total ghrelin was measured in plasma, while growth hormone, estradiol, progesterone, FSH, LH and prolactin were measured in serum. Hormones were measured by radioimmunoassay or immunoradiometric methods. Statistical analysis was performed using the software package NCSS 2001.

Results: Total plasma ghrelin was increased after the i.v. administration of this hormone in Exp 1A and Exp 15A and was not affected by estrogen. Ghrelin-induced increase in the secretion of growth hormone was similar in the early and the late follicular phase of the cycle (group 1) as well as in Exp 1A and Exp 15A (group 2). In normally cycling women (group 1), ghrelin was shown to exert a suppressive effect on gonadotropin secretion, particularly in the late follicular phase. However, in postmenopausal women (group 2), ghrelin administration did not affect the secretion of gonadotropins either before (Exp 1A) or after treatment with estradiol (Exp 15A), while it significantly increased serum prolactin levels. The stimulating effect of ghrelin on prolactin secretion was enhanced by the exogenous administration of estrogen.

Conclusions: This study shows for the first time that the response of growth hormone to two submaximal doses of ghrelin was similar in the early and the late follicular phase of the normal menstrual cycle or in postmenopausal women treated with estradiol. These results suggest that estradiol does not play a significant role in this action of ghrelin. The study also shows for the first time an inhibitory effect of two small dosages of ghrelin on diurnal secretion of FSH and LH in the late follicular phase of the cycle. Although this

inhibitory effect of ghrelin on FSH and LH levels was not seen in estrogen treated postmenopausal women, it is suggested that estradiol may play a permissive role. Finally, ghrelin stimulated prolactin secretion an effect that was enhanced by estradiol. It is likely that estradiol interacts with ghrelin by affecting its action on the pituitary gland, but the exact physiological mechanism requires further investigation.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alvarez-Castro P, Isidro ML, Garcia-Buela J, et al. (2004). Marked GH secretion after ghrelin alone or combined with GH-releasing hormone (GHRH) in obese patients. *Clin Endocrinol* 61:250–255

Anderson SM, Shah N, Evans WS, Patrie JT, Bowers CY, Veldhuis JD (2001). Short-term estradiol supplementation augments growth hormone (GH) secretory responsiveness to dose-varying GH-releasing peptide infusions in healthy postmenopausal women. *Clin Endocrinol Metab* 86:551–560

Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP, Nussdorfer GG (2003). Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: Evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Lett.* 536: 173-9

Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T ET AL. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753–4758

Arvat E, Gianotti L, Broglio F, Maccagno B, Bertagna A, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (1997). Oestrogen replacement does not restore the reduced GH-releasing activity of hexarelin, a synthetic hexapeptide, in post-menopausal women. *Eur J Endocrinol.* 136:483–487

Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2000). Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Endocrinol Invest.* 23:493-5

Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2001). Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and

interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *Clin Endocrinol Metab.* 86:1169-74

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Fujimiya M, Katsuura G, Makino S, Fujino MA, Kasuga M (2001a). A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 74: 143-7

Avram AM, Jaffe CA, Symons KV, Barkan AL (2005). Endogenous circulating ghrelin does not mediate growth hormone rhythmicity or response to fasting. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 2982–2987

Baatar D, Patel K, Taub DD (2011). The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 340(1):44-58

Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, et al. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and fat distribution in liver and skeletal muscle. *Physiol Endocrinol Metab.* 288: 228–E235

Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA (2003). Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *Clin. Endocrinol. Metab.* 88 :2180–2184

Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C & Tena-Sempere M (2002). Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biology of Reproduction* 67: 1768–76

Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M (2004). Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 145:4825-34
Baatar D, Patel K, Taub DD (2011). The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 340: 44-58

Bellone S, Baldelli R, Radetti G, Rapa A, Vivenza D, Petri A, Savastio S, Zaffaroni M, Broglio F, Ghigo E, Bona G (2006). Ghrelin secretion in preterm neonates progressively increases and is refractory to the inhibitory effect of food intake. *Clin Endocrinol Metab.* 91: 1929-33

Bewick GA, Kent A, Campbell D, Patterson M, Ghatel MA, Bloom SR, Gardiner JV. (2009). Mice with hyperghrelinemia are hyperphagic and glucose intolerant and have reduced leptin sensitivity. *Diabetes* 58: 840–846

Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res.* 90: 844-9

Bouhours-Nouet N, Boux de Casson F, Rouleau S, Douay O, Mathieu E, Boudierlique C, Gillard P, Limal JM, Descamps P, Coutant R (2006). Maternal and cord blood ghrelin in the pregnancies of smoking mothers: possible markers of nutrient availability for the fetus. *Horm Res.* 66: 6-12

Bowers CY (1998). Growth hormone releasing peptide (GHRP). *Cel Mol Life Sci.* 54:1316-1319

Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, and Chang K (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106: 663–667

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* 179: 77-79

Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *Clin Endocrinol Metab.* 86:5083-6

Broglio F, Benso A, Gottero C, Prodham F, Gauna C, Filtri L, Arvat E, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E (2003). Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *Endocrinol Invest.* 26:192-6

Broglio F, Gottero C, Prodham F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *Clin Endocrinol Metab.* 89(6):3062-5

Casanueva and Carlos Dieguez (1999). Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. *Trends Endocrinol Metab* 10: 30-38

Casanueva and Carlos Dieguez (2002) Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 3:325–338

Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH (2010). Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* 31:44-60

Cella SG, Locatelli V, de Gennaro V, Puggioni R, Pintor C, Muller EE (1985). Human pancreatic growth hormone (GH)-releasing hormone stimulates GH synthesis and release in infant rats. An in vivo study. *Endocrinology* 116: 574-577

Chahal HS, Drake WM (2007). The endocrine system and ageing. *Pathol* 211:173–180

Cheng K, Chan WW, Butler B, Wei L, Schoen WR, Wyvratt MJ Jr, Fisher MH, and Smith RG.(1993). Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel non-peptidyl GH secretagogue. *Endocrinology* 132: 2729–2731

Chiesa C, Osborn JF, Haass C, Natale F, Spinelli M, Scapillati E, Spinelli A, Pacifico L (2008). Ghrelin, leptin, IGF-1, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry? *Clin Chem.*54:550-8

Chouzouris TM, Dovolou E, Dafopoulos K, et al. (2016). Ghrelin suppresses the GnRH-induced preovulatory gonadotropin surge in dairy heifers. *Theriogenology* 86:1615-1621

Chu MC, Cospers P, Nakhuda GS, Lobo RA (2006). A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril.* 86: 1669–75

Churm R, Davies JS, Stephens JW, Prior SL (2017). Ghrelin function in human obesity and type 2 diabetes: a concise review. *Obes Rev.* 18:140-148

Cooke NE, Ray J, Watson MA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA (1988). Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *Clin Invest.* 82:270-5

Cortelazzi D, Cappiello V, Morpurgo PS, Ronzoni S, Nobile De Santis MS, Cetin I, Beck-Peccoz P, Spada A (2003). Circulating levels of ghrelin in human fetuses. *Endocrinol.* 149:111-6

Cummings DE., Purnell JQ., Frayo RS., Schmidova K., Wisse BE., and Weigle DS (2001.) A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans *Diabetes* 50: 1714-1719

Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS (2002). Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med.* 8:643-4

Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP et al. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 346: 1623–1630

Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Physiol Endocrinol Metab.* 287:mE297-304

Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, et al. (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.* 19:1985-1992

Dafopoulos K, Surlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE (2009). Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril.* 92:1389-94.

Dafopoulos K, Chalvatzas N, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE (2010). The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women. *Endocrinol Invest.* 33: 109-12

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255–4261

Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S (2001). Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 904-7

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mandal MS, Hosoda H ET AL (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124–129

De Palo EF, De Filippis V, Gatti R, Spinella P (2006). Growth hormone isoforms and segments/fragments: molecular structure and laboratory measurement. *Clin Chim Acta.* 364: 67-76

De Vriese C, Delporte C (2008). Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Biochem Cell Biol.* 40:1420-4

Dimaraki EV, Jaffe CA, Demott-Friberg R, Russell-Aulet M, Bowers CY, Marbach P, Barkan AL (2001). Generation of growth hormone pulsatility in women: evidence against somatostatin withdrawal as pulse initiator. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:489–E495

Dimitraki M, Koutlaki N, Gioka T, et al. (2015). Attenuation of the oestrogen positive feedback mechanism with the age in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 83:377-383

Dovolou E, Chadio S, Messinis IE, et al. (2013). Human ghrelin decreases pituitary response to GnRH in superovulated ewes. *Theriogenology* 80:262-268

Druce MR, Neary NM, Small CJ, Milton J, Monteiro M, Patterson M et al. (2006). Subcutaneous administration of ghrelin stimulates energy intake in healthy lean human volunteers. *Obes (Lond)* 30: 293–296

Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ramé C, Froment P (2010). Ghrelin in Female and Male Reproduction. *International journal of peptides.*

Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H, Uhr M, Pollmacher T, and Schuld A (2004). Sleepenhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol EndocrinolMetab.* 286: 963-7

Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J (2002). Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur Endocrinol.* 146(2):241-4

Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS (1991). Rapid augmentation of prolactin cell number and secretory capacity by an estrogen- induced factor released from the neurointermediate lobe. *Endocrinology* 129:838-842

Esler WP, Rudolph J, Claus TH (2007). Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite and promote weight loss. *Endocrinology* 26:239–256

Espelund U, Hansen TK, Højlund K, Beck-Nielsen H, Clausen JT, Hansen BS, Orskov H, Jørgensen JO, Frystyk J (2005). Fasting unmasks a strong inverse association between ghrelin and cortisol in serum: studies in obese and normal-weight subjects. *Clin Endocrinol Metab.* Feb;90:741-6

Farquhar J, Heiman M, Wong AC, Wach R, Chessex P, Chanoine JP (2003). Elevated umbilical cord ghrelin concentrations in small for gestational age neonates. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4324-7

Fazeli PK, Misra M, Goldstein M, Miller KK, Klibanski A (2009). Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol Metab.* 95:369–374

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E & Pinilla L (2004). Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters* 362:103–107

Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L & Tena-Sempere M (2005). Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology* 146: 3018–3025

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E & Pinilla L (2006). Effects of Ghrelin upon Gonadotropin-Releasing Hormone and Gonadotropin Secretion in Adult Female Rats: in vivo and in vitro Studies. *Neuroendocrinology* 82: 245–255

Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Roa J, Castellano JM, NavarroVM, Aguilar E, Pinilla L (2007). Direct stimulatory effect of ghrelin on pituitary release of LH through a nitric oxide-dependent mechanism that is modulated by estrogen. *Reproduction* Jun 133:1223-32

Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K (2009). Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci* 28:143-7

Frohman LA, Downs TR, Clarke IJ, Thomas GB. Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep (1990). Spontaneous secretion and response to insulin-induced hypoglycemia. *Clin Invest* 86:17-24

Fuglsang J, Skjaerbaek C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, Ovesen P (2005). Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 62:554-9

Fuglsang J (2008). Ghrelin in Pregnancy and Lactation. *Ghrelin in Pregnancy and Lactation. Vitam Horm.* 77:259-84

Fujitsuka N., Asakawa A., Amitani H., Fujimiya M., Inui A (2012). Ghrelin and gastrointestinal movement. *Meth. Enzymol.* 514, 289-301

Furuta M, Funabashi T & Kimura F (2001). Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288:780-785

Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, Vicennati V, Manicardi E, Carcello A, Cacciari M, De lasio R, Pasquali R (2003). Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *Endocrinol* 26: 629-34

García MC, López M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C (2007). Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*. 133: 531-40

Garcia-Fuentes E, Garrido-Sanchez L, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Gallego-Perales JL, Rivas-Marin J et al. (2008). Different effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and open biliopancreatic diversion of Scopinaro on serum PYY and ghrelin levels. *Obes Surg* 18: 1424–1429

Garcia JM, Polvino WJ (2009). Pharmacodynamic hormonal effects of anamorelin, a novel oral ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue in healthy volunteers. *Growth Horm*. 19:267-73

Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M (2003). Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *Clin Endocrinol Metab*. 88:879-87

Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M (2004). Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *Clin Endocrinol Metab*. 89:400-9

Gaytan F, Morales C, Barreiro ML, et al. (2005). Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:1798-804

Giustina A, Veldhuis JD (1998). Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19: 717-797

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:2988

Grinspoon S, Miller KK, Herzog DB, Grieco KA, Klibanski A (2004). Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. *Clin Endocrinol Metab.* 89: 3988–93

Gualilloo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K et al. (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788–794

Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218: 585-587

Gutierrez J.A., Solenberg P.J., Perkins D.R., Willency J.A., Knierman M.D., Jin Z. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105:6320–6325

Halem H.A., Taylor J.E., Dong J.Z., Shen Y., Datta R., Abizaid A., Diano S., Horvath T., Culler M.D (2005). A Novel Growth Hormone Secretagogue-1a Receptor Antagonist That Blocks Ghrelin-Induced Growth Hormone Secretion but Induces Increased Body Weight Gain. *Neuroendocrinology* 81:339–349

Hammer RE, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayo KE (1985). Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature.* 315: 413-416

Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, Kangawa K, Takaya K, Nakao K (2003). Alterations of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide-induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. *Endocrinology* 144:5365-71

Hattori N, Saito T, Yaguy T, Jlang BH, Kitagawa K, Inagaki C (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4284–4291

Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM (2004). Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999–2002. *JAMA.* 291:2847–50

Hewson AK, Tung LY, Connell DW, Tookman L, Dickson SL (2002). The rat arcuate nucleus integrates peripheral signals provided by leptin, insulin, and a ghrelin mimetic. *Diabetes.* 51:3412–9

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000). Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Ghr Biochem Biophys Res Commun.* 273: 909–13

Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *Biol Chem.* 278:64–70

Hotta M, Ohwada R, Katakami H, Shibasaki T, Hizuka N, Takano K (2004). Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol Metab.* 89:5707–5712

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 273:974–7

Hudson JL, Hiripi E, Pope HG Jr, Kessler RC (2007). The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol Psychiatry.* 61:348–58

Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K, Sugihara S (2002). Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*. 51:3408-11

Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke Ij (2006). Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology* 147:510-519

Iranmanesh A, Grisso B, Veldhuis JD (1994). Low basal and persistent pulsatile growth hormone secretion are revealed in normal and hyposomatotropic men studied with a new ultrasensitive chemiluminescence assay. *J Clin Endocrinol Metab*. 78: 526-535

Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M (2007). Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. *Androl*. 2007 28:320-4

Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK (2002). Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *Endocrinol*. 172:7–11

Johannsson G, Marin P, Lonn L, Ottosson M, Stenlof K, Bjorntorp P, Sjostrom L, Bengtsson BA(1997). Growth hormone treatment of abdominally obese men reduces abdominal fat mass, improves glucose and lipoprotein metabolism, and reduces diastolic blood pressure. *Clin Endocrinol Metab* 82:727–734

Joseph PJ, Couzinet B, Brailly S, et al. (1986). Interactions of oestradiol benzoate and promegestone upon basal and TRH- induced prolactin secretion in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*. 24:497-503

Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K et al. (2001). Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:4984–4990

Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2004). Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145: 4144-4153

Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T (2003). Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 144: 2623-33

Kellokoski E, Pöykkö SM, Karjalainen AH, Ukkola O, Heikkinen J, Kesäniemi YA, Hörkö S (2005). Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 2954-63

Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY (2005). Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37: 359–369

Kirchner H., Gutierrez J.A., Solenberg P.J., Pfluger P.T., Czyzyk T.A., Willency J.A. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nature Medicine.* 15: 741–745.

Kluge M et al. (2007) Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *Clin Endocrinol Metab.* 3202–05

Kluge M, Uhr M, Bleninger P, Yassouridis A, Steiger A (2009). Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. Ghrelin suppresses secretion of FSH in males. *Clin Endocrinol (Oxf).* 70:920-3

Kluge M, Schüssler P, Schmid D, Uhr M, Kleyer S, Yassouridis A, Steiger A (2009). Ghrelin Plasma Levels Are Not Altered in Major Depression. *Neuropsychobiology* 59:199–204

Kluge M, Schüssler P, Schmidt D, et al. (2012). Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle- stimulating hormone (FSH) in women. *Clin Endocrinol Metab.* 97:448-451

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402: 656-660

Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 12:118-22

Kojima M, Kangawa K (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 85: 495-522

Kok P, Paulo RC, Cosma M, Mielke KL, Miles JM, Bowers CY, Veldhuis JD (2008). Estrogen supplementation selectively enhances hypothalamo-pituitary sensitivity to ghrelin in postmenopausal women. *Clin Endocrinol Metab*. 93: 4020-4026

Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowedge et al. (2001). The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:881–887

Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB (2004). Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25: 27–68

Lambrinoudaki IV, Christodoulakos GE, Economou EV, Vlachou SA, Panoulis CP, Alexandrou AP, Kouskouni EE, Creatsas GC (2008). Circulating leptin and ghrelin are differentially influenced by estrogen/progestin therapy and raloxifene. *Maturitas* 59: 62-71

Lanfranco F (2008). Acylated ghrelin inhibits spontaneous LH pulsatility and responsiveness to naloxone, but not that to GnRH, in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: 3633–39

Lanfranco F, Gianotti L, Giordano R, Pellegrino M, Maccario M, Arvat E (2003). Ageing, growth hormone and physical performance. *Endocrinol Invest*. 26:861-72

Lányi E, Várnagy A, Kovács KA, Csermely T, Szász M, Szabó I (2008). Ghrelin and acyl ghrelin in preterm infants and maternal blood: relationship with endocrine and anthropometric measures. *Eur J Endocrinol.* 158:27-33

Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM (2002). Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155–162

Lebrethon M-C, Aganina A, Fournier M, Gérard A, Parent AS, Bourguignon JP (2007). Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *Journal of Neuroendocrinology* 19:181–188

Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH (2002). Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185–190

Lengyel AM (2006b). Novel mechanisms of growth hormone regulation: growth hormone-releasing peptides and ghrelin. *Braz J Med Biol Res* 39: 1003-1011

Lilleness BM, Frishman WH (2016). Ghrelin and the Cardiovascular System. *Cardiol Rev.* 24:288-297

Lin-Su K, Wajnrajch MP (2002). Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Rev Endocr Metab Disord.* 3: 313-323

Litwiniec A, Izdebska M, Włodarczyk R, Grzanka A, Jaśkowski J. M (2008). Ghrelin - characterization, regulation of synthesis, release and possible role in reproduction. *Anim. Feed Sci.* 17:455–472

Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, García-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP (2003). Intracellular signaling mechanisms

mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology*. 144: 5372-80

Mano-Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Yamauchi N, Shuto Y, Sugihara H, Oikawa S, Shibasaki T (2006). Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in transgenic rats whose expression of ghrelin receptor is attenuated: evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH expression in the arc. *Endocrinology*. 147: 4093–4103

Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, VazquezMJ, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L, Wells T, Dieguez C & Tena-Sempere M (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 147: 2374–82

Marzullo, P., Verti, B., Savia, G., Walker, G. E., Guzzaloni, G., Tagliaferri, M., Di Blasio, A. and Liuzzi, A (2004). The relationship between active ghrelin levels and human obesity involves alterations in resting energy expenditure. *Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 936-939

Marzullo P, Caumo A, Savia G, Verti B, Walker GE, Maestrini S, Tagliaferri A, et al. (2006). Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *Clin Endocrinol Metab.* 91: 4124-4130

Maheshwari HG, Pezzoli SS, Rahim A, Shalet SM, Thorner MO, Baumann G (2002). Pulsatile growth hormone secretion persists in genetic growth hormone-releasing hormone resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: 943–951

Matsubara M, Sakata I, Wada R, Yamazaki M, Inoue K, Sakai T (2004). Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. *Peptides* 25: 289–97

Mayo KE, Vale W, Rivier J, Rosenfeld MG, Evans RM (1985). Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature* 306: 86-88

Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, et al. (2009a). Growth hormone and prolactin response to ghrelin during the normal menstrual cycle. *Clin Endocrinol*. 71:383-387

Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulas P, Messinis IE (2009b). Effect of ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle. *Hum Reprod*. 24:976-81

Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N (2010). Blockage of ghrelin- induced prolactin secretion in women by bromocriptine. *Fertil Steril*. 94:1478-1481

Messinis IE, Templeton A (1988). Changes in serum prolactin levels during the follicular phase and the endogenous luteinizing hormone surge of cycles hyperstimulated with follicle stimulating hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 28:243-51

Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, Lea RG (2005). Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol*. 31:3:60

Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF, Ghatei M, Popovic V. (2006). Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol Metab*. 91:1491–1495

Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A (2005). Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *J Physiol Endocrinol Metab*. 289: 347-56.

Monteleone P, Serritella C, Martiadis V, Scognamiglio P, Maj M (2008). Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 93:4418–21

Muccioli, M. Tschop, M. Papotti, R. Deghenghi, M. Heiman, E. Ghigo (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 440: 235-254

Muller EE, Locatelli V, Cocchi D (1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79: 511-607

Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F, Casanueva FF, D'Alessio D, Depoortere I, Geliebter A, Ghigo E, Cole PA, Cowley M, Cummings DE, Dagher A, Diano S, Dickson SL, Diéguez C, Granata R, Grill HJ, Grove K, Habegger KM, Heppner K, Heiman ML, Holsen L, Holst B et al., (2015) Ghrelin. *Mol Metab.* 214(6): 437-60.

Mullis PE, Deladoey J, Dannies PS (2002). Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: insights on the secretory pathway of peptide hormones. *Horm Res.* 58: 53-66

Murphy KG, Bloom SR (2004). Gut hormones in the control of appetite. *Exp Physiol* 89: 507-516

Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K (2004). Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 110:3674-9

Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. (2006). Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology.* 147:1333-42

Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiyama K, Muranaga T, Nagai N, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T, Inui A (2007). Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. *Psychiatr Res.* 41:814-20

Nass R, Thorner MO (2002). Impact of the GH-cortisol ratio on the age-dependent changes in body composition. *Growth Horm IGF Res.* 12:147–161

Nass R, Farhy LS, Liu J, Prudom CE, Johnson ML, Veldhuis P, Pezzoli SS, Oliveri MC, Gaylinn BD, Geysen HM, Thorner MO (2008a). Evidence for acyl-ghrelin modulation of growth hormone release in the fed state. *Clin Endocrinol Metab.* 93:1988-94

Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, et al. (2008b). Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 149:601–611

Naylor SL, Sakaguchi AY, Shen LP, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB (1983). Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 80: 2686-2689

Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR (2004). Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol Metab.* 89:2832-6

Nishi Y., Hiejima H., Hosoda H., Kaiya H., Mori K., Fukue Y. (2005). Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology.* 146: 2255–2264

Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004). Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem.* 89: 1057-1091

Ono M, Miki N, Demura H (1991). Effect of antiserum to rat growth hormone (GH)-releasing factor on physiological GH secretion in the female rat. *Endocrinology.* 129: 1791-1796

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M (2001). Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Endocrinol.* 145:669-73

Pagotto U (2002). Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 5625–29

Pagotto U, Gambineri A, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Otto B, Castaneda T, Tschop M & Pasquali R (2003). Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 4139–4143

Pantel J, Legendre M, Cabrol S, et al. (2006). Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *Clin Invest.* 116:760–768

Patel YC (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 20: 157-198

Petersenn S, Schulte HM (2000). Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm.* 59: 35-69

Petersenn S (2002). Structure and regulation of the growth hormone secretagogue receptor. *Minerva Endocrinol.* 27:243-256

Patterson M, Bloom SR, Gardiner JV (2011.) Ghrelin and appetite control in humans-- potential application in the treatment of obesity. *Peptides.* 32: 2290-4

Paulo, R.C., Brundage, R., Cosma, M., Mielke, K.L., Bowers, C.Y., Veldhuis, J.D (2008). Estrogen elevates the peak overnight production rate of acylated ghrelin. *Clin. Endocrinol Metab.* 93: 4440-4447

Pinkney J, Williams G (2002). Ghrelin gets hungry. *Lancet* 359:1360–1361

Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF (2003). Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *Clin Endocrinol Metab.* 88: 3450-3

Rak A, Szczepankiewicz D, Gregoraszczyk EL (2009). Expression of ghrelin receptor, GHSR-1a, and its functional role in the porcine ovarian follicles. *Growth Hormone and IGF Research.* 68–76

Rak-Mardyła A, Wróbel A, Gregoraszczyk EL (2015). Ghrelin negatively affects the function of ovarian follicles in mature pigs by direct action on basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *Reprod Sci.* 22 :469-75

Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300: 276-278

Roelfsema F, Biermasz NR, Veldman RG, Veldhuis JD, Frolich M, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM (2001). Growth hormone (GH) secretion in patients with an inactivating defect of the GH-releasing hormone (GHRH) receptor is pulsatile: evidence for a role for non-GHRH inputs into the generation of GH pulses. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 2459-2464

Rosenbloom A. (2007). Physiology of Growth. *Ann Nestlé [Engl]* 65: 97–108

Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides.* 23:531-6

Salehi A, Dornonville de la Cour C, Håkanson R, Lundquist I (2004). Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept.* 118:143-50

Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F (1999) Growth hormone in obesity. *Obes Relat Metab Disord.* 3:260–271

Scheid JL, De Souza MJ, Hill BR, Leidy HJ, Williams NI (2013). Decreased luteinizing hormone pulse frequency is associated with elevated 24-hour ghrelin after calorie restriction and exercise in premenopausal women. *Physiol Endocrinol Metab.* 304:109-16

Shiyya T., Nakazato M., Mizuta M., Date Y., Mondal MS., Tanaka M., Nozoe S., Hosoda H., Kangawa K., and Matsukura S. (2002). Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese 152 Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion. *Clin Endocrinol Metab.* 87: 240-244

Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-32

Sirotkin AV, Grossmann R (2007). The role of ghrelin and some intercellular mechanism in controlling the secretory activity of chicken ovarian cells. *Comp Biochem Physiol* 147: 239-246

Small CJ, Bloom SR (2004). Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab.* 15: 259–263

Sokołowska-Mikołajczyk M, Socha M, Szczerbik P, Epler P (2009). The effects of ghrelin on the in vitro spontaneous and sGnRH-A stimulated luteinizing hormone (LH) release from the pituitary cells of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 153: 386-90

Sondergaard E, Gormsen LC, Nellemann B, Vestergaard ET, Christiansen JS, Nielsen S. (2009). Visceral fat mass is a strong predictor of circulating ghrelin levels in premenopausal women. *Eur Endocrinol.* 160:375–379

Sun Y, Ahmed S, and Smith RG (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology* 23: 973–981

Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:4679–4684

Suzuki H, Sasaki Y, Shimizu M, Matsuzaki M, Hashizume T, Kuwayama H (2010). Ghrelin and leptin did not improve meiotic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Reprod Domest Anim*. 45:927-30

Takachi K, Doki Y, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Imaoka S (2006). Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy. *Surg Res*. 130:1–7

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000). Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 85: 4908-11

Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N (2003). Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *Clin Endocrinol Metab*. 88: 2335-40

Tassone F, Broglio F, Destefanis S, Rovere S, Benso A, Gottero C et al. (2003). Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. *Clin Endocrinol Metab*, 88:5478–5483

Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytán F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143: 717-25

Tena-Sempere M (2008). Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm*. 77:285-300

Thorner MO, Chapman IM, Gaylinn BD, Pezzoli SS, Hartman ML (1997). Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Recent Prog Horm Res.* 52: 244–246

Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B (2003). Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *Clin Endocrinol Metab.* 88: 109-16

Tortorella C, Macchi C, Spinazzi R, Malendowicz LK, Trejter M, Nussdorfer GG (2003). Ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone-secreting receptor, is expressed in the human adrenal cortex. *Int J Mol Med.* 12: 213-7

Tropea A, Tiberi F, Minici F, et al. (2007). Ghrelin affects the release of luteolytic and luteotropic factors in human luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 92(8):3239–3245

Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 50:707–709

Unniappan S and Peter RE (2004). In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286: 1093–101

Valentino M, Gonzalez F, Lin J, Waldman S. (2010). Current trends in targeting the hormonal regulation of appetite and energy balance to treat obesity. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 5: 765–783

Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 25: 426-457

Veldhuis JD, Anderson SM, Shah N, Bray M, Vick T, Gentili A, Mulligan T, Johnson ML, Weltman A, Evans WS, Iranmanesh A (2001). Neurophysiological regulation and target-tissue impact of the pulsatile mode of growth hormone secretion in the human. *Growth Horm IGF Res* 11 Suppl. 25-37

Veldhuis JD, Patri JM, Frick K, et al. (2005). Administration of recombinant human GHRH-1,44-amide for 3 months reduces abdominal visceral fat mass and increases physical performance measures in postmenopausal women. *Endocrinol.* 153: 669–77

Veldhuis JD, Keenan DM, Iranmanesh A, Mielke K, Miles JM, Bowers CY (2006). Estradiol potentiates ghrelin-stimulated pulsatile growth hormonesecretion in postmenopausal women. *Clin Endocrinol Metab.* 91:3559–3565

Veldhuis JD, Cosma M, Erickson D, Paulo R, Mielke K, Farhy LS, Bowers CY (2007). Tripartite control of growth hormone secretion in women during controlled estradiol repletion. *Clin Endocrinol Metab* 92:2336–2345

Veldhuis JD, Yang RJ, Wigham JR, et al.(2014) Estrogen- like potentiation of ghrelin-stimulated GH secretion by fulvestrant, a putatively selective ER antagonist, in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:E2557-E2564.

Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G (2002). Neuroendocrine regulation of eating behavior. *J Endocrinol Invest.* 25: 836–854

Viani I, Vottero A, Tassi F (2008). Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-luteincells. *Clin Endocrinol Metab* 93: 1476-1481

Villa P, Costantini B, Perri C, Suriano R, Ricciardi L, Lanzone A (2008). Estro-progestin supplementation enhances the growth hormone secretory responsiveness to ghrelin infusion in postmenopausal women.*Fertil Steril.* 89: 398-403

Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M (2003). Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Pathol.* 162:645-54

Vulliémoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, et al. (2004). Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five- hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:5718-5723

Vulliémoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Rivier J, Ferin M (2008). Astressin B, a nonselective corticotropin-releasing hormone receptor antagonist, prevents the inhibitory effect of ghrelin on luteinizing hormone pulse frequency in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 149:869-74

Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schäuble N, Friedel S, Lichtner P et al . (2004) Ghrelin receptor gene: Identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 57–162

Wagner C, Caplan SR, Tannenbaum GS (2009). Interactions of ghrelin signaling pathways with the GH neuroendocrine axis: a new and experimentally tested model. *J Mol Endocrinol.* 43: 105–119

Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH, Jr (2005). Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* 146: 1611-1625

Weikel JC, Wichniak A, Ising M, Brunner H, Friess E, Held K, Mathias S, Schmid DA, Uhr M, Steiger A (2003). Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: 407-415

Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept.* 107:63–69

Wilding JP (2002). Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med.* 19: 619–627

Williams T, Berelowitz M, Joffe SN, Thorner MO, Rivier J, Vale W, Frohman LA. (1984). Impaired growth hormone responses to growth hormone-releasing factor in obesity. A pituitary defect reversed with weight reduction. *N Engl Med.* 311:1403–1407

Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74: 683–701.

Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM.(2003) Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144: 5184–5187

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 141: 4325-8

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG et al. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Clin Endocrinol Metab* 86: 5992

Yang J., Brown M.S., Liang G., Grishin N.V (2008). Goldstein J.L. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 132: 387–396

Ybarra J, Bobbioni-Harsch E, Chassot G, Huber O, Morel P, Assimakopoulos-Jeannet F et al. (2009). Persistent correlation of ghrelin plasma levels with body mass index both in stable weight conditions and during gastric-bypass-induced weight loss. *Obes Surg.* 19: 327–331

Yildiz BO., Suchard MA., Wong ML., McCann SM., and Licinio J (2004). Alterations in the Dynamics of Circulating Ghrelin, Adiponectin, and Leptin in Human Obesity *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10434-10439

Zhang K, Wei HX, Zhang YH, Wang SH, Li Y, Dai YP, Li N (2007). Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *J Reprod Dev.* 53: 647-53

Zhao TJ, Liang G, Li RL, et al. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*;107:7467–7472

Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE et al. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *Clin Invest:* 3564–3572

Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2005). Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor. *Endocrinology* 146:3836–3842

PUBLICATIONS

1. Submaximal doses of ghrelin do not inhibit gonadotrophin levels but stimulate prolactin secretion in postmenopausal women.

Messini CI, Malandri M, Anifandis G, Dafopoulos K, Georgoulas P, Sveronis G, Garas A, Daponte A, Messinis IE.

Clin Endocrinol (Oxf). 2017 Jul;87(1):44-50.

2. Inhibitory effect of submaximal doses of ghrelin on gonadotropin secretion in women.

Messini CI, Dafopoulos K, Malandri M, Georgoulas P, Anifandis G, Messinis IE.

Horm Metab Res. 2014 Jan;46(1):36-40.

3. Growth hormone response to submaximal doses of ghrelin remains unchanged during the follicular phase of the cycle.

Messini CI, Dafopoulos K, Malandri M, Georgoulas P, Anifandis G, Messinis IE.

Reprod Biol Endocrinol. 2013 May 10;11:36.