



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ: ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

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

**Ο ΩΘΗΚΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ  
ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗ GnRH  
ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ PCOS**

**ΧΡΗΣΤΟΣ ΒΕΝΕΤΗΣ**

**Μαιευτήρας-Χειρουργός Γυναικολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2009**

## Τριμελής επιτροπή

1. Ιωάννης Ε. Μεσσήνης Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Επιβλέπων
2. Αθανάσιος Καλλιτσάρης Αν. Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
3. Χαρίκλεια Σκέντου Λέκτωρ Μαιευτικής Γυναικολογίας

## Επταμελής επιτροπή

1. Καθηγητής Ιωάννης Μεσσήνης
2. Καθηγητής Γεώργιος Αντωνακόπουλος
3. Καθηγητής Νικόλαος Βαμβακόπουλος
4. Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης
5. Αν. Καθηγητής Αθανάσιος Καλλιτσάρης
6. Αν. Καθηγητής Γεώργιος Κουκούλης
7. Λέκτωρ Χαρίκλεια Σκέντου

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ανωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS εμφανίζουν αυξημένα βασικά επίπεδα LH και αυξημένη ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH που εκφράζεται με αυξημένη έκκριση LH. Οι ωοθήκες παράγουν στεροειδικές και πεπτιδικές ορμόνες που είναι σημαντικοί μεσολαβητές στους μηχανισμούς παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback mechanisms) του γοναδο-υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί το ρόλο των ωοθηκικών παραγόντων, στεροειδών και μή, στη ρύθμιση της υποφυσιακής ευαισθησίας στη GnRH και να προσφέρει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών.

Οφείλω ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιωάννη Ε. Μεσσήνη που με ενέπνευσε να ασχοληθώ με ερευνητική μελέτη στο πεδίο της Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας. Τον ευχαριστώ επίσης για τις καθοριστικές συμβουλές, την υπομονή και κατανόησή του και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω ενεργά στο Συνέδριο της ESHRE στην Πράγα.

Πολύτιμη και καθοριστική ήταν και η βοήθεια που μου παρείχε ο Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Κωνσταντίνος Νταφόπουλος τον οποίο ευχαριστώ θερμά.

Όλες οι ορμονικές μετρήσεις έγιναν χάρη στη συμβολή και συμπαράσταση του Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας Σπύρου Πουρνάρα τον οποίο και ευχαριστώ.

Επίσης ευχαριστώ όλες τις γυναίκες που συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

#### Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ ΟΡΜΟΝΗ (GnRH)

#### Η έκκριση της GnRH

#### Η ρύθμιση της έκκρισης της GnRH

#### ΟΙ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΕΣ

#### Οι δεξαμενές αποθήκευσης των γοναδοτροφινών

#### Η ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ

#### Η κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροφινών

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

#### Η ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗ ΦΑΣΗ

#### Ο ρόλος των ωοθηκικών στεροειδών

#### Ο ρόλος των μη στεροειδικών ωοθηκικών ορμονών

#### Η ΩΧΡΙΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

#### Η ΩΧΡΙΝΙΚΗ-ΩΟΘΥΛΑΚΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ

#### Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΑΛΛΙΝΔΡΟΜΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

#### Η έναρξη του κύματος της LH

#### Ο φυσιολογικός ρόλος του GnSAF: Το εύρος του κύματος της LH

#### Ο τερματισμός του κύματος της LH

#### Παθολογικές καταστάσεις

#### ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

#### Η έκκριση της LH στο PCOS

#### Η παραγωγή των ινχιπινών A και B στις γυναίκες με PCOS

#### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

**2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**  
**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**  
**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**  
**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**  
**SUMMARY**  
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην έκκριση των ωοθηκικών ορμονών και των γοναδοτροφινών. Τα επίπεδα της LH είναι αυξημένα στην πλειοψηφία των γυναικών με PCOS (Balen et al., 1996; Hendrics et al., 2008). Επίσης η απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH είναι αυξημένη στις γυναίκες με PCOS (Mortimer et al., 1978; Steck et al., 1991; Patel et al., 2004). Εάν αυτή η υπερευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH όσον αφορά την έκκριση της LH, οφείλεται σε ωοθηκικούς παράγοντες ή σε δυσλειτουργία της υπόφυσης είναι αντικείμενο συζητήσεων και έρευνας (Ehrmann 2005). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση προγεστερόνης ομαλοποιεί τα βασικά επίπεδα της LH καθώς και τα επίπεδά της μετά τη διέγερση με GnRH, συνιστώντας ότι η έλλειψη αυτού του στεροειδούς καθώς και ενός λειτουργικού ωχρού σωματίου είναι υπεύθυνη για τις διαταραχές στην έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες με PCOS (Christman et al., 1991; Fiad et al., 1996; Padmanabhan et al., 2001).

Όλες οι προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες διερεύνησαν το ρόλο των ωοθηκών στην έκκριση της LH κάτω από βασικές συνθήκες και μόνο μετά από εξωγενή χορήγηση στεροειδών. Είναι γνωστό ότι οι ωοθήκες εκτός από τις στεροειδικές ορμόνες εκκρίνουν και πεπτιδία όπως οι ινχιμπίνες και ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών (GnSAF) που πιθανόν να συμμετέχει στους μηχανισμούς παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback mechanisms) του γοναδο-υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος (Messinis 2006). Η δραστηριότητα κάποιων ωοθηκικών πεπτιδίων, όπως του GnSAF, γίνεται εμφανής μόνο μετά από

διέγερση των ωοθηκών με εξωγενή χορήγηση FSH (Messinis 2006). Τέτοια δυναμική προσέγγιση έχει προηγουμένως εφαρμοσθεί και μελετηθεί σε υγιείς γυναίκες και έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τον ωοθηκικό έλεγχο στην έκκριση των γοναδοτροφινών (Messinis et al., 1993; 1994; 1998). Στις γυναίκες με PCOS έχει μελετηθεί η ωοθηκική απάντηση στη διέγερση με FSH όσον αφορά την E2 και τις ινχιμπίνες, αλλά όχι στο πλαίσιο των μηχανισμών παλλίνδρομης ρύθμισης (Coffler et al., 2003; Wachs et al., 2006). Η εφαρμογή αυτής της δυναμικής προσέγγισης στις γυναίκες με PCOS ίσως προσφέρει περισσότερες γνώσεις όσον αφορά τον ωοθηκικό έλεγχο στην έκκριση της LH από τη GnRH σ' αυτές τις γυναίκες.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνήσει το ρόλο των ωοθηκικών ουσιών, στεροειδών και μή, στην απάντηση της υπόφυσης στη GnRH στις ανωοθυλακιωρρηκτικές γυναίκες με PCOS και να εμβαθύνει έτσι στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο γεννητικός κύκλος που εμφανίζεται στη γυναίκα με την έναρξη της ήβης, για να είναι φυσιολογικός, με σταθερή κυκλικότητα (24-35 ημερών), κανονική διάρκεια εμμηνορυσίας (3-8 ημέρες) και ποσότητα εμμήνων 30-150ml, σταθερή διάρκεια ωοθυλακικής φάσης (10-21 ημέρες), σταθερή διάρκεια ωχρινικής φάσης (12-14 ημέρες) και ωορρηξία, θα πρέπει να υπάρχει φυσιολογική ανατομική κατασκευή του γεννητικού συστήματος και κυρίως να υπάρχει φυσιολογική λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες, που σημαίνει φυσιολογική παραγωγή ορμονών (υποθαλαμικών, υποφυσιακών, ωοθηκικών στεροειδών και μή) και φυσιολογική λειτουργία όλων των μηχανισμών θετικής και αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive and negative feedback mechanisms).

Θα γίνει μια όσο το δυνατόν πιο σύντομη περιγραφή της δράσης των ορμονών του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες, καθώς και των μηχανισμών αλληλορύθμισής τους, κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου, ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητή και η μελέτη μας που αφορά στη διερεύνηση των ορμονικών διαταραχών στο PCOS.

## Η ΕΚΛΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ ΟΡΜΟΝΗ (GnRH)

Η εκλυτική των γοναδοτροφινών ορμόνη (gonadotrophin releasing hormone-GnRH) αρχικά είχε απομονωθεί από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, των Schally και Guillemin το 1971 (Schally et al., 1971; Matsuo et al., 1971; Burgus et al., 1972). Αποτελεί τον υποθαλαμικό εκλυτικό παράγοντα (δεκαπεπτίδιο) που ελέγχει τη βιοσύνθεση των γοναδοτροφινών στην υπόφυση και τελικά την αναπαραγωγική ικανότητα (Seeburg et al., 1987). Παράγεται από ένα πληθυσμό 800 έως 1000 νευρώνων διάσπαρτων στον υποθάλαμο και εκκρινόμενη στην υποφυσιακή-πυλαία κυκλοφορία φθάνει στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, συνδέεται με τους ειδικούς υποδοχείς της και προκαλεί την έκκριση των γοναδοτροφινών.

## Η έκκριση της GnRH

Ο κύριος έλεγχος της παραγωγής και της έκκρισης των υποφυσιακών γοναδοτροφινών γίνεται από τη GnRH όπως έχει αποδειχθεί από τις πρώτες μελέτες, όπου με χορήγηση αντιορού έναντι της GnRH (McCormack et al., 1977; Fraser et al., 1986), GnRH ανταγωνιστών (Cetel et al., 1983; Kenigsberg et al., 1984) και με χρόνια χορήγηση GnRH αγωνιστών (Bergquist et al., 1979a, 1979b; Comite et al., 1981) καθώς και από πληθώρα ανάλογων μελετών στη συνέχεια, προέκυψε αναστολή της έκκρισης των γοναδοτροφινών. Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις, ότι η έκκριση της FSH, σε σύγκριση με της LH, είναι λιγότερο εξαρτημένη από τη GnRH και πιθανόν κάποιος ή κάποιοι FSH εκλυτικοί παράγοντες να εμπλέκονται (Padmanabhan & McNeilly, 2001). Έχει αποδειχθεί με μια σειρά πειραμάτων, ότι για τη φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροφινών απαιτείται η κατά ώσεις έκκριση της GnRH με συγκεκριμένη διακύμανση τιμών συχνότητας και εύρους (Knobil, 1980). Σε γυναίκες με υποθαλαμική αμηνόρροια, η συνεχής ενδοφλέβια έγχυση GnRH απέτυχε να διεγείρει τη συνεχή έκκριση γοναδοτροφινών, αλλά η διακεκομμένη χορήγηση του δεκαπεπτιδίου με συχνότητα μία ώση ανά 90 min, διατήρησε σταθερά τα επίπεδα των γοναδοτροφινών εντός των φυσιολογικών ορίων (Southworth et al., 1991). Μειώνοντας τη συχνότητα χορήγησης της GnRH τόσο σε πειραματόζωα (Wildt et al., 1981; Adams et al., 1988; Pohl et al., 1983), όσο και σε άνδρες και γυναίκες (Finkelstein et al. 1988; Gross et al., 1987; Spratt et al., 1987; Filicori et al., 1989; Crowley et al., 1991) με υποθαλαμικό υπογοναδισμό, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της FSH και πτώση της συγκέντρωσης της LH στον ορό, μειώνοντας έτσι το πηλίκο LH:FSH στην κυκλοφορία. Αυτή η παρατήρηση ερμηνεύεται από: α) την αύξηση του εύρους των εκκριτικών ώσεων των γοναδοτροφινών από την υπόφυση λόγω της παρατεινόμενης και αυξημένης σύνθεσής τους στην υπόφυση και από τη μειωμένη συχνότητα έκκρισης τους, με αποτέλεσμα την αύξηση της άμεσης προς έκκριση (πρώτης) δεξαμενής των γοναδοτρόφων κυττάρων (Wildt et al., 1981) και β) από το γεγονός ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της LH είναι μικρότερος από της FSH (47 min έναντι 240 min) οπότε η LH απομακρύνεται νωρίτερα από την κυκλοφορία, ενώ η FSH

συσσωρεύεται στο αίμα κατά τη διάρκεια των μεγαλύτερων μεσοδιαστημάτων των εκκριτικών ώσεων (Veldhuis et al., 1987; Urban et al., 1991).

Όσον αφορά στο εύρος των εκκριτικών ώσεων της GnRH, διάφορες in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι είναι απαραίτητο οι δόσεις της χορηγούμενης GnRH να διακυμαίνονται μεταξύ συγκεκριμένων τιμών ώστε να είναι αποτελεσματική η έκκριση των γοναδοτροφινών, η έκφραση των γονιδίων των υπομονάδων τους και η προς τα άνω ρύθμιση (up-regulation) των υποδοχέων της GnRH (Garcia et al., 1984; Haisenleder et al., 1990; Iliff-Sizemore et al., 1990).

Εκτός από τα παραπάνω έχουν υπάρξει και ηλεκτροφυσιολογικές ενδείξεις της παλμικής λειτουργίας του GnRH “βηματοδότη”. Σε διάφορα πειραματόζωα έχουν καταγραφεί σε ηλεκτρόδια που είχαν τοποθετηθεί στον μέσο βασικό υποθάλαμο απότομες αυξήσεις της ηλεκτρικής δραστηριότητας οι οποίες ήταν ταυτόχρονες με τις ώσεις της LH στην περιφερική κυκλοφορία (Kawakami et al., 1982; Wilson et al., 1984; Mori et al., 1991). Αντιθέτως, επί παρουσίας των ωθηκών όλο το σήμα φαίνεται να είναι περιορισμένο σε αυτή τη φάση της ταχείας αύξησης που έχει μικρή διάρκεια (περίπου 2-3 min) ακολουθούμενο από απότομη πτώση στη βασική γραμμή (O’Byrne et al., 1993). Έχει βρεθεί ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας του σήματος, εφόσον το διάστημα μεταξύ των σημάτων παραμένει σταθερό, με το μέγεθος της ώσης της LH στην περιφέρεια (Williams et al., 1990). Αφετέρου έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η παρατεταμένη ηλεκτρική δραστηριότητα του υποθαλάμου στις περιπτώσεις απουσίας των ωθηκών σχετίζεται με τις εξάψεις και τις άλλες αγγειοκινητικές διαταραχές οι οποίες είναι ταυτόχρονες με τις ώσεις της LH στις μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες (Caspar et al., 1979).

Όπως η GnRH, έτσι και οι γοναδοτροφίνες εκκρίνονται κατά ώσεις και θεωρείται ότι η παλμική (κατά ώσεις) μορφή έκκρισής τους αντικατοπτρίζει την αντίστοιχη της GnRH. Ωστόσο, η μέτρηση των ώσεων της LH χρησιμοποιείται ως μέθοδος εκτίμησης της παλμικής έκκρισης της GnRH καθώς ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής της FSH την αποκλείει από αυτή την εφαρμογή (Reame et al., 1984).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των ώσεων της LH και επομένως κατά προσέγγιση των ώσεων της GnRH (με μεσοδιαστήματα

αιμοληψιών ανά 10 min), όπως μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου (Filicori et al., 1986):

	<b>Εύρος ώσεων LH</b> (mean±SEM)	<b>Συχνότητα ώσεων LH</b> (mean±SEM)
Πρώιμη ωοθυλακική φάση	6.5 ± 0.4 IU/l	1/94 ± 4 min
Μέση ωοθυλακική φάση	5.1 ± 0.8 IU/l	
Όψιμη ωοθυλακική φάση	7.2 ± 1.2 IU/l	1/71 ± 4 min
Πρώιμη ωχρινική φάση	14.9 ± 1.7 IU/l	1/103 ± 8 min
Μέση ωχρινική Φάση	12.2 ± 2 IU/l	
Όψιμη ωχρινική φάση	7.6 ± 1.1 IU/l	1/216 ± 39 min

**Πίνακας 1.** Εύρος και συχνότητα των ώσεων της LH κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου.

Είναι σαφές ότι η κατά ώσεις έκκριση είναι πιο συχνή αλλά με χαμηλότερο εύρος κατά την ωοθυλακική φάση σε σχέση με την ωχρινική, αν και υπάρχει μεγάλη διακύμανση τιμών τόσο στο ίδιο όσο και σε διαφορετικά άτομα (Veldhuis et al., 1986). Ωστόσο οι πιο συχνές αιμοληψίες (κάθε 5 min) είναι καταλληλότερες για την ανίχνευση των αυξημένης συχνότητας ώσεων της LH που συμβαίνουν κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, το χρόνο του μεσοκύκλιου κύματος της LH και μετά την εμμηνόπαυση (Adams et al., 1994, Hall et al., 2000).

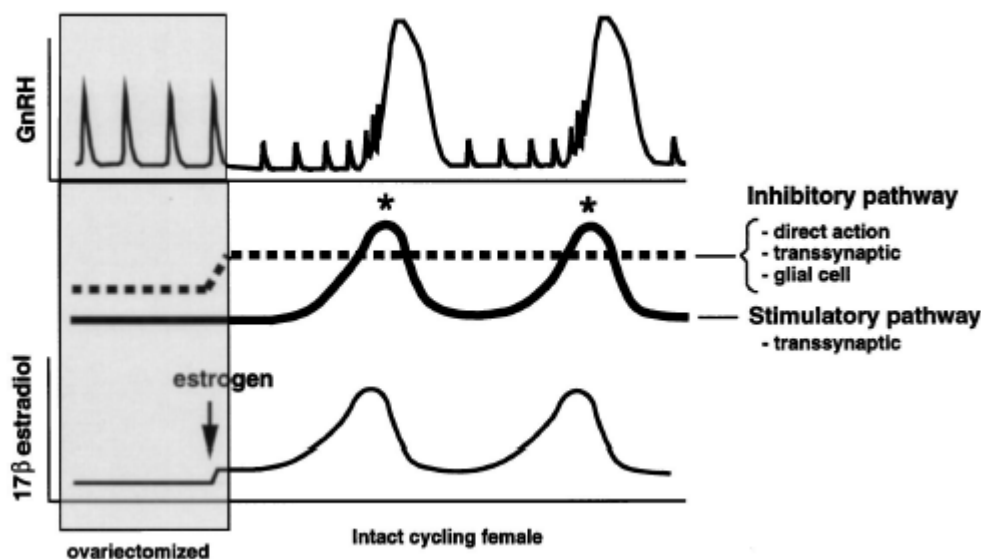
### **Η ρύθμιση της έκκρισης της GnRH**

Η έκκριση της GnRH εξαρτάται από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δεκαπεπτιδίου με άλλες νευροορμόνες, τις γοναδοτροφίνες και τις ορμόνες των ωοθηκών. Ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους γίνεται με μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορύθμισης (feedback), τόσο θετικών (διεγερτικών) όσο και αρνητικών

(ανασταλτικών) οι οποίοι δρουν στη σύνθεση και στην έκκριση της GnRH. Σχηματικά, οι μηχανισμοί αυτοί είναι οι ακόλουθοι: Ο μακρύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης (long feedback loop) που αναφέρεται στην feedback επίδραση των κυκλοφορούντων ορμονών που παράγονται από τους αδένες στόχους και αφορά τόσο στον υποθάλαμο όσο και στην υπόφυση. Ο βραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης (short feedback loop) που υποδηλώνει το αρνητικό feedback των υποφυσιακών ορμονών πάνω στην έκκριση τους, κυρίως μέσω αρνητικών επιδράσεων στην έκκριση της εκλυτικής υποθαλαμικής ορμόνης. Ο υπερβραχύς μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης (ultrashort feedback) που αναφέρεται στην αναστολή της σύνθεσης της GnRH από αυτή την ίδια.

Στο παρελθόν, διάφορες ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι είχαν αποτύχει να ανιχνεύσουν υποδοχείς **οιστρογόνων** (ER) στους νευρώνες GnRH σε διάφορα είδη (Watson et al., 1992; Herbison et al., 1993; Sullivan et al., 1995) καθώς επίσης και in vivo μελέτες της συσσώρευσης ραδιοσημασμένης E2 από αυτούς τους νευρώνες (Shivers et al., 1983) με αποτέλεσμα να πιθανολογείται ότι η δράση των οιστρογόνων στον υποθάλαμο ασκείται έμμεσα. Ωστόσο, έχουν υπάρξει και μελέτες που αναφέρουν χαμηλά επίπεδα ER αγγελιοφόρου RNA (mRNA) και σύνδεσης της E2 σε δύο διαφορετικές αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές GnRH (Radovick et al., 1994; Poletti et al., 1994; Rage et al., 1997; Shen et al., 1998) και ο προωθητής (promotor) του γονιδίου της GnRH έχει δειχθεί ότι περιέχει λειτουργικά τμήματα που απαντούν στα οιστρογόνα (functional estrogen response elements) (Radovick et al., 1994; Klungland et al., 1993). Πιο πρόσφατα, έχει δειχτεί σε φυσικούς GnRH νευρώνες του θήλεος επίμυος η ύπαρξη και η κυκλική έκφραση mRNA τόσο για τους ER- $\alpha$  όσο και για τους ER- $\beta$  (Skynner et al., 1999). Αφ' ετέρου η χορήγηση οιστρογόνων προκάλεσε μείωση των επιπέδων GnRH mRNA στην κυτταρική σειρά GT1-7, η οποία, όπως δείχθηκε με τη χρήση αγωνιστών και ανταγωνιστών των ER, ήταν εξαρτώμενη από τους ER (ER- $\alpha$  και ER- $\beta$ ) (Roy et al., 1999). Στην ίδια κυτταρική σειρά, η χορήγηση οιστρογόνων μείωσε το ποσοστό των GnRH νευρώνων που ήταν θετικοί για την ύπαρξη ER- $\beta$  (Kallo et al., 2001). Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση της άμεσης επίδρασης των οιστρογόνων στους GnRH

νευρώνες του υποθαλάμου. Εκτός αυτών, υπάρχουν και ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ασκούν ταχεία μη γονιδιακή δράση σε διάφορους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Schumacher, 1990; McEwen, 1991). Τέτοιου τύπου δράση (άμεση υπερπολωτική) έχει δειχτεί και στους GnRH νευρώνες ωθηκεκτομηθέντων χοίρων (Lagrange et al., 1995). Από όλα τα παραπάνω είναι σαφές ότι η δράση των οιστρογόνων στους GnRH νευρώνες μπορεί να ασκείται άμεσα αλλά και έμμεσα. Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ένα μοντέλο ανεξάρτητων οδών οι οποίες μεσολαβούν για την εκδήλωση των ανασταλτικών και διεγερτικών επιδράσεων των οιστρογόνων στο GnRH νευρωνικό δίκτυο.



**Σχήμα 1.** Η ανασταλτική οδός (το καθαρό ποσό της δραστηριότητας της απεικονίζεται με τη διακεκομμένη γραμμή) που περιλαμβάνει άμεσες οιστρογονικές μη γονιδιακές διασυναπτικές επιδράσεις και διασυνδέσεις μεταξύ των γλοιακών κυττάρων χρησιμοποιούμενες από τα οιστρογόνα για να ασκούν ένα περιορισμένο επίπεδο έκκρισης της GnRH σε σύγκριση με τα ωθηκεκτομηθέντα πειραματόζωα (αριστερό τμήμα της διακεκομμένης γραμμής). Η διεγερτική οδός (το καθαρό ποσό της δραστηριότητας της απεικονίζεται με τη συνεχή γραμμή) που περιλαμβάνει τις κλασσικές γονιδιακές επιδράσεις των οιστρογόνων στους GnRH νευρώνες που εκφράζουν ERs και η οποία καθορίζεται από τα κυμαινόμενα επίπεδα των οιστρογόνων (κάτω γραμμή). Η διεγερτική οδός επιβάλλει την επίδραση της σε αυτή της ανασταλτικής οδού, έτσι ώστε για μια σύντομη περίοδο σε κάθε κύκλο (\*), ένα τελικό καθαρό ποσό διεγερτικής επίδρασης να προκαλεί το κύμα της GnRH (Herbison, 1998).

Η προγεστερόνη είναι γνωστό ότι ασκεί ανασταλτικές και διεγερτικές επιδράσεις στην έκκριση των γοναδοτροφινών στον άνθρωπο, οι οποίες

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

## ΟΙ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΕΣ

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

### Οι δεξαμενές αποθήκευσης των γοναδοτροφινών

Η επίδραση της GnRH στα γοναδοτρόφα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση των εκκριτικών κοκκίων στην περιφέρεια του κυττάρου και ακολούθως την εξωκυττάρωση. Αρκετές μελέτες τόσο σε πειραματόζωα (Pickering and Fink, 1979; Blake, 1978) όσο και στον άνθρωπο (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976), έδειξαν ότι η χορήγηση της GnRH για αρκετές ώρες προκαλεί ένα διφασικό χρονικά τύπο έκκρισης των γοναδοτροφινών. Η αρχική

εκκριτική αιχμή στα 30 min ακολουθείται από μία πτώση ή plateau μεταξύ των 45 και 90 min και αργότερα μία παρατεταμένη αύξηση της έκκρισης στα 220 με 240 min. Από αυτές τις αρχικές μελέτες προέκυψε η θεωρία της ύπαρξης δύο λειτουργικών δεξαμενών των γοναδοτρόφων. Έχει θεωρηθεί λοιπόν ότι η πρώτη φάση έκκρισης αντιπροσωπεύει μία άμεσα διαθέσιμη μορφή της LH, η οποία μπορεί να εκκριθεί άμεσα κατά τη διέγερση με την GnRH (και αντιπροσωπεύει την ευαισθησία του γοναδοτρόφου στη GnRH) και ότι η δεύτερη φάση αντιπροσωπεύει μία μορφή αποθήκευσης της LH, η οποία απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία πριν γίνει προσιτή για έκκριση. Το φαινόμενο αυτό της αυξημένης δεύτερης απάντησης της LH στη GnRH σε σύγκριση με την πρώτη, ονομάζεται αυτοπριμοδότηση της GnRH (GnRH self-priming) και αντιπροσωπεύει τη μετατροπή της λειτουργικά εφεδρικής δεξαμενής των γοναδοτροφινών (second-reserve pool) στη λειτουργικά άμεσα εκκρινόμενη δεξαμενή (first-releasable pool). Κλινικά το φαινόμενο αυτό μπορεί να ανιχνευθεί, μετά τη χορήγηση πολλαπλών ώσεων GnRH, ως μία ενισχυμένη απάντηση της LH στη δεύτερη ώση της GnRH που χορηγείται 2 ώρες μετά την πρώτη ώση (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976). Αφ' ετέρου και οι in vitro μελέτες συγκλίνουν με τις κλινικές μελέτες καθώς δείχνουν ότι η έκκριση της LH σε παρατεταμένη έκθεση στη GnRH είναι διφασική (Evans et al., 1983; Loughlin et al., 1984).

## **Η ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ**

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

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

Η μελέτη των ώσεων των γοναδοτροφινών δεν είναι απλή και τα αποτελέσματα των διαφόρων βιομαθηματικών τεχνικών ανίχνευσης των ώσεων



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

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

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

Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιούσαν τη συμβατική μέθοδο ανίχνευσης των ώσεων (McIntosh and McIntosh, 1985), ο αριθμός των εκκριτικών ώσεων της LH βρέθηκε να είναι ο μέγιστος κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση, ο ελάχιστος κατά τη μέση ωχρινική φάση και ενδιάμεσος κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου. Επίσης η διάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου μεταβάλλονταν μέσα στο γεννητικό κύκλο, με τα πιο σύντομα επεισόδια να συμβαίνουν κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση και τα πιο παρατεταμένα κατά τη μέση ωχρινική φάση, ενώ ενδιάμεσης διάρκειας επεισόδια παρατηρούνταν κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Η συνολική έκκριση 24ωρου της LH δεν μεταβάλλονταν σημαντικά μέσα στον κύκλο, αλλά ήταν μάλλον σταθερή. Επιπρόσθετα, η έκκριση της LH ερμηνεύονταν με την ύπαρξη των εκκριτικών επεισοδίων, χωρίς να είναι απαραίτητη η τονική έκκριση σημαντικής ποσότητας της εκτός των επεισοδίων αυτών (McIntosh and McIntosh, 1985; Sollenberger et al., 1990a) και επίσης διαπιστώθηκε μια τάση, αν και όχι σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό, για κυκλοφορία στο αίμα ισομορφών γοναδοτροφινών με μικρότερο χρόνο ημιζωής κατά τη μέση ωχρινική φάση του γεννητικού κύκλου. Μία άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν η ύπαρξη κατά την ωχρινική φάση δύο πιθανά διαφορετικών ειδών εκκριτικών ώσεων της LH, δηλαδή ενός ποσοστού 30% με υψηλό εύρος και ενός 70% με χαμηλό εύρος έκκρισης. Εάν το κατά πόσον αυτές οι μικρές εκκριτικές ώσεις, έχουν κάποια βιολογική δράση στο επίπεδο των ωοθηκών, είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Μία άλλη μελέτη (deconvolution analysis) (Genazzani et al., 1990), που όμως απαιτούσε στο σχεδιασμό της ως σταθερή παράμετρο την από πριν γνώση του χρόνου ημιζωής της ορμόνης, αφ' ενός έδειξε ότι περισσότερα εκκριτικά επεισόδια συμβαίνουν στην πρώιμη ωοθυλακική σε σχέση με την ωχρινική φάση, αφ' ετέρου δε, σε ασυμφωνία με τη μελέτη των Sollenberger και συν. (1990a), έδειξε ότι η διάρκεια των επεισοδίων αυτών δεν μεταβάλλονταν μέσα στον κύκλο. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών των ώσεων των γοναδοτροφινών εξαρτώνται και από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση τους.

Ως γνωστό οι συγκεντρώσεις της LH όπως μετρούνται με τις ανοσολογικές μεθόδους δεν είναι πάντοτε ανάλογες με αυτές που προκύπτουν

από τη μέτρηση της βιολογικά δραστικής ορμόνης. Όταν λοιπόν γίνεται παράλληλη εκτίμηση και με τις δύο μεθόδους των συγκεντρώσεων της, το πηλίκο B/I (bioassay-to-immunoassay ratio, B/I ratio) είναι υψηλότερο στον ορό μετά την εμμηνόπαυση σε σχέση με την πρόιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου (Dufau and Veldhuis, 1987). Με διάφορες τεχνικές ανίχνευσης των ώσεων, η συχνότητα των ώσεων της *in vitro* βιολογικά δραστικής LH φάνηκε ότι ήταν μεγαλύτερη στην όψιμη ωοθυλακική, ελάχιστη στην ωχρινική και ενδιάμεση στην πρόιμη ωοθυλακική φάση του γεννητικού κύκλου (Veldhuis et al., 1984). Επομένως, υπάρχει συμφωνία ως προς τα χαρακτηριστικά της παλμικής έκκρισης της LH κατά το γεννητικό κύκλο, είτε αυτή μετράται με ανοσολογική είτε με βιολογική μέθοδο. Ακόμη, με τις βιολογικές μεθόδους μέτρησης όπως έχει φανεί και με τις ανοσολογικές, ο χρόνος ημιζωής της ορμόνης που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν της ορμόνης που εκκρίνεται κατά τις ωοθυλακικές φάσεις.

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

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

Από τέτοιες αρχικές μελέτες προέκυψαν οι παρατηρήσεις ότι ανεξάρτητα από τη χορήγηση της GnRH με σταθερό ή κατά ώσεις τρόπο, η ποσότητα της LH που εκκρίνονταν εξαρτιόνταν ουσιαστικά από τη φάση του κύκλου στην οποία γίνονταν η εξωγενής χορήγηση (Wang et al., 1976; Hoff et al., 1977). Ως γνωστό, έχει θεωρηθεί ότι η αρχική, στα 30 min και η επακόλουθη απάντηση (δηλαδή η ποσότητα της ορμόνης που εκκρίνεται σε απάντηση σε επακόλουθες διεγέρσεις ή σε συνεχή έγχυση της GnRH) των γοναδοτρόφων στη GnRH αντιπροσωπεύουν

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

Όσον αφορά στο φαινόμενο της αυτοπριμοδότησης της GnRH (GnRH self-priming effect), φαίνεται ότι είναι εξαρτώμενο από τις ωοθηκικές ορμόνες, καθώς παρατηρείται πιο έντονα κατά την όψιμη ωοθυλακική και την ωχρινική φάση του κύκλου (Hoff et al., 1977). Έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι ο εξαρτώμενος από τις ωοθηκικές ορμόνες μηχανισμός, που μεσολαβεί στην εκδήλωση του φαινομένου αυτού, θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για την αυξημένη ευαισθησία των γοναδοτρόφων στην GnRH πριν την ωοθυλακιορρηξία (Hoff et al., 1977; Pickering and Fink., 1979).

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

Η μικρή δόση (submaximal dose) της GnRH, διεγείρει εκκριτικά επεισόδια μεγαλύτερης ποσότητας (mIU/ml) της LH κατά την όψιμη ωοθυλακική και την ωχρινική, σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου. Αυτές οι

αυξημένες εκκριτικές ποσότητες προέρχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς, καθώς κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση η ημιδιάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της πρώιμης ωοθυλακικής, ή της μέσης ωχρινικής φάσης και το εύρος του εκκριτικού επεισοδίου είναι μεγαλύτερο στη μέση ωχρινική σε σχέση με την πρώιμη ωοθυλακική φάση. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ευαισθησία των γοναδοτρόφων μεταβάλλεται τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά από το γοναδικό ορμονικό περιβάλλον. Όσον αφορά στην αυτοπριμοδότηση της GnRH, η απάντηση στη δεύτερη ώση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή στην αρχική ώση σε όλες τις φάσεις του κύκλου, αν και η σχετική αύξηση είναι σημαντικά μεγαλύτερη κατά την όψιμη ωοθυλακική και τη μέση ωχρινική φάση. Έτσι το εύρος της έκκρισης της LH σε απάντηση στη δεύτερη δόση της GnRH είναι αυξημένο σε κάθε φάση του κύκλου, ενώ η ημιδιάρκεια του εκκριτικού επεισοδίου παραμένει σχετικά ανεπηρέαστη. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η κυτταρική βάση του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης μπορεί να περιλαμβάνει την ενίσχυση του ρυθμού εκκένωσης της LH από το γοναδοτρόφο παρά την επίδραση σε κυτταρικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη διάρκεια της εξωκυττάρωσης.

Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού καταμήνιου κύκλου το μοντέλο των μεταβολών στα επίπεδα της FSH και της LH μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν από τις μεταβολές στα κυκλοφορούντα στεροειδή (Ross et al., 1970; Messinis and Templeton 1988a; Rossef et al., 1989). Αν και η E2 στην ωοθυλακική φάση και η προγεστερόνη στην ωχρινική φάση κυριαρχούν αντίστοιχα, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η όλη πορεία δεν είναι τόσο απλοποιημένη. Πρώτον, η προγεστερόνη υπάρχει στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης έστω σε χαμηλά επίπεδα και δεύτερον εκκρίνονται από τις ωοθήκες μη στεροειδικές ουσίες όπως οι ινχιπίνες A και B, οι ακτιβίνες A, B και AB, η φολλιστατίνη και ο GnSAF.

## Η ωοθυλακική φάση

Η ωοθυλακική φάση του κύκλου, που ξεκινά με το πέρας της εμμηνορρυσίας και τελειώνει με την ωορρηξία, διαιρείται σε αρχόμενη, μέση και όψιμη για την καλύτερη κατανόηση των φαινομένων που συμβαίνουν κατά τη διάρκειά της. Στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, με την επίδραση της FSH, παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα μικρά ωοθυλάκια που ωριμάζουν ο GnSAF και σε μικρότερες ποσότητες αναλογικά η E2 και η ινχιμπίνη B. Έτσι με την υπερίσχυση της δράσης του GnSAF έναντι της E2, η LH παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Στη μέση ωοθυλακική φάση, η ινχιμπίνη B που παράγεται κι αυτή από τα μικρά ωοθυλάκια, αλλά χρονικά η αύξησή της έπεται του GnSAF, αυξάνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων της FSH. Από αυτή την πτώση των επιπέδων της FSH επιβιώνει μόνο το πρωτεύον ωοθυλάκιο - υποστηρίζεται η λειτουργία του από τις μικρές έστω ποσότητες LH (Sullivan et al., 1999)- που συνεχίζει να παράγει ολοένα αυξανόμενες ποσότητες E2, ενώ τα άλλα οδηγούνται σε ατρησία με αποτέλεσμα την πτώση των επιπέδων του GnSAF και της ινχιμπίνης B. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επικράτηση της ευοδοτικής δράσης της E2, έναντι της ανασταλτικής του GnSAF, στην έκκριση της LH. Αυξάνονται έτσι τα επίπεδα της LH, ενώ τα επίπεδα της FSH εξακολουθούν να παραμένουν χαμηλά κυρίως λόγω της παραγωγής ινχιμπίνης A από το ώριμο ωοθυλάκιο με την επίδραση της LH (Welt et al., 2001).

## Ο ρόλος των ωοθηκικών στεροειδών

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι να ερευνηθεί αναλυτικά κανείς τη δράση των ωοθηκικών στεροειδών στην έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες: Χορηγώντας εξωγενώς στεροειδή, χορηγώντας εκλεκτικούς δεσμευτές (blockers) των οιστρογονικών υποδοχέων ή αναστολείς της αρωματάσης, εξαλείφοντας τις ενδογενείς ορμόνες με ωοθηκεκτομή ή αυξάνοντας τη δράση των οιστρογόνων με ωοθηκική διέγερση. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των εξωγενών οιστρογόνων να καταστέλλουν τα επίπεδα της FSH και της LH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Tsai and Yen, 1971; Monroe et

al.,1972a; Young and Jaffe, 1976; Messinis and Templeton, 1990). Είχε υποθεθεί ότι οι δυο γοναδοτροφίνες είναι εξίσου ευαίσθητες στις κατασταλτικές δράσεις της E2 (Messinis and Templeton, 1990). Όμως πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η έκκριση της FSH και της LH ελέγχονται διαφορετικά από τις ωοθήκες (Dafopoulos et al., 2004a). Σε μια σειρά πειραμάτων, στα οποία δύο προσομοιωμένες ωοθυλακικές φάσεις και μία προσομοιωμένη ωχρινική φάση ανάμεσά τους, δημιουργήθηκαν τεχνητά με τη χορήγηση εξωγενώς οιστρογόνων και προγεστερόνης σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τα αυξημένα επίπεδα της FSH και της LH ελαττώθηκαν δραματικά καθώς οι τιμές της E2 και της προγεστερόνης αυξήθηκαν. Κατά το τέλος της προσομοιωμένης ωχρινικής φάσης, τα επίπεδα της LH είχαν κατασταλεί στα φυσιολογικά προεμμηνοπαυσιακά επίπεδα, ενώ τα επίπεδα της FSH παρέμεναν υψηλότερα από εκείνα στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης ενός φυσιολογικού κύκλου (Dafopoulos et al., 2004a). Αυτό σημαίνει ότι η E2 και η προγεστερόνη μόνο μερικά επιδρούν στην έκκριση της FSH και άλλες μη στεροειδικές ωοθηκικές ουσίες, ήδη γνωστές, μπορεί να είναι σημαντικές στη ρύθμιση της FSH. Στην ίδια μελέτη ωστόσο, κατά τη διάρκεια της δεύτερης προσομοιωμένης ωοθυλακικής φάσης, τα ήδη ελαττωμένα επίπεδα της FSH διατηρούνται σταθερά ενώ αυτά της LH αυξάνουν πολύ παρά τις αυξημένες συγκεντρώσεις της E2 (Dafopoulos et al., 2004a). Αυτό δείχνει ότι η E2 ρυθμίζει διαφορετικά την έκκριση της FSH και της LH στις γυναίκες.

Η αδυναμία των επιπέδων της E2 της ωοθυλακικής φάσης να διατηρήσουν χαμηλά επίπεδα LH, στους προσομοιωμένους κύκλους σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μη λειτουργικές ωοθήκες, σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ωοθυλακικής φάσης αυτό το στεροειδές δεν είναι ο μόνος μεσολαβητής για την ωοθηκική αρνητική παλλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback) στην έκκριση της LH. Είναι πιθανόν και η ενδογενής προγεστερόνη να συνεισφέρει στην αρνητική παλλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback) της ωοθήκης στην LH επειδή στα παραπάνω περιγραφέντα πειράματα οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι χαμηλότερες από εκείνες στη φυσιολογική ωοθυλακική φάση (Dafopoulos et al., 2004a). Επιπλέον, η θεραπεία φυσιολογικών γυναικών με το

αντιπρογεσταγόνο mifepristone, κατά τη διάρκεια της αρχόμενης και μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση των βασικών επιπέδων της LH (Kazem et al., 1996). Δεν υπάρχουν άλλες μελέτες που να ερευνήσαν ιδιαίτερα την ικανότητα της προγεστερόνης, σε συγκεντρώσεις βέβαια που φυσιολογικά παρατηρούνται κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, να ελέγξει την έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες. Σε μία μελέτη, η εξωγενής χορήγηση αυτού του στεροειδούς σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) οδήγησε σε σημαντική μείωση των ήδη αυξημένων επιπέδων της LH, αλλά είχαν επιτευχθεί επίπεδα προγεστερόνης της ωχρινικής φάσης (Buckler et al., 1992).

Η προγεστερόνη φυσιολογικά παράγεται από τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα και τα ωχρά κύτταρα. Αν και η πηγή της παραγωγής της κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου δεν έχει αποσαφηνιστεί, μία μελέτη έχει προτείνει τα επινεφρίδια (Judd et al., 1992). Όμως πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι μετά από ωοθηκεκτομία που γίνεται στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό πέφτουν σχεδόν σε μη μετρήσιμα επίπεδα (Alexandris et al., 1997). Αυτό σημαίνει ότι η ωοθήκη παράγει προγεστερόνη ακόμα και στην ωοθυλακική φάση του κύκλου. Το γεγονός ότι σ' αυτή τη μελέτη (Alexandris et al., 1997), όπως και σε προηγούμενες (Wallach et al., 1970, Yen and Tsai, 1971a, Monroe et al., 1972b, Daw, 1974, Chakravarti et al., 1977, Muttukrishna et al., 2002), τα επίπεδα της E2 στον ορό ελαττώνονται, ενώ τα επίπεδα της FSH και LH αυξάνουν δραματικά μετά την ωοθηκεκτομή, παρέχουν αποδείξεις ότι τα ενδογενή ωοθηκικά στεροειδή είναι σημαντικά για τον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροφινών.

Η ωοθηκική διέγερση για IVF είναι ένας εναλλακτικός τρόπος για να μελετηθεί ο ρόλος των ενδογενών οιστρογόνων στην έκκριση των γοναδοτροφινών. Έχει δειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της εισαγωγής σε πολλαπλή ωοθυλακική ανάπτυξη με τη χρήση της FSH συμβαίνει μια ταχεία ελάττωση στις συγκεντρώσεις της βασικής LH ενώ οι συγκεντρώσεις της E2 αυξάνουν σε υπερφυσικά επίπεδα (Messinis and Templeton, 1987a; Messinis et al., 1998). Τουλάχιστον δύο μελέτες έχουν προτείνει ότι η άνοδος της E2 είναι αυτή που καταστέλλει τα επίπεδα της LH σ' αυτή την περίπτωση. Σε μία απ' αυτές



(Messinis et al., 1994) μία μόνο δόση 450 IU FSH που ενίεται σε φυσιολογικές γυναίκες στη δεύτερη μέρα του κύκλου είχε ως αποτέλεσμα μια παροδική αλλά σημαντική αύξηση στις τιμές της E2 στον ορό και μια ταυτόχρονη καταστολή των βασικών τιμών της LH.

Στη δεύτερη μελέτη (Messinis and Templeton, 1989) γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, θεραπεύτηκαν για έναν κύκλο με κιτρινή κλομιφένη (clomiphene citrate) και σ' έναν άλλο κύκλο με ημερήσιες ενέσεις FSH. Και στους δύο κύκλους, οι συγκεντρώσεις της E2 στον ορό αυξήθηκαν σε υπερφυσικά επίπεδα, αλλά τα επίπεδα της LH κατεστάλησαν μόνο στους κύκλους με θεραπεία με FSH ενώ αντίθετα στους κύκλους με την κλομιφένη αυξήθηκαν σημαντικά. Αυτές οι δύο μελέτες μας παρέχουν την απόδειξη ότι ο κατασταλτικός παράγοντας των επιπέδων της LH κατά τη διάρκεια της θεραπείας με FSH είναι η ενδογενής E2 η οποία στην περίπτωση της κλομιφένης ήταν αδύνατον να δράσει εξαιτίας της δέσμευσης των υποδοχέων των οιστρογόνων. Ο τόπος της δράσης των οιστρογόνων είναι αρχικά η υπόφυση· όμως μια δράση στον υποθάλαμο δεν μπορεί να αποκλειστεί (Nakai *et al.*, 1978; Plant *et al.*, 1978; Kelner and Peck, 1984; Richardson *et al.*, 1992).

Αν και η E2 παίζει έναν κυρίαρχο ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, αυτό δεν έχει γίνει ακόμη παγκοσμίως αποδεκτό. Ένας από τους λόγους είναι πιθανόν το γεγονός, ότι παρά την αυξημένη FSH σε φυσιολογικές γυναίκες προς το τέλος της αναπαραγωγικής τους ζωής τα κυκλοφορούντα επίπεδα E2 παραμένουν σε φυσιολογικά επίπεδα (Lee *et al.*, 1988). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ενώ οι τιμές της E2 στον ορό στις μέρες 3-5 του κύκλου φυσιολογικών γυναικών ηλικίας 40-50 ετών με εμμηνορυσία σχετίζονται αρνητικά με την FSH, η ινχιμπίνη Β είναι ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης των τιμών της FSH (Burger *et al.*, 2000).

### **Ο ρόλος των μη στεροειδικών ωοθηκικών ορμονών**

Μαζί με τα στεροειδή οι ωοθήκες παράγουν μη στεροειδικές ουσίες, όπως οι ινχιμπίνες (Bicsak *et al.*, 1986; Roberts *et al.*, 1993). Αυτές οι πρωτεΐνες εξ

ορισμού καταστέλλουν μόνο τη βασική έκκριση της FSH από την υπόφυση. Αν και *in vitro* δεδομένα έχουν δείξει ότι κάτω από ειδικές συνθήκες και η έκκριση της LH μπορεί επίσης να επηρεαστεί (Farnworth *et al.*, 1988). Αυτή η ορμόνη είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη στην αναστολή από την FSH (Attardi *et al.*, 1991). Έχει προταθεί ότι κατά τη διάρκεια της πορείας επιλογής ωοθυλακίου το ωοθυλάκιο που έχει προοριστεί να γίνει κυρίαρχο παράγει ινχιμίνη Β (de Kretser *et al.*, 2002), τα επίπεδα της οποίας είναι υψηλά στην αρχόμενη και μέση ωοθυλακική φάση και πολύ χαμηλά στην όψιμη ωοθυλακική και στην ωχρινική φάση (Groome *et al.*, 1996). Αντίθετα, τα επίπεδα της ινχιμίνης Α είναι χαμηλά στην ωοθυλακική φάση και αυξάνουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης δείχνοντας ότι αυτή η ουσία παράγεται κυρίως από το ωχρό σωματίο (Groome *et al.*, 1996).

Για το ρόλο των ινχιμινών στην έκκριση των γοναδοτροφινών υπάρχουν πολύ λίγες αποδείξεις στους ανθρώπους και μόνο δεδομένα από πειραματόζωα έχουν αποδείξει ότι αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν στον έλεγχο της FSH *in vivo*. Ιδιαίτερα, ανοσοεξουδετέρωση της ινχιμίνης με ένεση αντισωμάτων σε επίμυες οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της FSH (Rivier *et al.*, 1986). Επίσης, χορήγηση αντιορού για την ινχιμίνη σε επίμυες αύξησε το FSH- $\beta$  mRNA χωρίς να επιδράσει στο LH- $\beta$  (Attardi *et al.*, 1992; Kishi *et al.*, 1996). Επιπλέον, η χορήγηση ανασυνδυασμένης ινχιμίνης Α σε επίμυες μπλοκάρισε το κύμα της FSH και ελάττωσε τα επίπεδα της FSH του πλάσματος (Rivier *et al.*, 1991; Tilbrook *et al.*, 1993). Τέλος, σε rhesus πιθήκους η ινχιμίνη Α που δόθηκε κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση μείωσε πολύ γρήγορα τα επίπεδα της κυκλοφορούσης FSH (Stouffer *et al.*, 1994; Molskness *et al.*, 1996).

Στοιχεία από ανθρώπους, μόνο έμμεσα, δείχνουν ότι η ινχιμίνη συμμετέχει στον έλεγχο της έκκρισης της FSH. Σε μία μελέτη, στην οποία χορηγήθηκε σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας κλομιφένη για 15 ημέρες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, τα επίπεδα της LH αυξάνονταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ενώ αυτά της FSH μετά από μια αρχική αύξηση, ελαττώθηκαν στα επίπεδα προ της θεραπείας (Messinis and Templeton, 1988b). Καθώς η κλομιφένη είναι ένα αντιοιστρογονικό συστατικό, έχει προταθεί ότι για τον έλεγχο της έκκρισης της FSH μη οιστρογονικοί μηχανισμοί είναι

επίσης σημαντικοί, υποστηρίζοντας την υπόθεση της συμμετοχής της ινχιμπίνης. Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα αυξημένα επίπεδα της FSH ελαττώνονται κατά τη διάρκεια θεραπείας με οιστρογόνα αλλά ποτέ δεν ξαναγυρνούν στα προεμμηνοπαυσιακά επίπεδα δείχνοντας ότι η ινχιμπίνη λείπει σ' αυτές τις γυναίκες (Lind *et al.*, 1978; Dafopoulos *et al.*, 2004).

Πρόσφατες μελέτες που έγιναν σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με κανονικούς κύκλους, έδειξαν μια σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις της ινχιμπίνης, της E2 και της προγεστερόνης μετά από ωθηκεκτομία (Alexandris *et al.*, 1997; Muttukrishna *et al.*, 2002). Όταν η ωθηκεκτομία εκτελούνταν στην ωοθυλακική φάση του κύκλου, τα επίπεδα και των δύο ινχιμπινών A και B ελαττώνονταν σημαντικά, αλλά όταν εκτελούνταν στην ωχρινική φάση τότε μόνο τα επίπεδα της ινχιμπίνης A ελαττώνονταν (Muttukrishna *et al.*, 2002). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η ινχιμπίνη B παράγεται κυρίως κατά την ωοθυλακική φάση και η ινχιμπίνη A κατά την ωχρινική, αλλά δεν ξεκαθαρίζουν τη σχέση ανάμεσα σε αυτές τις δύο ορμόνες και την FSH. Όταν μεγαλύτερες, περιεμμηνοπαυσιακές, με κανονικούς κύκλους γυναίκες, με ανεβασμένα τα επίπεδα της FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, συγκρίνονται με άλλες νεώτερες με φυσιολογικά επίπεδα FSH, βρέθηκε ότι οι μεγαλύτερες γυναίκες είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ινχιμπίνης B, αλλά παρόμοιες ινχιμπίνης A (Klein *et al.*, 1996; Burger *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2004). Επιπλέον σε γυναίκες με επικείμενη πρόιμη ωοθηκική έκπτωση, αλλά με ωορρηκτικούς κύκλους, τα σταθερά ανεβασμένα επίπεδα της FSH συνοδεύονται από ελαττωμένα επίπεδα ινχιμπίνης A και B (Welt *et al.*, 2005a). Είναι πιθανόν από αυτά τα δεδομένα οι ινχιμπίνες να παίζουν ένα ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης της FSH, μέσω της ωοθηκικής αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback). Πάντως η ινχιμπίνη B είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου.

Ο ρόλος των άλλων ωοθηκικών, μη στεροειδών ουσιών όπως η ακτιβίνη και η φολιστατίνη, είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Η ακτιβίνη είναι ένα διμερές παράγωγο της β υπομομάδας της ινχιμπίνης και υπάρχει σε 3 μορφές A, B, και AB (Muttukrishna *et al.*, 2004). Πειραματικά δεδομένα από ζώα έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη διεγείρει την έκκριση της FSH από καλλιέργειες υποφυσιακών κυττάρων (Ling *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1986) όπως και *in vivo* (McLachlan *et al.*, 1989;

Rivier and Vale, 1991; Stouffer et al., 1993) και γι αυτό η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει θέση στο μηχανισμό της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback). Σε γυναίκες, εξαιτίας μεθοδολογικών δυσκολιών, έχει μετρηθεί στο αίμα κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου, μόνο η ακτιβίνη A και τα αποτελέσματα έδειξαν αυξομειώσεις, με υψηλότερα επίπεδα κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση, στο μέσον του κύκλου και στην όψιμη ωχρινική φάση (Muttukrishna et al., 1996). Η σημασία αυτών των μεταβολών δεν είναι σαφής, αν και η ακτιβίνη A μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της FSH σε αυτές τις ιδιαίτερες περιόδους.

Η φολιστατίνη είχε αρχικά υποθεθεί ότι είναι ένας αγωνιστής της ινχιπίνης (Robertson et al., 1987; Ueno et al., 1987), αλλά ακολούθως βρέθηκε ότι είναι μία δεσμευτική για την ακτιβίνη πρωτεΐνη που δεν έχει άλλους ειδικούς βιολογικούς ρόλους (Nakamura et al., 1990). Η περισσότερη κυκλοφορούσα φολιστατίνη σε γυναίκες με κύκλο, είναι δεσμευμένη με την ακτιβίνη (McConnell et al., 1998). Δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν όμως, ότι η φολιστατίνη ασκεί δράσεις στην έκκριση της FSH in vivo. Ιδιαίτερα, η χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης φολιστατίνης-288 σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμεις, ελάττωσε την έκκριση της FSH, αλλά όχι της LH (Tilbrook et al., 1995). Επίσης μία μελέτη σε θήλαα πρόβατα, έδειξε ότι το ίδιο ανασυνδυασμένο προϊόν προκάλεσε καταστολή των επιπέδων της FSH στην περιφερική κυκλοφορία, χωρίς να επιδράσει στη βασική έκκριση της GnRH, ούτε στη συχνότητα και το εύρος των παλμών της GnRH. Ο μηχανισμός αυτής της δράσης δεν είναι αποσαφηνισμένος, αλλά μπορεί να σχετίζεται με τη βιοδιαθεσιμότητα της ακτιβίνης (Padmanabhan et al., 2002). Τα περισσότερα δεδομένα και πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης της ινχιπίνης πέρχονται από μελέτες σε ζώα. Έχει προταθεί ότι στο πλαίσιο της αρνητικής παλλίνδρομης δράσης (negative feedback) η ινχιπίνη δρά απευθείας στην υπόφυση, χωρίς να επιδρά στην έκκριση της GnRH, αν και μπορεί να ελαττώνει την έκκριση της FSH από την GnRH (de Kretser et al., 2002). Όμως η ύπαρξη υπομονάδων ινχιπίνης/ακτιβίνης και φολιστατίνης στα κύτταρα της υπόφυσης δείχνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να ασκούν επίσης τοπικές δράσεις (Mather et al., 1992; Bilezikjian et al., 1993; Farnworth et al., 1995). Ειδικότερα η ακτιβίνη A έχει βρεθεί να εκκρίνεται από τα

κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης σε καλλιέργειες κυττάρων επίμυων (Liu et al., 1996a), αν και η ακτιβίνη B είναι το κύριο περιεχόμενο αυτών των κυττάρων (Bilezikjian et al., 1994). Είναι πιθανόν γι αυτό η δράση αυτών των πρωτεϊνών στην έκκριση της FSH να ασκείται αυτοκρινικά/παρακρινικά (Corrigan et al., 1991). Η φολιστατίνη επίσης εκκρίνεται από τα υποφυσιακά κύτταρα των επίμυων (Liu et al., 1996b) και γι αυτό η ανασταλτική της δράση στην έκκριση της FSH μπορεί να γίνεται μέσω της εξουδετέρωσης της υποφυσιακής ακτιβίνης (Ling et al., 1986; Vale et al., 1986; Muttukrishna and Knoght, 1991).

Ο ρόλος μιάς άλλης μη στεροειδικής ουσίας που ονομάζεται αντιμυλλεριανική ορμόνη (AMH) είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Στις γυναίκες, η (AMH) εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων, από το πρωτογενές στο στάδιο του άντρου μέχρι το μέγεθος των 4-6 mm (Weenen et al., 2004). Αν και φάνηκε ότι τα επίπεδα στον ορό της (AMH) στην 3<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου των φυσιολογικών γυναικών ελαττώνονται προϋούσης της ηλικίας (de Vet et al., 2002) και δείχνουν μια αρνητική συσχέτιση με την FSH (van Rooij et al., 2002), ο ρόλος της στο ωοθηκικό σύστημα αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης δεν έχει ξεκαθαριστεί.

### **Η ωχρινική φάση**

Η ωχρινική φάση του κύκλου ξεκινά με το σχηματισμό του ωχρού σωματίου αμέσως μετά την ωορρηξία. Κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου τα αυξημένα επίπεδα της E2 και της προγεστερόνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραμονή της FSH και της LH σε χαμηλά επίπεδα. Αυτό προέρχεται από πειραματικά δεδομένα σε γυναίκες που έδειξαν, ότι μετά την ωοθηκεκτομία στη μέση της ωχρινικής φάσης του κύκλου, τα επίπεδα και της E2 και της προγεστερόνης ελαττώνονται δραματικά μέσα στις πρώτες 24 ώρες, ενώ αυτά των FSH και LH αυξάνονται σημαντικά (Alexandris et al., 1997). Αν και αυτά τα δεδομένα υπογραμίζουν τη σημασία αυτών των δύο στεροειδών στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροφινών κατά την ωχρινική φάση, δεν εξειδικεύουν το ρόλο καθενός από αυτά. Αυτό το τελευταίο ερευνήθηκε περαιτέρω σε μια

πρόσφατη μελέτη (Messinis et al., 2002) που έδειξε ότι η χορήγηση εξωγενούς E2, ώστε να παραμείνουν σταθερά στο αίμα τα επίπεδα της E2 στη μέση ωχρινική φάση αμέσως μετά την ωοθηκεκτομία, μετέθεσε την αναμενόμενη αύξηση της FSH και της LH κατά μέσο όρο 3 ημέρες. Όταν όμως διατηρούνταν επίσης και τα επίπεδα της προγεστερόνης με εξωγενή χορήγηση, τότε αποφεύγονταν η αύξηση στις τιμές της FSH και της LH (Messinis et al., 2002). Αυτό σημαίνει ότι η συνδυασμένη δράση της E2 και της προγεστερόνης είναι εκείνη που μεσολαβεί για την αρνητική παλλίνδρομη δράση (negative feedback) των ωοθηκών στην έκκριση των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου. Εάν η προγεστερόνη από μόνη της θα μπορούσε να εκφράσει μία παρόμοια δράση είναι κάτι που δεν έχει ακόμη ερευνηθεί, αν και κάτω από πειραματικές συνθήκες η αρνητική παλλίνδρομη (negative feedback) δράση της προγεστερόνης είναι φανερή μόνο και με την παρουσία οιστρογόνων (Soules et al., 1984).

Κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου η συχνότητα των παλμών της GnRH ελαττώνεται, ενώ το εύρος αυξάνει (Filicori et al., 1986). Αν και αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις της προγεστερόνης (Soules et al., 1984), φαίνεται ότι απαιτούνται και οι δύο και η E2 και η προγεστερόνη για να διατηρήσουν αυτό το μοντέλο έκκρισης της GnRH (Nippoldt et al., 1989). Η κατασταλτική δράση αυτών των δύο στεροειδών στην έκκριση των γοναδοτροφινών πιθανόν γίνεται μέσω μιάς αύξησης στη δραστηριότητα της β-ενδορφίνης στον υποθάλαμο (Wehrenberg et al., 1982).

Εκτός από τα στεροειδή, δεν έχουν ανακαλυφθεί άλλες ωοθηκικές ουσίες που ιδιαίτερα θα καταστέλλουν τη βασική έκκριση της LH στις γυναίκες. Για την FSH όμως, η ινχιπίνη μπορεί να συμμετέχει στο μηχανισμό της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου, αλλά δεν επηρεάζει την έκκριση της LH. Αυτό προκύπτει από δεδομένα μελετών και σε ζώα και σε γυναίκες. Εγχυση ινχιπίνης A σε rhesus πιθήκους, στη μέση της ωχρινικής, οδήγησε σε μία προοδευτική μείωση στα επίπεδα της FSH (Stouffer et al., 1994). Μία πρόσφατη μελέτη σε γυναίκες, έδειξε σημαντική μείωση στις τιμές της ινχιπίνης A μέσα στις πρώτες 12 ώρες μετά την ωοθηκεκτομία που εκτελούνταν στην μέση της ωχρινικής φάσης του κύκλου, και ακολουθούνταν από σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις της FSH

στον ορό (Muttukrishna et al., 2002). Αν και σε αυτή την μελέτη τα επίπεδα της E2 και της προγεστερόνης επίσης ελαττώνονται, βρέθηκε μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ινχιμπίνης A και της FSH. Στην ίδια μελέτη τα επίπεδα της ινχιμπίνης B δεν άλλαξαν σημαντικά μετά την ωθηκεκτομία, συνιστώντας ότι αυτή η πρωτεΐνη δεν είναι ένα σταθερό συστατικό του μηχανισμού της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) κατά την ωχρινική φάση του κύκλου (Muttukrishna et al., 2002). Παρολ' αυτά προηγούμενες μελέτες, έδειξαν ότι σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο και αυξημένες τις τιμές της FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, οι συγκεντρώσεις της ινχιμπίνης A κατά την ωχρινική φάση και της ινχιμπίνης B κατά την ωοθυλακική φάση ήταν σημαντικά χαμηλότερες από ότι σε γυναίκες με φυσιολογικά επίπεδα FSH (Danforth et al., 1998; Santoro et al., 1999; Welt et al., 1999; Muttukrishna et al., 2000). Αυτά τα δεδομένα παρέχουν την απόδειξη ότι και οι δύο τύποι της ινχιμπίνης και η A και η B συμμετέχουν στον έλεγχο της έκκρισης της FSH στις γυναίκες, με την ινχιμπίνη A να είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης ενώ η ινχιμπίνη B κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου.

Ο ρόλος της ακτιβίνης και της φολιστατίνης στον έλεγχο της έκκρισης των ανθρώπινων γοναδοτροφινών τόσο κατά τη διάρκεια της ωχρινικής όσο και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου δεν είναι ξεκάθαρος. Μετρήσεις της φολιστατίνης στην κυκλοφορία των γυναικών δεν έδειξαν καμία σημαντική μεταβολή κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κύκλου (Khoury et al., 1995; Kettel et al., 1996; Evans et al., 1998).

### **Η ωχρινική-ωοθυλακική μετάβαση**

Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την ωχρινική στην επόμενη ωοθυλακική φάση συμβαίνει μία αύξηση στις συγκεντρώσεις στον ορό της FSH (intercycle rise). Η FSH ξεκινά να αυξάνει 2-3 ημέρες πριν την εμφάνιση της περιόδου, αν και πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η αρχική αύξηση συμβαίνει 4 ημέρες πριν. (Miro and Aspinall, 2005). Η FSH παραμένει σε αυξημένα επίπεδα

κατά τη διάρκεια της αρχόμενης ωοθυλακικής φάσης και επιστρέφει στα βασικά επίπεδα στη μέση ωοθυλακική φάση (Mais et al., 1987; Messinis et al., 1993c). Κατά τη διάρκεια της περιόδου της αύξησης της FSH που επίσης ονομάζεται "παράθυρο της FSH" (FSH window) λαμβάνει χώρα η επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου. Αυτές οι μεταβολές στην FSH που περιγράφηκαν ανωτέρω, μετρήθηκαν με ανοσομεθόδους, αλλά όταν χρησιμοποιήθηκαν ειδικές *in vitro* βιομέθοδοι τότε τα αυξημένα σήματα ανιχνεύθηκαν νωρίτερα πχ. στην μέση προς όψιμη ωχρινική φάση (Christin-Maitre et al., 1996).

Η διακυκλική αύξηση της FSH φαίνεται να ελέγχεται από ωοθηκικές ουσίες. Πριν την έναρξη της αύξησης της FSH, λαμβάνει χώρα μία βαθμιαία αλλά σημαντική ελάττωση στα επίπεδα της ινχιμπίνης A, της E2 και της προγεστερόνης (Roseff et al., 1989; Groome et al., 1996). Έχει υποτεθεί γι' αυτό, ότι η διακυκλική αύξηση της FSH ξεκινά στην όψιμη ωχρινική φάση σαν αποτέλεσμα της ελαττωμένης δραστηριότητας του μηχανισμού της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback), ο οποίος καταστέλλει την έκκριση της FSH κατά τη διάρκεια της αρχόμενης και μέσης ωοθυλακικής φάσης. Η ινχιμπίνη B δεν συμμετέχει σ' αυτό το μηχανισμό. Όμως από τη στιγμή που τα επίπεδα της FSH φθάσουν σε ένα κορυφαίο σημείο στην έναρξη της εμμηνορυσίας, τα επίπεδα της ινχιμπίνης B αυξάνουν βαθμιαία και σημαντικά (Groome et al., 1996). Είναι δυνατό οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ινχιμπίνης B, κάτω από την επίδραση της FSH στη διάρκεια της αρχικής ωχρινικής φάσης, να καταστέλλουν την έκκριση της FSH στενεύοντας έτσι το παράθυρο της FSH (Welt et al., 1997).

Με βάση αυτά τα δεδομένα θεωρήθηκε ότι και οι δύο μορφές της ινχιμπίνης είναι σημαντικές για τον έλεγχο της έκκρισης της FSH κατά τη διακυκλική περίοδο στις γυναίκες, με την ινχιμπίνη A να παίζει ρόλο στην πορεία του ανοίγματος του παραθύρου της FSH και με την ινχιμπίνη B στον μηχανισμό που κλείνει το παράθυρο της FSH. Αν και αυτό δημιουργεί αίσθηση, μία μελέτη σε γυναίκες έδειξε ότι η παραμονή των επιπέδων της E2 στη μέση ωχρινική φάση και κατά τη διάρκεια της διακυκλικής περιόδου, αναβάλλει τη διακυκλική αύξηση της FSH παρά τη μείωση των συγκεντρώσεων της ινχιμπίνης (Le Nestour et al., 1993). Επιπλέον, μετά την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου στο φυσιολογικό



κύκλο, τα επίπεδα της FSH του ορού ελαττώνονται καθώς η E2 αυξάνει (van Santbrink et al., 1995). Από αυτά τα αποτελέσματα συνεπάγεται ότι η E2 είναι πιθανά πιο σημαντική από την ινχιμπίνη στη ρύθμιση του παραθύρου της FSH. Πιο πρόσφατα δεδομένα σε γυναίκες που λάμβαναν την αντιοιστρογονική ουσία ταμοξιφένη, έχουν επιβεβαιώσει το σπουδαιότερο ρόλο της E2 έναντι της ινχιμπίνης στον αρνητικό έλεγχο της έκκρισης της FSH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης και της ωχρινικής-ωοθυλακικής μετατροπής, με την ινχιμπίνη B να είναι πιο σημαντική καθώς προχωρεί η ωοθυλακική φάση (Welt et al., 2003). Ο ρόλος της προγεστερόνης στον έλεγχο της διακυκλικής αύξησης της FSH είναι λιγότερο ξεκαθαρισμένος, αν και αυτή η ορμόνη μπορεί να συμμετέχει μέσω μίας ενέργειας στην έκκριση της GnRH. Η προγεστερόνη πιστεύεται ότι ελαττώνει τη συχνότητα και αυξάνει το εύρος παλμών της LH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου (Soules et al., 1984; Nippoldt et al., 1989). Γι' αυτό, η απόσυρση της δράσης της προγεστερόνης στην όψιμη ωχρινική φάση αυξάνει τη συχνότητα των παλμών της GnRH (McCartney et al., 2002), ένα γεγονός που διεγείρει πρωταρχικά την έκκριση της FSH (Marshall and Kelch, 1986; Hall et al., 1992). Αυτός είναι πιθανόν ένας από τους λόγους που η διακυκλική αύξηση της LH είναι λιγότερο διακριτή. Σε κάθε περίπτωση όμως, η συχνότητα των παλμών της GnRH συμβάλλει, αλλά δεν είναι η μοναδική υπεύθυνη για τη διακυκλική αύξηση της FSH στις γυναίκες (Welt et al., 1997).

Ενας άλλος μηχανισμός που θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διακυκλική αύξηση της FSH περιλαμβάνει την ακτιβίνη A. Οι συγκεντρώσεις αυτής της πρωτεΐνης, παρά τους περιορισμούς της υπάρχουσας μεθοδολογίας, αρχίζουν να αυξάνουν από τη μέση ωχρινική φάση, πριν τη διακυκλική αύξηση της FSH (Muttukrishna et al., 1996). Επίσης, οι γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο και αυξημένες τιμές FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, έχουν αυξημένες τιμές ακτιβίνης A κατά την ωχρινική φάση (Muttukrishna et al., 2000). Παρόμοια, σημαντικά αυξημένες τιμές ακτιβίνης A στον ορό έχουν περιγραφεί σε υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Baccarelli et al., 2001). Οσον αφορά το ρόλο των άλλων μορφών της ακτιβίνης, όπως η ακτιβίνη B και η ακτιβίνη AB, δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία για τις συγκεντρώσεις τους στην κυκλοφορία των γυναικών.

### **Ο μηχανισμός θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback)**

Ήταν γνωστό για χρόνια ότι ο βασικός μεσολαβητής της θετικής παλλίνδρομης (positive feedback) δράσης των ωοθηκών στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα ήταν η E2 (Ferin et al., 1974). Αυτό το στεροειδές ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH και βελτιώνει τη δράση της αυτοπριμοδότησης της GnRH στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (Lasley et al., 1975). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της E2 και της GnRH είναι σημαντική για την εμφάνιση του ενδογενούς κύματος των γοναδοτροφινών στο μέσον του κύκλου (Hoff et al., 1977).

### **Η έναρξη του κύματος της LH**

Όπως έχει φανεί από πολλές μελέτες, η E2 είναι ο πρωταρχικός παράγοντας που πυροδοτεί την έναρξη του ενδογενούς κύματος της LH κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου φθάνοντας σε τριπλάσια επίπεδα, που παραμένουν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Karsch et al., 1973; Keye and Jaffe, 1975; Young and Jaffe, 1976; March et al., 1979; Liu and Yen, 1983; Karade et al., 1990). Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της E2 στον ορό είναι περί τα 200pg/ml και η περίοδος της υποφυσιακής έκθεσης είναι τουλάχιστον 48 ώρες (Young and Jaffe, 1976; Simon et al., 1987; Karade et al., 1990). Ακόμα και υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα E2, που πετυχαίνονται με εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα, είναι ικανά να προκαλέσουν ένα κύμα LH (Messinis et al., 1992). Η αλληλεπίδραση της E2 με την GnRH είναι σημαντική για την έναρξη του κύματος της LH και αυτή γίνεται μέσω μιας αυξημένης έκφρασης της GnRH αυτοπριμοδότησης στην υπόφυση (Hoff et al., 1977).

Ο βαθμός στον οποίο συμμετέχουν άλλες ωοθηκικές ορμόνες όπως η προγεστερόνη, στο μηχανισμό της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) στο μέσον του κύκλου δεν είναι ξεκαθαρισμένος. Πειραματικές μελέτες

σε γυναίκες έδειξαν ότι η προγεστερόνη μπορεί να προκαλέσει μία θετική παλλίνδρομη δράση, μόνο μετά από θεραπεία με οιστρογόνα, ακόμα και όταν δεν επιτευχθούν τα κατάλληλα τριπλάσια επίπεδα για την E2 (Chang and Jaffe, 1978; March et al., 1979). Στο μέσον του κύκλου, η αλλαγή στη στεροειδογένεση αναπαριστά την ικανότητα του προωορρηκτικού ωοθυλακίου να παράγει περισσότερο προγεστερόνη από ότι E2 (McNatty et al., 1979a,b). Υπήρξε όμως διχογνωμία στη βιβλιογραφία, για το εάν η έκκριση της προγεστερόνης και οι συγκεντρώσεις της στην κυκλοφορία αυξάνουν λίγο πριν την έναρξη του μεσοκύκλιου κύματος της LH (Johansson and Wide, 1969; Thorneycroft et al., 1974; Laborde et al., 1976; Landgren et al., 1977; Djahanbakhch et al., 1984). Σε μία μελέτη, στην οποία δείγματα αίματος λαμβάνονταν από φυσιολογικές γυναίκες κάθε 2 ώρες και για 5 ημέρες κατά τη διάρκεια της περιωορρηκτικής περιόδου, αποδείχθηκε μία καθαρή αύξηση στις συγκεντρώσεις της προγεστερόνης πριν την πραγματική έναρξη του κύματος της LH (Hoff et al., 1983). Γι' αυτό λοιπόν ο ρόλος της προγεστερόνης πιθανόν να είναι ευδοτικός. Σε πειραματικές μελέτες σε γυναίκες, η χορήγηση προγεστερόνης ευόδωσε την έναρξη ενός εισηγμένου με E2 κύματος LH (Chang and Jaffe, 1978; Liu and Yen, 1983; Messinis and Templeton, 1990). Επίσης σε επίμεις, η προγεστερόνη επαυξάνει την έκκριση της GnRH που προκαλείται από την E2, από το μέσο βασικό υποθάλαμο (Miyake et al., 1982) ενώ το αντιπρογεσταγόνο, μifeπριστόνη, μπλοκάρει το μεσοκύκλιο κύμα των γοναδοτροφινών σε γυναίκες όταν χορηγείται μετά την εμφάνιση του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Batista et al., 1992). Αν και ο ρόλος της κυκλοφορούσης προγεστερόνης στο μηχανισμό της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) στις γυναίκες χρειάζεται διασαφηνίσεις, δεδομένα από ωθηκεκτομηθέντα ποντίκια με ανενεργούς τους υποδοχείς προγεστερόνης και στα οποία χορηγούνται οιστρογόνα, έδειξαν ότι είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων, ώστε να υπάρξει η ενέργεια της GnRH αυτοπριμοδότησης και η δημιουργία του κύματος των γοναδοτροφινών από την E2 (Chappell et al., 1999). Επιπλέον πληροφορίες από ωθηκεκτομηθέντες και αδρενεκτομηθέντες επίμεις έδειξαν, ότι η νευροπρογεστερόνη του συντίθεται στον υποθάλαμο κάτω από την επίδραση της E2, είναι ένας υποχρεωτικός διαμεσολαβητής του μηχανισμού της θετικής

παλλίνδρομης ρύθμισης που εισάγεται από αυτό το στεροειδές (Micevych et al., 2003). Επιπλέον δεδομένα από επίμεις έδειξαν ότι τα οιστρογόνα εισάγουν εξαρχής (de novo) τη σύνθεση της προγεστερόνης από τη χοληστερόλη στον υποθάλαμο, η οποία παίζει κάποιο ρόλο στην έναρξη του κύματος της LH (Soma et al., 2005). Είναι πιθανόν γι' αυτό οι μηχανισμοί δημιουργίας προγεστερόνης, περιλαμβάνοντας και τους υποδοχείς προγεστερόνης, να συμμετέχουν στο μηχανισμό της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) της E2, ρυθμίζοντας έτσι και την έναρξη του κύματος της LH.

Ο τόπος της δράσης της E2 για τη θετική παλλίνδρομη δράση (positive feedback) είναι και ο υποθάλαμος και η υπόφυση (Xia et al., 1992). Σε πρόβατα έχει ανιχνευθεί ένα προωορρηκτικό κύμα GnRH (Moenter et al., 1991). Ομως, το κύμα της LH μπορεί να εισαχθεί με οιστρογόνα σε πιθήκους χωρίς καθόλου παραγωγή GnRH (Ferin et al., 1979). Στις γυναίκες, καθώς τα δεδομένα λείπουν, μία μελέτη έδειξε αύξηση στο πλάσμα της ανοσοδραστικής GnRH, σαν αποτέλεσμα της χορήγησης οιστρογόνων, που προηγείται της αύξησης της LH και FSH (Miyake et al., 1983). Είναι πιθανό γι' αυτό, ότι ο αρχικός τόπος δράσης για τη θετική παλλίνδρομη ρύθμιση (positive feedback) είναι η υπόφυση και ότι η GnRH παίζει έναν επιτρεπτικό ρόλο (Knobil et al., 1988). Μία πρόσφατη μελέτη σε επίμεις έδειξε, ότι η απευθείας δράση της E2 στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης είναι υποχρεωτική για τη δράση της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) στην έκκριση της LH (Yin et al., 2002). Η προγεστερόνη φαίνεται επίσης να ασκεί θετική παλλίνδρομη ρύθμιση (positive feedback) μέσω του υποθαλάμου (Terasawa et al., 1982).

Η θετική παλλίνδρομη δράση της E2 στην έκκριση των γοναδοτροφινών γίνεται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (ER). Εάν γίνεται μέσω των ERα ή των ERb ή και των δύο δεν είναι ξεκαθαρισμένο. Πάντως υπάρχουν και οι δύο τύποι οιστρογονικών υποδοχέων στα γοναδοτρόφα κύτταρα (Mitchner et al., 1998), ενώ δεδομένα από επίμεις έδειξαν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίσουν τους υποδοχείς τους καθώς και την απαντητικότητα της υπόφυσης σε αυτά (Schreihofner et al., 2000). Η δράση της E2 επίσης επηρεάζεται και από τις μεταβολές στη δραστηριότητα των νευροδιαβιβαστών στον υποθάλαμο, όπως η β-

ενδορφίνη, των οποίων τα επίπεδα στο πλάσμα ξεκινούν να αυξάνουν 2 ημέρες πριν την κορύφωση της LH (Laatikainen et al., 1985).

### **Ο φυσιολογικός ρόλος του GnSAF: Το εύρος του κύματος της LH**

Αν και η βιοδραστικότητα του GnSAF είναι ιδιαίτερα φανερή κατά την ωθητική διέγερση, είναι πιθανό αυτός ο παράγοντας να παίζει ένα φυσιολογικό ρόλο στη διάρκεια του κανονικού κύκλου επηρεάζοντας την έκκριση των γοναδοτροφινών. Μελέτες σε γυναίκες κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου έχουν δείξει, ότι ο GnSAF παράγεται κατά τη διάρκεια της ωχρινικής-ωοθυλακικής μετατροπής κάτω από την επίδραση της διακυκλικής αύξησης της FSH (Messinis et al., 1991, 1993c, 2002). Η υπόθεση στηρίχθηκε στο γεγονός ότι η δραστηριότητα του GnSAF στην κυκλοφορία είναι μεγάλη κατά τη διάρκεια της αρχόμενης και μέσης ωοθυλακικής φάσης και έτσι διατηρείται η υπόφυση σε μια κατάσταση χαμηλής απαντητικότητας στη GnRH (Messinis and Templeton, 1991; Fowler et al., 2003; Messinis, 2003). Όμως, στην όψιμη ωοθυλακική φάση υπάρχει μια ελάττωση στη βιοδραστικότητα του GnSAF, που διευκολύνει την ευαισθητοποιούσα δράση της E2 στην υπόφυση και την πλήρη έκφραση του κύματος της LH στο μέσον του κύκλου (Messinis et al., 1994).

Η δραστηριότητα του GnSAF είναι μεγαλύτερη στην αρχόμενη και στη μέση ωοθυλακική φάση, παρά στην όψιμη ωοθυλακική και αυτό υποστηρίζεται από *in vitro* μελέτες που αποδεικνύουν τη GnSAF δραστηριότητα στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό των μικρών και μεσαίων σε μέγεθος ωοθυλακίων, παρά στα μεγάλα ωοθυλάκια (Fowler et al., 1990, 2001). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, ο ρόλος του GnSAF στον άνθρωπο είναι να ελέγξει το εύρος και όχι την έναρξη του κύματος της LH. Στην πραγματικότητα, ένα ενδογενές κύμα LH συμβαίνει σταθερά σαν απάντηση στη θετική παλλίνδρομη δράση της E2 είτε στην αρχόμενη, είτε στη μέση ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού κύκλου, αλλά αυτό το κύμα είναι αμβλύ συγκρινόμενο με το μεσοκυκλικό (Taylor et al., 1995; Messinis et al., 2001). Γι' αυτό, φαίνεται ότι E2 και GnSAF αλληλεπιδρούν στα

γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης με την πρώτη να εκφράζει μία ευαισθητοποιό δράση και το δεύτερο μία ανταγωνιστική.

Από τις άλλες ωοθηκικές ορμόνες, η προγεστερόνη φαίνεται να παίζει ένα ρόλο στον έλεγχο του εύρους του κύματος της LH. Κάτω από πειραματικές συνθήκες σε γυναίκες με κανονικούς κύκλους ή σε μετεμμηνοπαυσιακές, η εξωγενής χορήγηση προγεστερόνης άμβλυνε το κύμα της LH που προκαλούνταν με την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων (Liu and Yen, 1983; Messinis and Templeton, 1990). Δεδομένα από επίμεις δείχνουν, ότι αυτή η δράση της προγεστερόνης γίνεται μέσω μιας αυξημένης ενεργοποίησης των GnRH νευρώνων (Lee et al., 1990).

### **Ο τερματισμός του κύματος της LH**

Το μεσοκυκλικό κύμα της LH φυσιολογικά έχει μια διάρκεια 48-72 ωρών (Hoff et al., 1983; Messinis and Templeton, 1988a; Shoham et al., 1995). Ωστόσο, οι παράγοντες που ελέγχουν τον τερματισμό του ενδογενούς κύματος της LH κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου της γυναίκας δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί. Μετά την έναρξη του κύματος της LH, οι συγκεντρώσεις της E2 ελαττώνονται. Είναι μάλλον απίθανο η απόσυρση της E2 να τερματίζει την έκκριση των γοναδοτροφινών και αυτό επειδή ο τερματισμός του μεσοκυκλικού κύματος της LH συμβαίνει και σε πειράματα που οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια του κύματος (Liu and Yen, 1983). Επιπλέον, μελέτες σε ζώα έχουν δείξει, ότι η E2 είναι σημαντική για την πυροδότηση του κύματος της LH, αλλά δε χρειάζεται μετά την έναρξή του (Evans et al., 1997). Ωστόσο, δεδομένα από επίμεις έδειξαν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ελαττώσουν τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ERa και ERb) και να αυξήσουν ένα προϊόν από τους υποδοχείς το ER product-1 που καταστέλλει τη δραστηριότητα και των δύο τύπων των υποδοχέων in vivo και σε κυτταρικές σειρές, συνιστώντας έτσι ένα πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου τα στεροειδή περιορίζουν τη δράση της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) (Schreinhofer et al., 2000, 2002). Ακόμη πιο πρόσφατα δεδομένα όμως,

έδειξαν ότι η απώλεια των κυμάτων της LH σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμεις κατά τη διάρκεια χρόνιας θεραπείας με E2 επιτεύχθηκε χωρίς καμία μεταβολή στα ποσοστά έκφρασης των ERa και ERb στα κύτταρα που παράγουν GnRH (Legan and Tsai, 2003).

Τα επίπεδα προγεστερόνης στον ορό αυξάνουν βαθμιαία από την έναρξη προς το τέλος του κύματος της LH και συνεχίζουν να αυξάνουν κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου (Hoff et al., 1983). Είναι πιθανό τα αυξημένα επίπεδα της προγεστερόνης να συμβάλλουν στον τερματισμό του κύματος της LH μέσω μίας αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback). Πειραματικά δεδομένα από γυναίκες έδειξαν ότι όταν ένα κύμα LH προκαλείται με την εξωγενή χορήγηση E2, τα επίπεδα της LH ελαττώνονται μετά την αιχμή του κύματος αλλά φθάνουν στα πρό του κύματος επίπεδα μόνο μετά τη χορήγηση προγεστερόνης (Messinis and Templeton, 1990). Μια πρόσφατη μελέτη παρείχε περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά το μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για τον τερματισμό του ενδογενούς κύματος της LH στις γυναίκες (Dafopoulos et al., 2006). Ειδικότερα, η θετική παλλίνδρομη ρύθμιση (positive feedback) της E2 ερευνήθηκε σε δύο κύκλους φυσιολογικών γυναικών που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομία την 3<sup>η</sup> ημέρα του δεύτερου κύκλου. Ένα ενδογενές κύμα LH προκλήθηκε με την εξωγενή χορήγηση E2 από την 3<sup>η</sup> έως την 5<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου και ήταν συγκρίσιμο και στους δύο κύκλους μέχρι του σημείου της αιχμής της LH. Μια κατιούσα πορεία στις τιμές της LH, κατόπιν της αιχμής της, ήταν φανερή μόνο στον πρώτο κύκλο με άθικτες τις ωοθήκες. Σε αντίθεση, στο δεύτερο κύκλο στον οποίο οι ωοθήκες είχαν αφαιρεθεί, τα επίπεδα της LH και της FSH δεν ελαττώθηκαν αλλά κυμαίνονταν περί των αιχμιακών τιμών μέχρι το πέρας της πειραματικής περιόδου (Dafopoulos et al., 2006). Αυτά τα δεδομένα συνιστούν, ότι ο τερματισμός ενός κύματος LH που προκαλείται με την εξωγενή χορήγηση E2 δε σχετίζεται με την εξάντληση των υποφυσιακών δεξαμενών αλλά ελέγχεται από ωοθηκικούς παράγοντες. Καθώς οι τιμές της προγεστερόνης ελαττώνονται μετά την ωοθηκεκτομία και είναι χαμηλότερες από εκείνες στις αντίστοιχες ημέρες του πρώτου κύκλου με τις άθικτες ωοθήκες, αυτό το στεροειδές είναι υποψήφιο για την υπευθυνότητα του τερματισμού του κύματος της LH. Μία ελάττωση στη συχνότητα των παλμών της GnRH στο τελικό τμήμα

σε σύγκριση με το αρχικό και μέσο τμήμα του μεσοκυκλικού κύματος της LH (Adams et al., 1994) μπορεί να είναι ένα μέρος του μηχανισμού δράσης της προγεστερόνης στην έκκριση των γοναδοτροφινών.

### Παθολογικές καταστάσεις

Κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών χρόνων, μπορεί να συμβούν διαταραχές στους μηχανισμούς της παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback mechanisms) και να εμφανιστούν διαταραχές της εμμηνορυσίας, όπως δυσλειτουργικές μητρορραγίες, μηνορραγίες ή αμηνόρροια. Σε σχέση με το μηχανισμό της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) μία πιθανή διαταραχή είναι η ελαττωμένη καταστολή στην έκκριση των γοναδοτροφινών. Αυτό συμβαίνει όταν η παραγωγή των ωθητικών στεροειδών είναι ανεπαρκής όπως στην πρόιμη ωθητική έκπτωση ή μετά από ωθηκεκτομία. Οι γυναίκες με πρόιμη ωθητική έκπτωση και ωορρηκτικούς κύκλους έχουν υψηλότερα επίπεδα FSH στον ορό και χαμηλότερα ινχιμπίνης B και ινχιμπίνης A (Welt et al., 2005a). Αν και η πρόιμη έκπτωση της ωθητικής λειτουργίας είναι μία μόνιμη κατάσταση, σε μερικές περιπτώσεις οι ωθήκες είναι μόνο προσωρινά ανενεργείς. Όταν, όμως τα επίπεδα των γοναδοτροφινών μειώνονται είτε αυτόματα είτε μετά από θεραπεία με E2, επανέρχεται η κανονική κυκλικότητα και μπορεί ακόμη και εγκυμοσύνη να συμβεί (Taylor et al., 1996).

Η αντίθετη κατάσταση, πχ ένας αυξημένος μηχανισμός αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) δεν έχει περιγραφεί σε ανθρώπους. Είναι γνωστό ότι σε γυναίκες με PCOS η FSH του ορού είναι φυσιολογική, ενώ η LH είναι είτε φυσιολογική, είτε αυξημένη. (Balen et al., 1995b). Η αδυναμία των ωοθυλακίων να ωριμάσουν στο πρωορρηκτικό στάδιο σ' αυτές τις ασθενείς οφείλεται τουλάχιστον μερικά στην έλλειψη της διακυκλικής αύξησης της FSH, ενώ όταν οι συγκεντρώσεις της FSH γίνουν λίγο υψηλότερες με εξωγενή χορήγηση αυτής της ορμόνης, τότε μπορεί να λάβει χώρα η επιλογή του ωοθυλακίου (van der Meer et al., 1994). Αν και η παθοφυσιολογία του PCOS είναι σε πολλά σημεία ασαφής, η έλλειψη της διακυκλικής αύξησης της FSH μπορεί μερικώς να σχετίζεται με έναν αυξημένο μηχανισμό αρνητικής



παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) μέσω της αυξημένης ινχιμπίνης. Έχει όμως δειχθεί, ότι τα επίπεδα της ινχιμπίνης δεν είναι υψηλότερα στις ασθενείς με PCOS όταν συγκρίνονται με εκείνα των μαρτύρων (Pigny et al., 2000). Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις και των δύο μορφών ινχιμπίνης και της A και της B βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερες στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με PCOS, από ότι σε ωοθυλάκια ίδιου μεγέθους φυσιολογικών γυναικών (Welt et al., 2005b).

Οι φυσιολογικές γυναίκες εμφανίζουν τη θετική παλλίνδρομη ρύθμιση (positive feedback) στη μέση του κύκλου και έχουν σταθερή ωορρηξία. Στις περιπτώσεις που υπάρχει ωοθυλακική αναστολή όπως στις υπερανδρογοναιμικές καταστάσεις, στο PCOS, στην υπερπρολακτιναιμία, στον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και στην πρόιμη ωοθηκική έκπτωση, δεν υπάρχει σταθερή εμφάνιση της θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback) της ενδογενούς E2. Με εξαίρεση τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, στην πλειοψηφία αυτών των περιπτώσεων μπορεί να εμφανιστεί θετική παλλίνδρομη δράση (positive feedback) κατά τη διάρκεια test πρόκλησης με οιστρογόνα (Shaw et al., 1976). Γι'αυτό όταν πρέπει να προκληθεί ωοθυλακιωρρηξία σε γυναίκες με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό θα πρέπει να χορηγηθεί hCG για να επιτευχθεί η τελική ωοθυλακική ωριμότητα (Messinis et al., 2005). Έχει προταθεί ότι η αυξημένη LH στον ορό, που παρατηρείται περίπου στο 40% των ασθενών με PCOS, σχετίζεται με τη συνεχή θετική δράση της E2 στην υπόφυση (Lobo et al., 1981; Waldstreicher et al., 1988). Αν και αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί, τέτοια δράση δεν πληρεί τα κριτήρια μιας θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback). Όμως, η συνεχής ευαισθητοποιός δράση της E2 στην υπόφυση που επαυξάνει την υποφυσιακή απάντηση στη GnRH στις ασθενείς με PCOS δε μπορεί να αποκλειστεί, αν και δεδομένα σε πιθήκους δεν υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση (Richardson et al., 1992).

## ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Αν και η πρώτη περιγραφή του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) αποδίδεται στους Stein και Leventhal το 1935, ωστόσο έχει ήδη

περιγραφεί από το 1721, όταν ο Ιταλός Antonio Vallisneri παρατήρησε νεαρές χωρικές έγγαμες γυναίκες, μετρίως παχύσαρκες και υπογόνιμες, με δύο μεγαλύτερες από το φυσιολογικό ωοθήκες, γυαλιστερές, λευκάζουσες, παρόμοιες με αυγά περιστεριού (Konacs G., Smith J.). Αυτή η εικόνα μοιάζει παρόμοια μ' εκείνη των υπογόνιμων και παχύσαρκων γυναικών που παρατηρείται συχνά στο PCOS. Δεν ήταν παρά το 1921 που οι Achard και Thiers παρατήρησαν τη σχέση μεταξύ υπερανδρογοναιμίας και αντίστασης στην ινσουλίνη στη μελέτη τους "διαβητική γυναίκα με δασυτριχισμό" (bearded diabetic woman) (Achard C., Thiers J.). Αυτή η σχέση είναι παρούσα στο PCOS σ' αυτό που θα μπορούσε να ονομαστεί "δασύτριχη υπερινσουλιναϊμική γυναίκα".

Το 1935 ο Stein και ο Leventhal έκαναν το συσχετισμό ανάμεσα στην αμηνόρροια και τις πολυκυστικές ωοθήκες. Επιπλέον, περιέγραψαν το συμβάν των αρρενοποιητικών μεταβολών (δασυτριχισμός, ακμή) σε πολλές γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες. Πολλές, αν όχι όλες, από τις αρχικές περιπτώσεις που μελέτησαν, περιελάμβαναν γυναίκες που ήταν υπέρβαρες. Και στις επτά περιπτώσεις των case reports οι απόπειρες να θεραπεύσουν την ωοθυλακιορρηκτική δυσλειτουργία με οιστρογόνα απέτυχε και εφαρμόστηκε σφηνοειδής εκτομή των ωοθηκών. Η χειρουργική αντιμετώπιση του PCOS σήμερα είναι ασυνήθης αλλά σε όλες τις περιπτώσεις των Stein και Leventhal επιτεύχθηκαν κανονικοί κύκλοι και σε δύο απ' αυτές επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη. Ακόμη πολλά έχουν αλλάξει στον τρόπο με τον οποίο κατανοούμε και θεραπεύουμε το PCOS (Shalmi D., Zisser H.).

Το 1990, στο Πρώτο Διεθνές Συνέδριο για το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS) (Bethesda, National Institute of Health), καθιερώθηκαν τα πρώτα κριτήρια για το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Πίνακας 1): Κλινική ή βιοχημική υπερανδρογοναιμία, χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και εξαίρεση άλλων γνωστών διαταραχών (Zawanski and Dunaif, 1992).

Αυτά τα κριτήρια αποτέλεσαν το πρώτο σημαντικό βήμα προς την τυποποιημένη διάγνωση και οδήγησαν σ' έναν αριθμό τυχαιοποιημένων πολυκεντρικών κλινικών δοκιμών που λειτούργησαν ως ορόσημο στο PCOS (Nestler *et al.*, 1998, Azziz *et al.*, 2001).

Το PCOS είναι ένα σύνδρομο ωοθηκικής δυσλειτουργίας. Τα κύρια ευρήματα είναι υπερανδρογοναιμία και πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών (PCO) (Laven *et al.*, 2002). Οι κλινικές του εκδηλώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν διαταραχές του κύκλου, σημεία υπερανδρογοναιμίας και παχυσαρκία. Το PCOS συσχετίζεται με έναν αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη τύπου II (Ehrmann *et al.*, 1999, Legro *et al.*, 1999).

Σήμερα είναι αποδεκτό ότι γυναίκες με κανονικούς κύκλους και υπερανδρογοναιμία και/ή PCO μπορεί να αποτελούν ένα μέρος του συνδρόμου (Adams *et al.*, 1986, Franks, 1989, Carmina and Lobo, 2001). Επίσης είναι αποδεκτό ότι κάποιες γυναίκες με το σύνδρομο έχουν PCO χωρίς κλινικές εκδηλώσεις υπερανδρογοναιμίας αλλά έχουν ωοθηκική δυσλειτουργία. Το PCOS παραμένει ένα σύνδρομο και έτσι δεν αρκεί ένα μόνο διαγνωστικό κριτήριο για την κλινική του διάγνωση (όπως υπερανδρογοναιμία ή PCO). Το PCOS επίσης παραμένει μια διάγνωση που τίθεται εξ αποκλεισμού.

Μελέτες σε οικογένειες με PCOS είναι σημαντικές για να κατανοήσουμε το φάσμα των φαινοτύπων και για να αναγνωρίσουμε τα εμπλεκόμενα στο PCOS γονίδια. Πιο στενά διαγνωστικά κριτήρια μπορεί να χρησιμοποιηθούν σ' αυτές τις μελέτες για να αναγνωρίσουν τις πάσχουσες ενήλικες, όπως η παρουσία μόνο PCO (Carey *et al.*, 1993) ή μόνο υπερανδρογοναιμίας.

Είναι σημαντικό για τη διάγνωση του PCOS να εξαιρέσουμε άλλες διαταραχές με παρόμοια κλινική εικόνα, όπως συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων, σύνδρομο Cushing και όγκους που εκκρίνουν ανδρογόνα. Η εξαίρεση της μή κλασσικής υπερπλασίας των επινεφριδίων που οφείλεται σε έλλειψη της 21-υδροξυλάσης μπορεί να γίνει μετρώντας τα βασικά πρωινά επίπεδα της 17-OHPRG με όρια τιμών μεταξύ 2 και 3 ng/ml (Azziz *et al.*, 1999).

Η εξαίρεση της θυρεοειδικής δυσλειτουργίας σε ασθενείς που θεωρήθηκαν ως υπερανδρογοναιμικές είναι περιορισμένης αξίας, καθώς η επίπτωση αυτής της διαταραχής είναι παρόμοια και όχι υψηλότερη σ' αυτές τις ασθενείς απ' ό,τι σε φυσιολογικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Παρόλα αυτά όμως, επειδή ο έλεγχος των θυρεοειδικών διαταραχών πρέπει να προτείνεται σε όλες τις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, η μέτρηση των θυρεοειδικών ορμονών και στις υπερανδρογοναιμικές γυναίκες δε θα πρέπει να αποθαρρύνεται.

Στις αρχικές εξετάσεις στις γυναίκες με αραιο- ή αμηνόρροια πρέπει επίσης να περιλαμβάνει την εκτίμηση των επιπέδων της FSH και E2 στον ορό για να αποκλείσουμε υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, π.χ. κεντρική αιτιολογία της ωοθηκικής λειτουργίας ή πρόωμη έκπτωση της ωοθηκικής λειτουργίας με χαμηλές συγκεντρώσεις E2 και υψηλές FSH, σύμφωνα με την κατάταξη του WHO (ESHRE Capri Workshop, 1995, Rowe *et al.*, 2000). Το PCOS είναι μέρος του φάσματος της νορμογοναδοτροφικής νορμοοιστρογονικής ανωοθυλακιορρηξίας (WHO 2, van Santbrink *et al.*, 1997, Laven *et al.*, 2002). Θα πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι οι συγκεντρώσεις της LH είναι συχνά αυξημένες σ' αυτές τις ασθενείς. Η μέτρηση της PRL για την εκτίμηση των υπερανδρογονοαιμικών γυναικών θα πρέπει να γίνεται για να εξαιρέσουν την υπερπρολακτιναιμία με την υπενθύμιση ότι πολλές υπερανδρογονοαιμικές ασθενείς έχουν επίπεδα προλακτίνης στα ανώτατα φυσιολογικά όρια ή ελαφρώς πάνω απ' αυτά.

Τέλος, θα πρέπει να εξαιρούνται εάν υπάρχει σοβαρή κλινική υποψία, τα σύνδρομα σοβαρής αντίστασης στην ινσουλίνη (π.χ. για τη διάγνωση της υπερανδρογονοαιμικής ανθεκτικής στην ινσουλίνη μελανίζουσας ακάνθωσης ή HAIRAN syndrome) (Moller *et al.*, 1994), το σύνδρομο Cushing (Kreisberg, 1994), τα νεοπλάσματα που εκκρίνουν ανδρογόνα (Kreisberg, 1994, Waggoner *et al.*, 1999) ή η χορήγηση εξωγενώς υψηλής δόσης ανδρογόνων (Pache *et al.*, 1991).

Τα κριτήρια του PCOS περιλαμβάνουν και την εκτίμηση της κλινικής ή εργαστηριακής υπερανδρογονοαιμίας ενώ εξαιρούν παρόμοιες διαταραχές.

#### Κλινική υπερανδρογονοαιμία

Το κυριότερο κλινικό σημείο της υπερανδρογονοαιμίας είναι η αυξημένη τριχοφυΐα (δασυτριχισμός) (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 1992). Θα πρέπει όμως να τονιστούν τα παρακάτω ζητήματα:

- Δεν υπάρχουν ακόμη πληροφορίες για το φυσιολογικό σε μεγάλους πληθυσμούς.
- Η εκτίμηση του δασυτριχισμού είναι σχετικά υποκειμενική.
- Πολύ λίγοι γιατροί στην κλινική πρακτική χρησιμοποιούν συγκεκριμένες μεθόδους βαθμολόγησης του δασυτριχισμού.

- Ο δασυτριχισμός είναι συχνά θεραπευμένος καλά πριν η ασθενής εκτιμηθεί ενδοκρινολογικά.
- Ο δασυτριχισμός μπορεί να είναι σημαντικά λιγότερο εμφανής στις υπερανδρογοναιμικές γυναίκες της ανατολικής Ασίας (Carmina *et al.*, 1992), ή στην εφηβεία (Ruutiainen *et al.*, 1988).

Μόνο η παρουσία ακμής θεωρήθηκε επίσης ένας δυνητικός δείκτης υπερανδρογοναιμίας αν και οι μελέτες είναι κάπως αλληλοαντικρουόμενες όσον αφορά στην ακριβή επίπτωση της υπερανδρογοναιμίας σ' αυτές τις ασθενείς (Slayden *et al.*, 2001). Η παρουσία μόνο ανδρικού τύπου αλωπεκίας έχει μελετηθεί λιγότερο. Παρόλα αυτά όμως φαίνεται να είναι μη σημαντικός δείκτης υπερανδρογοναιμίας εκτός κι αν συνυπάρχει αραιοωοθυλακιορρηξία (Futterweit *et al.*, 1988). Συνολικά, η κλινική παρουσία υπερανδρογοναιμίας είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ασθενών με PCOS, παρά τους προαναφερόμενους περιορισμούς.

#### Βιοχημική υπερανδρογοναιμία

Οι περισσότερες ασθενείς με PCOS έχουν υπερανδρογοναιμία και πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα ανδρογόνων μπορεί να αναπαριστούν έναν κληρονομούμενο δείκτη για αυξημένη έκφραση ανδρογόνων (Legro *et al.*, 1998). Ωστόσο, τονίζεται ξεκάθαρα ότι ένα ποσοστό ασθενών με PCOS μπορεί να μην εμφανίσουν ξεκάθαρη ανωμαλία στα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανδρογόνων (Knochenhauer *et al.*, 1988, Pugeat *et al.*, 1993, Balen *et al.*, 1995 Asuncion *et al.*, 2000, Laven *et al.*, 2002).

Ο ακριβής ορισμός της υπερανδρογοναιμίας με μέτρηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων ανδρογόνων έχει δυσκολίες που οφείλονται εν μέρει στην ανακρίβεια και στις διάφορες εργαστηριακές μεθόδους μέτρησης που συχνά χρησιμοποιούνται (Rosner, 1997, Boots *et al.* 1998, Vermeulen *et al.*, 1999).

- Υπάρχουν πολλά ανδρογόνα που μπορεί να μην λαμβάνονται υπόψη (Rittmaster, 1993).
- Υπάρχει μια ευρεία μεταβλητότητα στο φυσιολογικό πληθυσμό.
- Τα φυσιολογικά όρια δεν έχουν επαρκώς καθοριστεί χρησιμοποιώντας καλά χαρακτηρισμένο πληθυσμό ελέγχου.

- Η ηλικία και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) δεν ελήφθησαν υπόψη όταν καθιερώθηκαν οι φυσιολογικές τιμές για τα επίπεδα των ανδρογόνων (Moran *et al.*, 1999, Bili *et al.*, 2001).
- Υπάρχουν λίγες πληροφορίες για τις φυσιολογικές τιμές στις έφηβες και στις ηλικιωμένες γυναίκες.
- Τα ανδρογόνα καταστέλλονται πιο γρήγορα με ορμονική θεραπεία, παρά άλλα κλινικά σημεία και μπορεί να παραμένουν κατεσταλμένα και μετά τη διακοπή της ορμονικής θεραπείας.

Σημειώνοντας αυτούς τους περιορισμούς, θεωρήθηκε ότι η μέτρηση της ελεύθερης τεστοστερόνης (T) ή του δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων (FAI) (Vermeulen *et al.*, 1999) είναι οι πιο ευαίσθητες μέθοδοι για την εκτίμηση της υπερανδρογοναιμίας (Cibula *et al.*, 2000, Imani *et al.*, 2000). Σημειώνεται ότι η μέτρηση μόνο της ολικής τεστοστερόνης, μπορεί να μην είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της υπερανδρογοναιμίας. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών με PCOS μπορεί να έχει μεμονωμένη αύξηση των επιπέδων της S-DHEA. Κάποιοι πιστεύουν ότι η μέτρηση της ολικής τεστοστερόνης και της S-DHEA έχουν κάποια αξία στην αποκάλυψη των ασθενών με νεοπλάσματα που εκκρίνουν ανδρογόνα (Meldrum and Abraham, 1979), αν και πιο πρόσφατες μελέτες συνιστούν ότι ο καλύτερος δείκτης αυτών των νεοπλασμάτων είναι η κλινική εμφάνιση (Derksen *et al.*, 1994).

Τέλος, υπάρχουν λίγα δεδομένα για την αξία της μέτρησης της ανδροστενδιόνης σε υπερανδρογοναιμικές ασθενείς (Laven *et al.*, 2002), αν και παρατηρήθηκε ότι μπορεί να είναι κάπως αυξημένη σε ασθενείς με έλλειψη 21-υδροξυλάσης, παρά σε ασθενείς με PCOS. Παρόλα αυτά, δεν συστήνεται η μέτρηση της ανδροστενδιόνης στον έλεγχο ρουτίνας για υπερανδρογοναιμικές γυναίκες, λόγω της έλλειψης σαφώς καθορισμένων φυσιολογικών τιμών και κλινικών στοιχείων για το ανδρογόνο αυτό.

Το PCOS είναι μία από τις πιο συνηθισμένες ορμονικές διαταραχές και η συχνότητα εμφάνισής του είναι μεταξύ 5% και 10%. Διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των πληθυσμών μπορεί να οφείλονται στην εθνικότητα, στη φυλή και σε άλλους περιβαλλοντολογικούς παράγοντες. Πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στη δυσκολία της διάγνωσης του PCOS. Τα χαρακτηριστικά και τα

συμπτώματά του είναι ετερογενή και μεταβάλλονται κατά χρονικές περιόδους. Επιπλέον ένας ακριβής και καθολικός (ομοιόμορφος) ορισμός του συνδρόμου απουσιάζει. Μια διεθνής επιτροπή στο Rotterdam πρόσφατα (2003) (Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to PCOS) πρότεινε ότι το σύνδρομο μπορεί να διαγνωστεί μετά την εξαίρεση άλλων ιατρικών καταστάσεων που προκαλούν ανώμαλους καταμήνιους κύκλους και αύξηση των ανδρογόνων (Πίνακας 3) και ο ορισμός του απαιτεί ότι τα δύο τουλάχιστον από τα ακόλουθα είναι παρόντα: αραιομηνόρροια ή αμηνόρροια, αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων ανδρογόνων (υπερανδρογοναιμία) ή κλινικές εκδηλώσεις των αυξημένων ανδρογόνων (υπερανδρογονισμός) και πολυκυστική απεικόνιση των ωοθηκών υπερηχογραφικά. Η παραδοχή αυτών των κριτηρίων καθορίζει το σύνδρομο ως λειτουργικό· η πολυκυστική απεικόνιση των ωοθηκών δεν είναι απαραίτητη για τη διάγνωση του συνδρόμου και αντίθετα οι πολυκυστικές ωοθήκες από μόνες τους δε θέτουν τη διάγνωση (Ehrmann et al., 1992; Polson et al., 1988).

---

**Πίνακας 3.** NIH κριτήρια 1999/Rotterdam ESHRE κριτήρια 2003

---

1999 κριτήρια (και 1 και 2)

1. Χρόνια ανωοθυλακιορρηξία
2. Κλινικά και/ή βιοχημικά σημεία υπερανδρογοναιμίας και εξαίρεση άλλης αιτιολογίας υπερανδρογοναιμίας

2003 κριτήρια (2 από τα 3)

1. Αραιομηνόρροια και/ή ανωοθυλακιορρηξία
  2. Κλινικά ή/και βιοχημικά σημεία υπερανδρογοναιμίας
  3. Πολυκυστική απεικόνιση ωοθηκών και εξαίρεση άλλης αιτιολογίας υπερανδρογοναιμίας (συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων, όγκοι που εκκρίνουν ανδρογόνα, σύνδρομο Cushing, υπερπρολακτιναιμία)
- 

Οι γυναίκες με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών σχεδόν πάντα έχουν μια παρέκκλιση στην έκκριση των γοναδοτροφινών, συγκρινόμενες με γυναίκες που έχουν κανονικούς καταμήνιους κύκλους (Michelmore et al., 1999). Όμως, καθώς οι συγκεντρώσεις των γοναδοτροφινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου και οι γοναδοτροφίνες εκκρίνονται με παλμικότητα στην κυκλοφορία, μία μόνη μέτρηση της LH και της FSH παρέχει μικρή διαγνωστική ευαισθησία. Έτσι στην καθημερινή κλινική πρακτική, μη φυσιολογικά επίπεδα

γοναδοτροφινών (αυξημένα επίπεδα LH ή αύξηση του πηλίκου LH/FSH) δεν απαιτούνται για να θέσουν τη διάγνωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών.

Ως αραιομηνόρροια ορίζεται όταν οι καταμήνιοι κύκλοι έχουν διάρκεια >35 ημερών ή στην 22<sup>η</sup>-24<sup>η</sup> ημέρα σε κύκλους 27-34 ημερών η P4 (προγεστερόνη) είναι <4 ng/dl (2,7 nmol/L).

Η χρόνια ανωοθυλακιορρηξία που πιο συχνά εκδηλώνεται ως αραιομηνόρροια (λιγότερες από 9 εμμηνορρυσίες το χρόνο) ή αμηνόρροια, μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργική μητρορραγία και ελαττωμένη γονιμότητα.

Ως υπερανδρογοναιμία ορίζεται όταν η τιμή των ανδρογόνων ξεπερνά την 95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση των ανδρογόνων εμμηνορροϊκών υγιών γυναικών όμοιας φυλής, π.χ. T >8 ng/dl ή Free T >0,66 ng/dl ή DHEA >2750 ng/dl. Κλινική υπερανδρογοναιμία ορίζεται με την παρουσία υπερτρίχωσης με FG score >6 (Franks 2002) Phenotypes of PCOS (Chay et al.).

Οι δερματικές εκδηλώσεις της υπερανδρογοναιμίας στο PCOS περιλαμβάνουν υπερτρίχωση, ακμή και ανδρικού τύπου αλωπεκία και η μελανίζουσα ακάνθωση είναι ένας δερματικός δείκτης της υπερινσουλιναϊμίας.

Τα υπερηχογραφικά κριτήρια του PCOS περιλαμβάνουν: η μία ή και οι δύο ωοθήκες να έχουν όγκο πάνω από 10 cm<sup>3</sup> με απουσία ωοθυλακίου διαμέτρου > 10mm ή ωχρού σωματίου και σε κάθε ωοθήκη να υπάρχουν πάνω από 12 ωοθυλάκια διαμέτρου 2-9 mm περιφερικώς διατεταγμένα (Rotterdam, 2003).

Ένα σημαντικό ποσοστό γυναικών με PCOS είναι υπέρβαρες· αρκετές είναι παχύσαρκες και μερικές ακραία παχύσαρκες (Ehrmann et al., 1999). Αν και η παχυσαρκία από μόνη της δε θεωρείται το εκλυτικό αίτιο στην εμφάνιση του συνδρόμου, η αύξηση της παχυσαρκίας χειροτερεύει και τη μεταβολική και την αναπαραγωγική κατάσταση της γυναίκας.

Τα συμπτώματα του PCOS συνήθως ξεκινούν κατά την εμμηναρχή (Ehrmann et al., 1999), αλλά μπορεί να συμβεί και έναρξη μετά την εφηβεία σαν αποτέλεσμα μιάς περιβαλλοντολογικής μεταβολής όπως η αύξηση βάρους. Η πρόιμη εμμηναρχή, το αποτέλεσμα της πρόιμης έκκρισης των επινεφριδιακών στεροειδών, μπορεί να είναι ο πυροδότης του συνδρόμου (Franks, 2002). Επιπλέον, ένα επηρεασμένο ενδομήτριο περιβάλλον έχει ενοχοποιηθεί για την παθογένεια, ιδιαίτερα του μεταβολικού μέρους (συστατικών), του συνδρόμου.



Κανένας αιτιολογικός παράγοντας από μόνος του δεν εξηγεί το φάσμα των ανωμαλιών στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Σε απάντηση της διέγερσης με LH, τα κύτταρα της θήκης στις ωοθήκες συνθέτουν ανδρογόνα. Η βιοσύνθεση των ανδρογόνων γίνεται μέσω του κυτοχρώματος P-450C17, ενός ενζύμου με δραστηριότητες 17α-υδροξυλάσης και 17, 20 λυάσης και οι δύο εκ των οποίων απαιτούνται για το σχηματισμό ανδροστενδιόνης. Κατόπιν τα ανδρογόνα με την 17β υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (17β-HSD) μετατρέπονται σε τεστοστερόνη ή αρωματοποιούνται με το σύστημα της αρωματάσης (κυτόχρωμα P450 arom) σε οιστρόνη.

Μελέτες που έγιναν *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων ωοθηκών της θήκης καταδεικνύουν σταθερά ότι σε γυναίκες με PCOS τα κύτταρα της θήκης είναι πιο ικανά να μετατρέπουν τα πρόδρομα ανδρογόνα σε τεστοστερόνη, παρά τα φυσιολογικά κύτταρα της θήκης (Nelson et al., 1999; Nelson et al., 2001). Καθώς η LH ρυθμίζει τη σύνθεση των ανδρογόνων στα κύτταρα της θήκης, η FSH είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της αρωματάσης των κοκκωδών κυττάρων και κατά συνέπεια καθορίζει πόσα οιστρογόνα θα συντεθούν από τα πρόδρομα ανδρογόνα. Όταν η συγκέντρωση της LH αυξάνει σε σχέση με την FSH οι ωοθήκες τότε συνθέτουν επιλεκτικά ανδρογόνα.

### **Η έκκριση της LH στο PCOS**

Η συχνότητα της διέγερσης της υποθαλαμικής GnRH καθορίζει εν μέρει το σχετικό ποσοστό της LH και της FSH που συνθέτονται στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης. Αυξημένη συχνότητα παλμικής έκκρισης υποθαλαμικής GnRH ευνοεί την αντιγραφή της β υποομάδας της LH σε σχέση με τη β υποομάδα της FSH· αντίστροφα ελαττωμένη συχνότητα παλμικής έκκρισης της GnRH ευνοεί την αντιγραφή της β υποομάδας της FSH η οποία ελαττώνει το πηλίκιο (ratio) της LH/FSH (Haisenlender et al., 1991).

Επειδή οι γυναίκες με PCOS εμφανίζονται να έχουν μια αυξημένη συχνότητα παλμικής έκκρισης LH (Waldstreicher et al., 1988) συμπεραίνεται ότι η συχνότητα παλμικής έκκρισης της GnRH πρέπει να είναι αυξημένη στο PCOS. Δεν είναι σαφές αν αυτή η αυξημένη συχνότητα παλμικής έκκρισης οφείλεται σε

μία εγγενή ανωμαλία του βηματοδότη της GnRH ή οφείλεται στα σχετικά χαμηλά επίπεδα της προγεστερόνης λόγω των αραιών ωοθυλακιορρηξιών. Αφού τα προγεσταγόνα επιβραδύνουν το βηματοδότη της GnRH, τα χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων προγεσταγόνων στις γυναίκες με PCOS μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της παλμικότητας της GnRH (Eagleson et al., 2000), αυξημένα επίπεδα LH και υπερπαραγωγή ωοθηκικών ανδρογόνων. Αυτή η διαταραγμένη παλμικότητα του βηματοδότη της GnRH και η συνεπακόλουθη σταθερά αυξημένη LH, πιθανόν να προκαλείται από την ενδομήτριο ακόμη ζωή του θήλεος εμβρύου, καθώς πληροφορίες από μελέτες σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα δείχνουν ότι η έκθεση νωρίς στη ζωή σε ανδρογόνα μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη έκκριση γοναδοτροφινών. Όταν η έκκριση της LH σε γυναίκες με κλασική συγγενή έλλειψη 21-υδροξυλάσης συγκρίνεται με την έκκριση της LH σε γυναίκες με όψιμη έναρξη της έλλειψης 21-υδροξυλάσης, μόνο οι γυναίκες με τον κλασικό τύπο που είχαν και την πολύ νωρίς επίδραση των ανδρογόνων εμφανίζουν υψηλά επίπεδα κλασικής LH και αυξημένη απάντηση της LH σε GnRH αγωνιστή (Barnes et al., 1994).

Επίσης πειραματικές μελέτες σε ζώα υποστηρίζουν ότι η από νωρίς έκθεση σε ανδρογόνα επιδρά στην έκκριση των γοναδοτροφινών. Όταν θηλυκοί rhesus πίθηκοι εκτεθούν προγενετικά σε προπιονική τεστοστερόνη, ακολούθως αναπτύσσουν παθολογική έκκριση γοναδοτροφινών με αυξημένα επίπεδα LH (Dumesic et al., 1997). Σε μία άλλη μελέτη, θήλεα έμβρυα προβάτου που εκτέθηκαν ενδομητρίως σε τεστοστερόνη, παρουσίασαν παρόμοιο τρόπο έκκρισης της LH, με γυναίκες με PCOS. Κατά την επερχόμενη εφηβεία τους, τα θήλεα πρόβατα εμφάνισαν μεγάλες πολυκυστικές ωοθήκες, υπερανδρογοναιμία, ανώμαλους καταμήνιους κύκλους, αυξημένα επίπεδα LH και αυξημένη συχνότητα παλμικής έκκρισης LH (Robinson et al., 1999). Ενδιαφέρον επίσης είναι, ότι τα θήλεα αυτά πρόβατα, εμφάνισαν επηρεασμένους μηχανισμούς παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback) στην E2 και στην P, φαινόμενο που παρατηρείται σταθερά στις γυναίκες με PCOS. Λεπτομερές ιστορικό των γυναικών με PCOS αποκαλύπτει ότι η διαταραχή ξεκινά αμέσως μετά την εμμηναρχή στις περισσότερες και κανονικοί κύκλοι δεν επέρχονται ποτέ. Όταν δεν γίνουν φυσιολογικοί και ωοθυλακιορρηκτικοί μέσα σε 2 έτη από την

εμμηναρχή, τότε μπορεί αυτές οι ανωμαλίες να εμμένουν και στην ενήλικη ζωή. Το προεφηβικό φυσιολογικό κορίτσι εμφανίζει αύξηση του εύρους του παλμού LH κατά τη διάρκεια του ύπνου σε σχέση με τις ώρες της εγρήγορσης. Σε αντίθεση, στο προεφηβικό υπερανδρογοναιμικό κορίτσι η LH έχει μεγαλύτερο εύρος παλμού τη διάρκεια της ημέρας, σε σχέση με το φυσιολογικό κορίτσι και επομένως μικρότερη διαφορά ύπνου / εγρήγορσης. Για τα -μετά την εμμηναρχή- υπερανδρογοναιμικά κορίτσια παρατηρείται αντιστροφή του τύπου παλμικής έκκρισης της LH εγρήγορση / ύπνος με υψηλότερη παλμική δραστηριότητα της LH σε εγρήγορση και χαμηλότερη σε ύπνο.

Αν οι έφηβες (νεανίδες) προορίζονται να αναπτύξουν PCOS, είναι σχετικά ανθεκτικές στην ανασταλτική δράση της προγεστερόνης στην έκκριση της GnRH, και οι αρχικές μικρές αυξήσεις της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια των πρώτων ανωοθυλακιορρηκτικών κύκλων δεν ελαττώνουν την παλμικότητα της GnRH έκκρισης. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε μια σχετική έλλειψη της έκκρισης FSH και επομένως σε αρνητικά επηρεασμένη ωοθυλακική ωρίμανση. Η διέγερση της υπόφυσης με ταχείας παλμικότητας GnRH αυξάνει τη σύνθεση και την έκκριση της LH με επακόλουθο την αυξημένη παραγωγή ωοθηκικών ανδρογόνων. Αυτή η σκέψη αποδείχθηκε σε μελέτες νεανίδων με υπερανδρογοναιμία και σ' αυτές το εύρος και η συχνότητα των παλμών της LH είναι αυξημένα, σε σύγκριση με μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και σταδίου ενηβώσεως (Apter et al., 1994). Τα αυξημένα επίπεδα της LH οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων από την ωοθήκη. Μελέτες που έκαναν χρήση GnRH αγωνιστών ώστε να απευαισθητοποιήσουν την υπόφυση στην έκκριση της LH, έδειξαν ελάττωση των επιπέδων της LH αλλά και της ανδροστενδιόνης και της τεστοστερόνης, υποστηρίζοντας έτσι το ρόλο της LH στην ανώμαλη παραγωγή ανδρογόνων από την ωοθήκη (Chang et al., 1983). Η μελέτη του Eagleson et al., 2000, έδειξε ότι η θεραπεία με αντιανδρογόνα (φλουταμίδα) για 5 εβδομάδες επαναφέρει την ευαισθησία του βηματοδότη της GnRH στην αρνητική παλλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback) από την E2 και την προγεστερόνη. Επίσης, έδειξε ότι η συνεχιζόμενη έκθεση του υποθαλάμου σε αυξημένα ανδρογόνα, είναι σημαντικός παράγοντας για τη διατήρηση της ανώμαλης παλλίνδρομης ρύθμισης από την E2 και την προγεστερόνη.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι συχνή και εμφανίζεται στο 30% των λεπτών γυναικών με PCOS και στο 75% των παχύσαρκων γυναικών με PCOS και αυτή σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για Σ.Διαβήτη τύπου II, δυσλιπιδαιμία και δυνητική καρδιαγγειακή νόσο. Το 30-40% των γυναικών με PCOS έχουν παθολογική καμπύλη γλυκόζης και το 10% έχουν Σ.Διαβήτη τύπου II στην τέταρτη δεκαετία της ζωής, το υψηλότερο ποσοστό για γυναίκες αυτής της ηλικίας (Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 1999; Krosnick, 2000).

Και in vivo και in vitro μελέτες έχουν αποδείξει ότι η υπερινσουλιναιμία προάγει τη σύνθεση ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης στην ωθήκη, δρώντας συνεργικά με την LH. Η ινσουλίνη διεγείρει απευθείας την παραγωγή ανδρογόνων από την ωθήκη και τα επίπεδα της T πέφτουν σε γυναίκες με PCOS όταν χορηγείται διαζοξίδη που αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης. Επίσης, ελαττώνει την ηπατική σύνθεση της SHBG της πρωτεΐνης που δεσμεύει την τεστοστερόνη, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό της αδέσμευτης και βιολογικά δραστικής τεστοστερόνης. Ο Velazquez et al. πρώτοι χρησιμοποίησαν τη μετφορμίνη στο PCOS και έδειξαν μια ελάττωση στα επίπεδα της ινσουλίνης και της τεστοστερόνης και βελτίωση της περιοδικότητας του καταμήνιου κύκλου. Το διγουανίδιο μετφορμίνη αναστέλλει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και βελτιώνει την περιφερική ιστική ευαισθησία στην ινσουλίνη με αποτέλεσμα την ελάττωση της έκκρισης ινσουλίνης. Η μετφορμίνη είναι λιγότερο δραστική στη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη όταν ο BMI είναι  $> 30 \text{ kg/m}^2$ . Ο βηματοδότης της GnRH είναι λιγότερο ευαίσθητος στις γυναίκες με PCOS στην καταστολή με ωθηκικά στεροειδή και η μετφορμίνη δεν αυξάνει την υποθαλαμική ευαισθησία στις αρκετά παχύσαρκες γυναίκες με PCOS. Στη μελέτη Πανίδη δεν βρέθηκε συσχετισμός της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και στην έκκριση γοναδοτροφινών.

Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικά παραδείγματα αποκάλυψαν ελαττωμένη ευαισθησία στην καταστολή της LH (ειδικά στη συχνότητα του παλμού) από την E2 και την προγεστερόνη (Pastor et al., 1998; Daniels and Berga 1997). Έτσι, η επηρεασμένη ευαισθησία του βηματοδότη της GnRH, που δεν μπορεί να ανασταλεί από τα ωθηκικά στεροειδή, ίσως εν μέρει να είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη αυξημένη συχνότητα παλμού της LH

στις γυναίκες με PCOS, αν και οι μηχανισμοί της ελαττωμένης ευαισθησίας δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένοι. Οι περισσότερες γυναίκες με PCOS κάνουν ωοθυλακιορρηξία 3-5 φορές ανά έτος και τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι χαμηλά. Έτσι η ταχεία παλμική έκκριση της LH και συνεπώς και της GnRH, εν μέρει οδηγεί σε ανωοθυλακιορρηξία και ελαττωμένη προγεστερονική επίδραση στον υποθάλαμο. Όμως μελέτες έδειξαν ότι ο έλεγχος της GnRH έκκρισης στο PCOS είναι παθολογικός και μπορεί εκεί να οφείλεται η σταθερά αυξημένη παλμικότητα της έκκρισης της LH (Marshall and Eagleson, 1999). Η συχνότητα και το εύρος των παλμών της έκκρισης της GnRH μπορεί να ανασταλεί με κατάλληλα ποσά εξωγενούς προγεστερόνης και με την απόσυρση των ωοθηκικών στεροειδών, να συμβεί μια παροδική επιλεκτική αύξηση στην FSH η οποία μπορεί να εισάγει ένα βαθμό ωοθυλακικής ωρίμανσης (Christman et al., 1991). Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε γυναίκες με PCOS η ευαισθησία του μηχανισμού παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback) της προγεστερόνης στον υποθάλαμο είναι αρνητικά επηρεασμένη. Μετά τη χορήγηση συνδυασμένων αντισυλληπτικών από το στόμα, η συχνότητα της παλμικής έκκρισης της LH ελαττώνεται σε μικρότερο βαθμό απ' ό,τι σε φυσιολογικές ωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες (Daniels and Berga, 1997). Σε μελέτες που εξέτασαν την αναστολή της συχνότητας της παλμικότητας της GnRH αποδείχθηκε ότι είναι διαφορετικές οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης που απαιτούνται στο πλάσμα και επίπεδα κάτω από 10 ng/ml αποδείχθηκαν μη ικανά σε γυναίκες με PCOS να αναστείλουν αυτή την αυξημένη συχνότητα της GnRH (Pastor et al., 1998).

Μετά την εφηβική ωρίμανση στις γυναίκες, ο υποθάλαμος λειτουργεί σαν ένας αυτόνομος βηματοδότης, με συχνότητα παλμών που τροποποιείται από τα σήματα των ωοθηκών (Buffet and Bouchard, 2001) και με έμφυτη μέγιστη πυροδοτική συχνότητα περίπου ένα παλμό ανά ώρα σε απουσία ωοθηκικού περιορισμού (Marshall et al., 1991). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι καθώς η GnRH ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της φολλιστατίνης (Kirk et al., 1994), αυτή τροποποιείται από τη μεταβολή της συχνότητας των παλμών της GnRH. Ταχεία συχνότητα παλμών GnRH διεγείρει την έκφραση των γονιδίων της φολλιστατίνης. Η φολλιστατίνη δεσμεύει και απενεργοποιεί την ακτιβίνη, οδηγώντας έτσι σε ελαττωμένη έκκριση FSHβ, mRNA και FSH (Miller et al.,

2002). Γι' αυτό, για την έκκριση της FSH, απαιτείται πιο αργός ρυθμός παλμού της GnRH (< 1/ώρα) (Mather et al., 2001) και η FSH διαδοχικά είναι ο εντολέας για την ωοθυλακική ωρίμανση και συνεπώς την ωορρηξία. Οι ανώμαλοι κύκλοι και η ανωοθυλακιορρηξία στις γυναίκες με PCOS χαρακτηρίζονται από την αναστολή της αύξησης των ωοθυλακίων με άντρο και γι αυτό υποτέθηκε ότι μιιά σχετική έλλειψη της FSH συμβάλλει στην παραμονή του προβλήματος (Franks, Mason and Willis, 2000; Doi et al., 2005). Από τότε που ο αποδείχθηκε ο ωοθηκικός περιορισμός και η επακόλουθη μείωση της συχνότητας του παλμού της GnRH μέσω της προγεστερόνης, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη δραστηριότητα των υποθαλαμικών οπιοειδών, υποτέθηκε ότι (Marshall et al., 1992; Chabbert-Buffeta et al., 2000) το PCOS τελικά αντανακλά σε διαταραχές στους E2-P4/Οπιοειδή/GnRH νευρικούς μηχανισμούς παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback mechanisms), με αποτυχία να εγκαταστήσουν την επιβράδυνση και έχοντας σαν αποτέλεσμα μια εμμένουσα αυξημένη συχνότητα GnRH, η οποία ελαττώνει την FSH, με συνεπακόλουθο την ανώμαλη ωρίμανση των ωοθυλακίων. Κόντρα σ' αυτή την υπόθεση, όμως υπάρχουν δεδομένα που συνιστούν ότι η έλλειψη της FSH δεν είναι το πραγματικό πρόβλημα στο PCOS. Αν και υπάρχει απόδειξη της μειωμένης ευαισθησίας του βηματοδότη της GnRH στους ανασταλτικούς μηχανισμούς παλλίνδρομης ρύθμισης (feedback mechanisms) της E2 και της προγεστερόνης (Pastor et al., 1998), αυτή φαίνεται να οφείλεται στα ανδρογόνα (Eagleson et al., 2000), τα οποία είναι αυξημένα ακόμη και στους κύκλους με ωοθυλακιορρηξία στο PCOS. Επιπλέον, αυξημένα ανδρογόνα σχετίζονται και με αυξημένο εύρος παλμού GnRH ή υψηλά επίπεδα LH, παρά με αυξημένη συχνότητα GnRH ή χαμηλή FSH (Patel et al., 2004) και τα επίπεδα FSH στον ορό των γυναικών με PCOS, δεν είναι σημαντικά διαφορετικότερα από εκείνα των υγιών γυναικών στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση (Fauser et al., 1991). Γι' αυτό είναι πιθανόν ότι υπάρχει, είτε μια αναστολή της μετατροπής του σήματος στον υποδοχέα της FSH, είτε βλάβη στους μηχανισμούς σηματοδότησης της FSH στα κοκκώδη κύτταρα των PCOS ωοθηκών, παρά μια αποτυχία του υποθαλαμικού περιορισμού (Erickson et al., 1992). Το αν ένας κύκλος σε γυναίκα με PCOS είναι ωορρηκτικός ή όχι εξαρτάται από το λόγο E2/Προγεστερόνη στην ωοθυλακική φάση (Doi et al.,

2005) και φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από τα επίπεδα της FSH και της LH. Οι απόλυτες τιμές της E2 δεν είναι εκείνες που σχετίζονται με αποτυχία της ωοθυλακικής ωρίμανσης πέραν του σταδίου του άντρου, αλλά οι σχετικά υψηλότερες τιμές της E2, από εκείνες της προγεστερόνης στην ωοθυλακική φάση του κύκλου (Doi et al., 2005). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η E2 από μόνη της δεν έχει σπουδαιότητα για την ανθρωπεια ωοθυλακιογένεση (Palter et al., 2001) και μπορεί να οδηγήσει και σε ανοωθυλακιορρηξία σε αρχικές μελέτες (Richardson et al., 1992), ενώ η ωοθυλακική ωρίμανση και ωοθυλακιορρηξία μπορεί να διευκολυνθεί από την προγεστερόνη (Batista et al., 1992; Graham and Clarke, 1997). Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετές αναφορές, ότι η προγεστερόνη έχει αρνητικές επιδράσεις στην ωρίμανση του ωαρίου και τη γονιμότητα, είναι βλαπτική στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου και ο υψηλός λόγος Προγεστερόνη/E2, που ονομάζεται πρόιμη ωχρινοποίηση, έχει αρνητική επίδραση στη γονιμότητα. Αυτή όμως, είναι μάλλον αποτέλεσμα της αρνητικής επίδρασης στην υποδεκτικότητα του ενδομητρίου παρά στην ποιότητα του ωαρίου ή του εμβρύου (Shulman et al., 1996). Πράγματι, επιτυχείς εγκυμοσύνες συμβαίνουν και με υψηλά βασικά επίπεδα προγεστερόνης (Furuhashi et al., 2002) και η πρόιμη ωχρινοποίηση έχει δείξει ότι αντανakλά σε υγιή ανάπτυξη του ωοθυλακίου και σε αυξημένα ποσοστά εγκυμοσύνης σε δότριες ωαρίων (Legro et al., 1993). Η προγεστερόνη μπορεί επομένως να δρά αντιροπώντας την αρνητική δράση της E2 και έτσι ένας χαμηλός λόγος προγεστερόνης/E2 να αντανakλά σε ανάμειξη της E2 με την ωοθυλακιογένεση. Στην ωοθυλακική φάση του ανθρώπινου κύκλου, η προγεστερόνη του ορού είναι κυρίως επινεφριδιακής προέλευσης (Judd et al., 1992; De Geyter et al., 2002) κάτω από ωοθηκική ρύθμιση όμως, αφού η ωοθηκική καταστολή με αιθυνολοιστραδιόλη ελαττώνει και την επινεφριδιακή παραγωγή προγεστερόνης (De Geyter et al., 2002). Επιπλέον, σε σύγκριση καλλιέργειας ανθρώπων κυττάρων της θήκης από PCOS και από υγιείς γυναίκες, αποδείχθηκε αυξημένη μετατροπή της προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη στις PCOS (Gilling-Smith et al., 1994). Αν αυτή η μετατροπή συμβαίνει επίσης και στα επινεφρίδια, τότε ένας κοινός ωοθηκικός παράγοντας θα μπορούσε να υπολογιστεί σαν ο υπεύθυνος γι' αυτή τη σχετική έλλειψη προγεστερόνης στο PCOS. Περαιτέρω in vitro μελέτες απέδειξαν

ότι στα κύτταρα της θήκης γυναικών με PCOS, η ικανότητα να εκκρίνουν προγεστερόνη, όταν προκαλούνται από μεγίστη δραστική δόση FSH και/ή IGF-1, μειώνεται σημαντικά (8-10 φορές), σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κοκκώδη κύτταρα (Erickson et al., 1992). Αυτό είναι σε μεγάλη αντίθεση με την απάντηση της E2 η οποία είναι παρόμοια στα κοκκώδη κύτταρα των PCOS και των υγιών γυναικών (Erickson et al., 1992). Επιπλέον, τα ανθρώπινα κοκκώδη ωχρινικά κύτταρα από PCOS ωοθήκες, όταν επωάζονταν με ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες με PCOS, αύξαναν λιγότερο την παραγωγή προγεστερόνης σε σχέση με εκείνα των υγιών γυναικών (Andreani et al., 1996), δείχνοντας μια ανωμάλως ελαττωμένη ικανότητα να συνθέσουν προγεστερόνη και *in vivo in* και *in vitro* (Doldi et al., 1998). Αυτό συνιστά στην ύπαρξη ενός ωοθηκικού παράγοντα στις γυναίκες με PCOS, που διεγείρει την μετατροπή της προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη, παρά σε μια μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης.

Η έκκριση της προγεστερόνης από τα επινεφρίδια δεν είναι υποχρεωτική για την ωοθυλακική ανάπτυξη, αφού σε προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες με επινεφριδιακή ανεπάρκεια και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα προγεστερόνης, παρατηρήθηκαν φυσιολογικοί κύκλοι (Gebre-Medhin et al., 2000) και αυτό συνιστά ότι η προγεστερόνη πιθανά απαιτείται, μόνο για να αντιροπήσει την αρνητική επίδραση της E2. Αυτός ο μηχανισμός δράσης έχει διαπιστωθεί και στην *in vitro* ωρίμανση και κατόπιν IVF χοίρειων ωοκυττάρων, όπου η E2 αναστέλει και την πυρηνική και την κυτταροπλασματική ωρίμανση, γεγονός που μπορεί να προληφθεί με την προγεστερόνη (Li et al., 2004). Στη μελέτη του Doi et al., 2005 όπου μετρήθηκαν τα ωοθηκικά στεροειδή και οι γοναδοτροφίνες στην ωοθυλακική φάση του κύκλου σε γυναίκες με PCOS, αδύνατες και παχύσαρκες και συσχετίστηκαν με την επακόλουθη ή μη ωορρηξία, βρέθηκε ότι οι παχύσαρκες γυναίκες με PCOS και αραιομηνόρροια είχαν υψηλότερα επίπεδα E2 στην κυκλοφορία σε σχέση με την προγεστερόνη, από ότι οι αδύνατες γυναίκες, συνιστώντας ότι ο αυξημένος BMI οδηγεί σε ισορροπημένη αύξηση στην παραγωγή της E2 (πιθανά μέσω περιφερικής E2 παραγωγής) (Nelson and Bulum, 2001) με αναστολή της παραγωγής προγεστερόνης από τα επινεφρίδια. Το τελευταίο μπορεί να εξηγηθεί μέσω της αντίστασης στην ινσουλίνη και έχει δειχθεί ότι οι αντιδιαβητικοί παράγοντες που βελτιώνουν την ευαισθησία των



ιστών στην ινσουλίνη, καθώς και τα χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα, βοηθούν στη βελτίωση της ωορρηκτικής δυσλειτουργίας στις γυναίκες με PCOS (Sattar et al., 1998; Loverro et al., 2002; Seli and Duleba, 2002) και αυτή η δράση τους είναι ανεξάρτητη από την απώλεια βάρους (Ehrmann et al., 1997; Hasegawa et al., 1999). Αν και οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της E2 μετά τη θεραπεία με μετφορμίνη (Ibanez et al., 2001; Ibanez et al., 2002), και η μετφορμίνη και η υποθερμιδική δίαιτα (Pasquali et al., 2000) έχουν σχετισθεί με αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης (αν και μη στατιστικά σημαντικές εξαιτίας της ευρείας μεταβλητότητας στην τελευταία μελέτη). Είναι πιθανό, η θεραπεία με μετφορμίνη να έχει σαν αποτέλεσμα την ωορρηξία μέσω και της αύξησης των επιπέδων της προγεστερόνης και της ελάττωσης της δραστηριότητας της αρωματάσης (Ia Marca et al., 2002), επαναφέροντας έτσι το λόγο Προγεστερόνη/E2 στη φυσιολογική αναλογία. Πράγματι, η θεραπεία με μετφορμίνη μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα της 17-α υδροξυλάσης και της 17,20-λυάσης στα επινεφρίδια, συνιστώντας ένα μηχανισμό για την αύξηση της προγεστερόνης σε σχέση με την E2 (Ia Marca et al., 1999). Μια θετική επίδραση στο λόγο Προγεστερόνη/E2 μπορεί να υποτεθεί και για διάφορες άλλες θεραπείες, όπως π.χ τους αναστολείς της αρωματάσης που έχουν παρόμοια δράση, χωρίς επίπτωση στο πάχος του ενδομητρίου ή στην μεσοκύκλιο αιχμή (Mitwally and Casper, 2001, Mitwally and Casper, 2002; Fisher et al., 2002). Επίσης, η αναστολή της δραστηριότητας του CYP17 από την κετοκοναζόλη έχει βρεθεί ότι αυξάνει την απαντητικότητα στην κλομιφένη στις γυναίκες με PCOS (Ali Hassan et al., 2001). Ομοίως, σε αυτές τις γυναίκες υπάρχει αύξηση της προγεστερόνης σαν αποτέλεσμα της αναστολής του CYP17.

Αυτά τα ευρήματα εξηγούν γιατί οι αδύνατες ανωορρηκτικές γυναίκες (που έχουν κυρίως ωοθηκική E2), πάνε καλά με θεραπείες που ελαττώνουν την ωοθηκική E2 όπως ο ωοθηκικός καυτηριασμός (Greenblatt and Casper, 1987; Gjonnaess, 1994; Duleba et al., 2003; Amer et al., 2004), ενώ οι παχύσαρκες ανωορρηκτικές γυναίκες ( με περιφερική παραγωγή E2) συνήθως πάνε καλύτερα με θεραπείες που αυξάνουν την FSH μέσω γοναδοτροφινών (Vicino et al., 2000) ή μέσω κλομιφένης (Lopez-Lopez et al., 1987; Ficicioglu et al., 1996) και αυτό δε

σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή προγεστερόνης (Judd et al.,1992) αλλά με υπερίσχυση της FSH στην E2.

## **Η παραγωγή των ινχιμπινών A και B στις γυναίκες με PCOS**

Τα μοντέλα έκκρισης των ινχιμπινών κατά τη διάρκεια του κύκλου στις γυναίκες συνιστούν ότι στην αρχική ωοθυλακική φάση η ινχιμπίνη B σημαίνει την ποσότητα και την ποιότητα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, ενώ η ινχιμπίνη A αντανακλά την ωοθυλακική ωριμότητα (Groome et al., 1996; Welt et al.,1997; Groome et al., 1994; Lambert-Messerlian et al., 1994). Όμως, στις γυναίκες με PCOS, αυξημένα επίπεδα ινχιμπίνης B δεν αποδείχθηκαν σε σταθερό εύρημα σε όλες τις μελέτες. Αρκετές μάλιστα, έδειξαν ανάλογα επίπεδα ινχιμπίνης B στις γυναίκες με PCOS με εκείνα που παρατηρούνται στις υγιείς (Laven and Fauser, 2004; Welt et al., 2005; Torgac et al., 2005; Laven et al., 2001; Magoffin et al., 1998). Αυτά τα αποτελέσματα περιέπλεξαν την επιστημονική κοινότητα, καθότι ο μεγαλύτερος αριθμός μικρών ωοθυλακίων, στο στάδιο πριν το άντρο και στο στάδιο του άντρο, που παρατηρούνται στις γυναίκες με PCOS, αναμένονταν να παράγουν και περισσότερη ινχιμπίνη B. Έχει περιγραφεί επίσης ότι τα αυξημένα επίπεδα LH στις γυναίκες με PCOS διεγείρουν την ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων και έτσι η τελική τους διαφοροποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την ελαττωμένη ικανότητα για παραγωγή ινχιμπίνης (Welt et al., 2005).

Στις γυναίκες με PCOS όμως, η διέγερση με FSH προκαλεί πολύ μεγαλύτερη και ταχύτερη αύξηση στα επίπεδα της ινχιμπίνης B από ότι στις υγιείς γυναίκες κατά τη διάρκεια της μέσης ωοθυλακικής φάσης (Wachs et al.,2006) και αυτή είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα της A, T, LH, insulin, SHBG και το BMI. Τονίζεται αυτό το γεγονός, διότι τα επίπεδα της κυκλοφορούσης ινχιμπίνης B είναι αντίστροφα σχετιζόμενα με το BMI και τα επίπεδα της ινσουλίνης στον ορό και θετικά σχετιζόμενα με τα επίπεδα της SHBG και της LH (Welt et al., 2002). Η ταχύτερη και μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα της ινχιμπίνης B οφείλεται στα περισσότερα μικρά ωοθυλάκια των γυναικών με PCOS.

Αντίθετα με τα επίπεδα της ινχιμπίνης Β, τα επίπεδα της ινχιμπίνης Α στις γυναίκες με PCOS, αυξάνουν βαθμιαία και παρόμοια με των υγιών γυναικών μετά τη διέγερση με την FSH (Wachs et al., 2006; Hohmann et al., 2005; Yong et al., 2003). Η διέγερση έγινε με απουσία επικρατούντος ωοθυλακίου ή ωχρού σωματίου και επομένως αυτά ήταν και τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες με PCOS παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές LH και αυξημένη ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να συμβάλει στη διερεύνηση αυτής της διαταραχής. Διερευνήθηκαν οι εξής υποθέσεις: 1) Η παραγωγή του GnSAF, του παράγοντα που αμβλύνει το κύμα της LH και ανταγωνίζεται τη δράση της E2 στην υπόφυση, είναι ελαττωμένη στο PCOS. 2) Υπάρχει διαφορετική λειτουργικότητα στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκών των γυναικών με PCOS με αποτέλεσμα διαφορετική έκκριση στεροειδών και μή ουσιών από αυτά. 3) Υπάρχει διαταραχή στο υποθαλαμο-υπόφυσιικό επίπεδο σε αυτές τις γυναίκες και οποιαδήποτε αύξηση της παραγωγής του GnSAF ή εξωγενής χορήγηση προγεστερόνης δεν επιφέρει καμία μεταβολή.

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δέκα (n=10) γυναίκες με PCOS (ηλικίας  $24.5 \pm 2.1$  έτη) και οκτώ (n=8) γυναίκες με φυσιολογικούς καταμήνιους κύκλους (ηλικίας  $31.5 \pm 1.0$  έτη) (ομάδα μαρτύρων) συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη, αφού πρώτα ενημερώθηκαν και συνένεσαν γραπτώς. Η μελέτη είχε τύχει της έγκρισης του Επιστημονικού Συμβουλίου του Α.Γ.Ν.Ν.Βόλου. Για τη διάγνωση του PCOS χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια που ορίστηκαν στην αναθεωρητική για το PCOS σύνοδο του Ρότερνταμ το 2003 (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group). Οι γυναίκες με PCOS που ήταν η ομάδα μελέτης είχαν BMI  $26 \pm 2.5$  Kg/m<sup>2</sup> και οι γυναίκες που είχαν φυσιολογικούς κύκλους και απαρτίζαν την ομάδα ελέγχου, ήταν υγιείς, είχαν BMI  $21 \pm 1.2$  Kg/m<sup>2</sup> και δεν είχαν χρησιμοποιήσει κανένα είδος ορμονικής αντισύλληψης και κανενός είδος θεραπείας για τους τελευταίους 6 τουλάχιστον μήνες. Τα χαρακτηριστικά των 18 αυτών γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη φαίνονται στον **Πίνακα 4**.

**Πίνακας 4:** Τα χαρακτηριστικά των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη (n=10 στην ομάδα μελέτης με PCOS και n=8 στην ομάδα ελέγχου). Οι τιμές παριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  πιθανό σφάλμα (mean  $\pm$  SEM).

	PCOS	Control
<b>Age (years)</b>	24.5 $\pm$ 2.1	31.5 $\pm$ 1.0
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.0 $\pm$ 2.5	21.0 $\pm$ 1.1
<b>FSH (IU/l)</b>	6.0 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 1.7
<b>LH (IU/l)</b>	15.5 $\pm$ 3.8	8.7 $\pm$ 0.6
<b>Estradiol (pg/ml)</b>	53.4 $\pm$ 6.0	15.4 $\pm$ 1.7
<b>Progesterone (ng/ml)</b>	1.2 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.07
<b>Inhibin A (pg/ml)</b>	24.9 $\pm$ 10.5	74.6 $\pm$ 14.4
<b>Inhibin B (pg/ml)</b>	169.5 $\pm$ 24.7	196.4 $\pm$ 32.8

Όλες οι γυναίκες συμμετείχαν στην ίδια πειραματική διαδικασία διάρκειας 6 ημερών. Οι γυναίκες με PCOS συμμετείχαν στην πειραματική διαδικασία δύο φορές, την 1<sup>η</sup> που ήταν πριν τη χορήγηση προγεστερόνης (ομάδα μελέτης 1 PCOS) και τη 2<sup>η</sup> που ήταν μετά τη χορήγηση μικροκρυσταλλικής προγεστερόνης (Utrogestan 100mg) για 20 ημέρες (ομάδα μελέτης 2 PCOS), ενώ οι γυναίκες της ομάδας ελέγχου μόνο μία (ομάδα ελέγχου). Οι γυναίκες κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου έφεραν φλεβοκαθετήρα 18G, ο οποίος ηπαρινιζόταν και ξεπλένονταν με φυσιολογικό ορό πριν και μετά τις αιμοληψίες.

Κάθε πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την υποδόριο ένεση μιάς μοναδικής δόσης 450 IU ανασυνδυασμένης FSH (Puregon 150 IU, Organon Hellas, Greece) και πολλαπλές i.v. ενέσεις GnRH των 10 $\mu$ g η κάθε μία (Relefact LH-RH 0,1mg/ml Hoechst, Germany). Η ημέρα της ένεσης της FSH καθορίστηκε ως ημέρα 1 της πειραματικής περιόδου (9.00). Η πρώτη δόση της GnRH ενέθηκε

το πρωί λίγο πριν την ένεση της FSH και οι επόμενες δύο κάθε 12 ώρες. Κατόπιν οι δόσεις της GnRH ενίονταν κάθε 24 ώρες για τις επόμενες 5 ημέρες. Τα δείγματα αίματος σε σχέση με την κάθε ένεση GnRH συλλέχθηκαν στα -15,0 και +30 πρώτα λεπτά. Ο χρόνος 0 ήταν ακριβώς πριν τη χορήγηση της GnRH. Ο χρόνος + 30' επιλέχθηκε επειδή θεωρείται η μέγιστη απάντηση της υπόφυσης στη GnRH και στις προ- και στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αναπαριστώντας την ευαισθησία της υπόφυσης (Lasley et al., 1975; Wang et al., 1976; Messinis and Templeton, 1991). Η πειραματική διαδικασία στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών έλαβε χώρα κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση ενός φυσιολογικού κύκλου, αρχίζοντας από τη 2<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου. Η πρώτη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στην ομάδα μελέτης -1 των γυναικών με PCOS, απείχε τουλάχιστον 20 ημέρες από την πρώτη ημέρα της τελευταίας εμμηνορυσίας των γυναικών αυτών και κατά την οποία επιβεβαιωνόταν, αρχικά υπερηχογραφικά η απουσία ωοθυλακικής ωρίμανσης ή ωχρού σωματίου και κατόπιν εργαστηριακά με τη λήψη περιφερικού αίματος και τη μέτρηση των επιπέδων της E2 και της PRG στον ορό. Η πειραματική διαδικασία στην ομάδα μελέτης -2 των γυναικών με PCOS έλαβε χώρα αμέσως μετά το πέρας της θεραπείας 20 ημερών με την από του στόματος χορήγηση μικροκρυσταλλικής προγεστερόνης (Utrogestan capsules, 100mg progesterone; Faran, Greece) στην ημερήσια δόση των 300mg (100mg το πρωί και 200mg το βράδυ). Η χορήγηση της προγεστερόνης άρχισε την επομένη ημέρα από το πέρας της πρώτης πειραματικής περιόδου στις γυναίκες με PCOS (ομάδα μελέτης -1 γυναικών με PCOS) και η πειραματική διαδικασία στην ομάδα μελέτης-2 γυναικών με PCOS) την επομένη ημέρα του τέλους της χορήγησης της προγεστερόνης. Στα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της FSH, LH, E2, PRG, INHIBIN A και INHIBIN B. Ο μέσος όρος των τιμών των παραπάνω ορμονών στους χρόνους -15' και 0 θεωρήθηκαν τα βασικά τους επίπεδα. Η απάντηση της LH και της FSH στη GnRH ( ΔLH και ΔFSH αντίστοιχα) ορίζεται η καθαρή αύξηση των τιμών τους από τις βασικές στα 30' (χρόνος +30).



## ΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι μετρήσεις των επιπέδων της FSH, της LH, της INHIBIN A και της INHIBIN B στον ορό των γυναικών έγιναν χρησιμοποιώντας την ενζυμική ανοσοχημική μέθοδο (FSH ELISA, LH ELISA, INHIBIN A ELISA και INHIBIN B ELISA αντίστοιχα, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA). Η μέτρηση των επιπέδων της E2 και της PRG στον ορό των γυναικών έγινε με τη χρήση ενζυμικής ανοσομεθόδου (Estradiol ELISA και Progesterone ELISA αντίστοιχα, DRG Instruments GmbH, Marburg/Lahn, Germany). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε IU/l για την FSH και την LH, σε pg/ml για την E2, την ινχιμίνη A και την ινχιμίνη B και σε ng/ml για την PRG. Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης για την FSH, την LH, την E2, την PRG, την ινχιμίνη A και την ινχιμίνη B αντίστοιχα ήταν 0.01IU/l, 0.01IU/l, 4.6 pg/ml και 0.05 ng/ml, 1.0pg/ml και 7.0pg/ml. Οι διαμεθοδολογικοί (interassay) και ενδομεθοδολογικοί (intraassay) συντελεστές μεταβλητότητας ήταν 2.8 και 2.5%, 7.6 και 5.6%, 6.5 και 4.8%, 1.9 και 6.3%, 4.8 και 4.6%, &.1 και 3.3% και 6.6 και 4.6% αντίστοιχα.

## Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Οι τιμές των ορμονών ήταν κανονικά κατανοημένες (one sample Kolmogorone-Smirnov test). Η στατιστική ανάλυση έγινε με την ενός τρόπου ανάλυση της μεταβλητής (ANOVA) ακολουθούμενη από το post hoc test του Bonferroni, t-test ζευγών και ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με προσαρμογές Geisser-Greenhouse ακολουθούμενες από το Bonferroni post hoc testing. Όλες οι τιμές εκφράστηκαν σαν μέσος όρος  $\pm$  πιθανό σφάλμα (mean  $\pm$  SEM). Ένα  $\alpha$  επίπεδο του 0,05 χρησιμοποιήθηκε για να εκφράσει τη στατιστική σημαντικότητα. Το στατιστικό πακέτο λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η απάντηση της LH στη GnRH, υπολογίστηκε ως η καθαρή αύξηση στα 30' (ΔLH) από τη βασική τιμή (μέσος όρος των τιμών στους -15 και 0 χρόνους). Οι τιμές της ΔLH ήταν σημαντικά υψηλότερες την ημέρα 1, πριν την ένεση της FSH, στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σχέση με την ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και την ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 2) δείχνοντας μια αυξημένη απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH των γυναικών με PCOS.

Στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS), οι τιμές της ΔLH έδειξαν μία τάση προς μείωση μέχρι την ημέρα 2, αυξανόμενες σημαντικά κατόπιν ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 2). Στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control), οι τιμές της ΔLH ελαττώθηκαν σημαντικά μέχρι τις ημέρες 2 και 3 ( $p < 0.05$ ), αυξανόμενες σημαντικά κατόπιν και σε αυτές τις δύο ομάδες ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 2). Οι τιμές της ΔLH παρέμειναν υψηλότερες στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) τις ημέρες 2 και 5 σε σύγκριση με τις τιμές στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) ( $p < 0.05$ ) και τις ημέρες 2.5 και 6 σε σύγκριση με την ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 2). Οι τιμές της ΔLH ήταν παρόμοιες στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control), με εξαίρεση την 6<sup>η</sup> ημέρα όπου οι τιμές της ΔLH ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) (Σχήμα 2).

Οι βασικές τιμές της FSH στις ομάδες 1 και 2 των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS, Exp-2-PCOS) ήταν παρόμοιες με αυτές της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών. Οι τιμές της FSH αυξήθηκαν σημαντικά μέσα στις πρώτες 24 ώρες από την ένεση της ανασυνδυασμένης FSH ( $p < 0.05$ ) και κατόπιν ελαττώθηκαν βαθμιαία ( $p < 0.05$ ) και στις 3 πειραματικές ομάδες. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της

FSH σε κανένα χρονικό σημείο μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων (Σχήμα 3).

Οι βασικές τιμές της LH πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα -1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) ( $p < 0.05$ ), αλλά μετά τη θεραπεία με προγεστερόνη οι τιμές της LH ελαττώθηκαν και έγιναν παρόμοιες με εκείνες της ομάδας ελέγχου. Έτσι οι βασικές τιμές της LH ήταν παρόμοιες στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) (Σχήμα 4). Οι τιμές της LH ελαττώθηκαν βαθμιαία και σημαντικά ( $p < 0.05$ ) μετά την ένεση της FSH μέχρι την ημέρα 3 στην ομάδα -1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και κατόπιν είχαν μία αυξητική τάση και έγιναν παρόμοιες με εκείνες της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) την 6<sup>η</sup> ημέρα (Σχήμα 4). Στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) υπήρχε μια βαθμιαία και σημαντική μείωση ( $p < 0.05$ ) στις βασικές τιμές της LH μέχρι την ημέρα 3 και κατόπιν μια σημαντική αύξηση ( $p < 0.05$ ), χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων σε κανένα χρονικό σημείο των πειραματικών διαδικασιών.

Οι τιμές της E2 στον ορό αυξήθηκαν σημαντικά μετά την ένεση της ανασυνδασμένης FSH και στις 3 ομάδες των γυναικών. Η αύξηση ήταν σημαντική ( $p < 0.05$ ) μέχρι την ημέρα 3 και στις δύο ομάδες μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) και μέχρι την ημέρα 4 στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) ( $p < 0.05$ ). Κατόπιν στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) οι τιμές της E2 παρέμειναν σταθερές, ενώ στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) ελαττώθηκαν βαθμιαία ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 5). Την ημέρα 1 οι βασικές τιμές της E2 ήταν σημαντικά υψηλότερες ( $p < 0.001$ ) στις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) σε σχέση με εκείνες της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control). Στις 12 ώρες μετά την ένεση της ανασυνδασμένης FSH οι τιμές της E2 αυξήθηκαν σημαντικά ( $p < 0.001$ ) στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σύγκριση με εκείνες

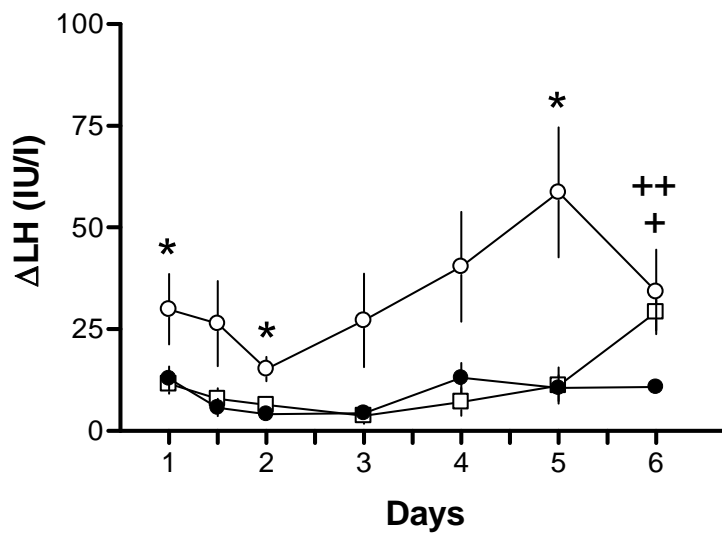
της ομάδας-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) (Σχήμα 5). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της E2 μεταξύ των τριών ομάδων στα υπόλοιπα χρονικά σημεία των πειραματικών διαδικασιών.

Οι τιμές της προγεστερόνης αυξήθηκαν σημαντικά στις γυναίκες με PCOS κατά τη διάρκεια της εξωγενούς χορήγησης αυτού του στεροειδούς ( $6.4 \pm 1.5$  ng/ml στη 10<sup>η</sup> ημέρα της χορήγησης του) και παρέμειναν ανεβασμένες την 1<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) αν και όχι σημαντικά (Σχήμα 6). Οι τιμές της προγεστερόνης παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια των τριών πειραματικών διαδικασιών, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε κανένα χρονικό σημείο (Σχήμα 6).

Οι τιμές της ινχιμπίνης A στον ορό αυξήθηκαν βαθμιαία και σημαντικά ( $p < 0.001$ ) μέχρι την ημέρα 3 μετά την ένεση της ανασυνδυσμένης FSH στις ομάδες μελέτης -1 και -2 των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) και κατόπιν ελαττώθηκαν σημαντικά ( $p < 0.001$ ), ενώ στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) δεν υπήρχαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, παρά την εμφάνιση μιάς τάσης για αύξηση τις πρώτες 12 ώρες μετά την ένεση της ανασυνδυσμένης FSH (Σχήμα 7). Οι τιμές της ινχιμπίνης A ήταν σημαντικά υψηλότερες ( $p < 0.001$ ) στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) σε σύγκριση με τις ομάδες μελέτης -1 και -2 των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) την ημέρα 1. Κατόπιν οι τιμές της ινχιμπίνης A ήταν σημαντικά υψηλότερες ( $p < 0.05$ ) στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) στις ημέρες 2,5 και 6 από ότι στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) (Σχήμα 7). Οι τιμές της ινχιμπίνης A ήταν σημαντικά υψηλότερες ( $p < 0.05$ ) στην ομάδα -1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) στις ημέρες 2,3,4,5 και 6 σε σύγκριση με εκείνες της ομάδας -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) (paired t-test) (Σχήμα 7).

Μια σημαντική αύξηση ( $p < 0.001$ ) στις τιμές της ινχιμπίνης B στον ορό, παρατηρήθηκε στις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) μέχρι την ημέρα 3 μετά την ένεση της ανασυνδυσμένης

FSH, οι οποίες μειώθηκαν κατόπιν σημαντικά ( $p < 0.001$ ) (Σχήμα 8). Στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control), οι τιμές της ινχιμπίνης B στον ορό παρέμειναν αμετάβλητες καθ' όλη την πειραματική διαδικασία (Σχήμα 8). Οι τιμές της ινχιμπίνης B ήταν σημαντικά χαμηλότερες ( $p < 0.05$ ) στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) σε σύγκριση με τις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2 PCOS) τις ημέρες 2 και 3. Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS και Exp-2-PCOS) σε κανένα χρονικό σημείο της πειραματικής διαδικασίας (Σχήμα 8).



Σχήμα 2: Η ΔLH απάντηση της υπόφυσης στη GnRH στα 30', στις τρεις ομάδες των γυναικών. Η χορήγηση της FSH πραγματοποιήθηκε την ημέρα 1, αμέσως μετά την εκτίμηση της ΔLH.

○ Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)

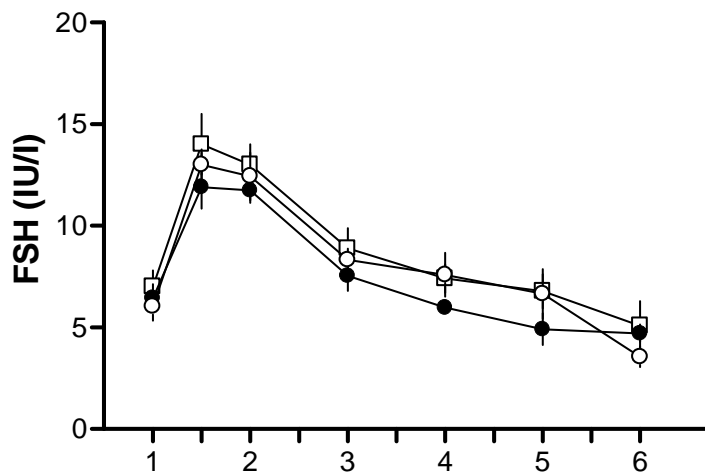
● Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)

□ Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)

\*  $p < 0.05$  Στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS από ότι στις Exp-2-PCOS και στις Exp-control

+  $p < 0.05$  Στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS και στις Exp-control από ότι στις Exp-2-PCOS

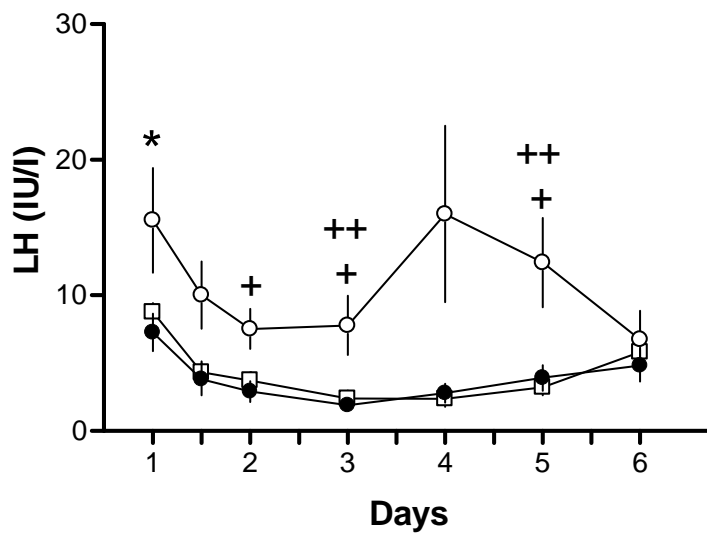
++  $p < 0.05$  Στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στις Exp-control από ότι στις Exp-2-PCOS



Σχήμα 3: Τα βασικά επίπεδα της FSH καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου και στις τρεις ομάδες των γυναικών.

- Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)
- Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)
- Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)





Σχήμα 4: Οι βασικές τιμές της LH στις τρεις ομάδες των γυναικών.

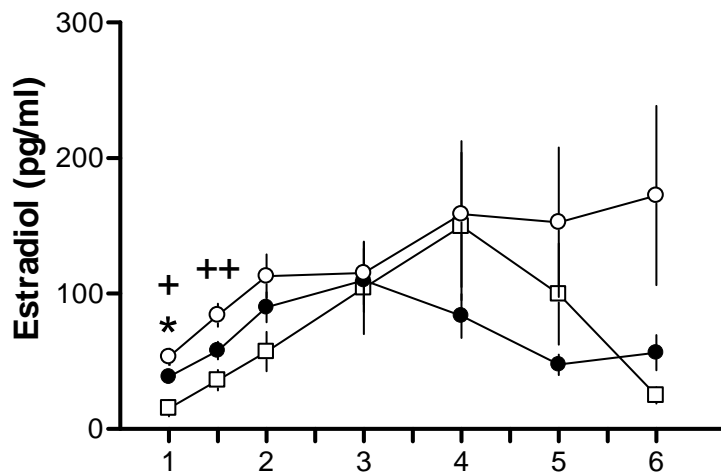
○ Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)

● Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)

□ Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)

\*  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS από ότι στις Exp-2-PCOS και στις Exp-control

+  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS από ότι στις Exp-2-PCOS και στις Exp-control



Σχήμα 5: Οι τιμές της E2 και στις τρεις ομάδες των γυναικών.

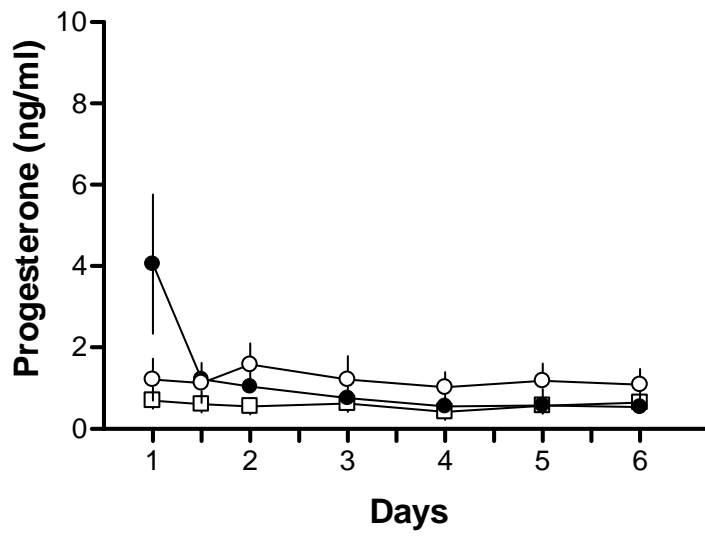
○ Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)

● Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)

□ Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)

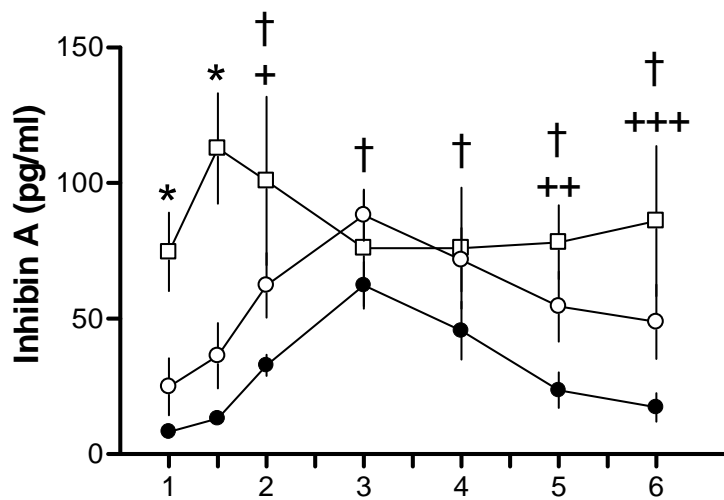
\*  $p < 0.001$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS και στις Exp-2-PCOS από ότι στις Exp-control

+  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS από ότι στις Exp-2-PCOS και στις Exp-control



Σχήμα 6: Οι τιμές της προγεστερόνης στις τρεις ομάδες των γυναικών.

- Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)
- Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)
- Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)



Σχήμα 7: Οι τιμές της ινχιπίνης A στον ορό στις τρεις ομάδες των γυναικών.

○ Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)

● Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)

□ Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)

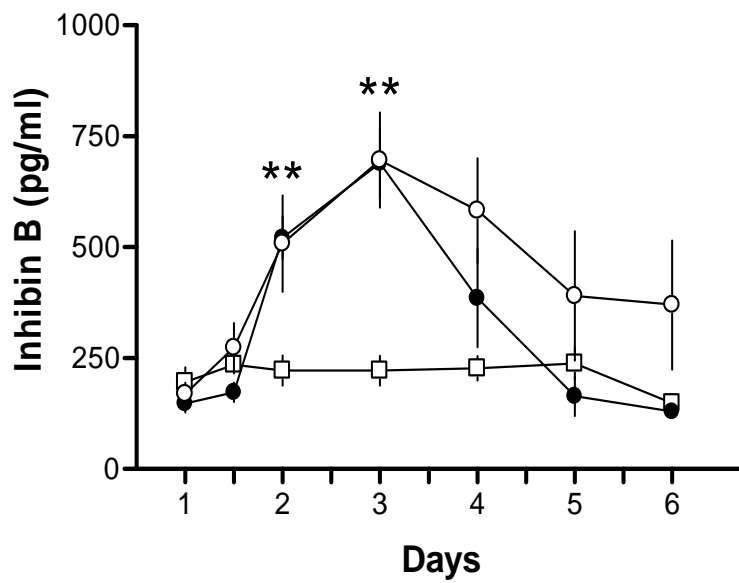
\*  $p < 0.001$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-control από ότι στις Exp-1-PCOS και στις Exp-2-PCOS

+  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-control από ότι στις Exp-2-PCOS.

++  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS και στις Exp-control από ότι στις Exp-2-PCOS

+++  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-control από ότι στις Exp-2-PCOS

†  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS από ότι στις Exp-2-PCOS



Σχήμα 8: Οι τιμές της ινχιμπίνης B στον ορό, στις τρεις ομάδες των γυναικών.

○ Ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS)

● Ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS)

□ Ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control)

\*\*  $p < 0.05$  Στατιστικά υψηλότερες τιμές στις Exp-1-PCOS και στις Exp-2-PCOS από ότι στις Exp-control

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την ευρέως γνωστή αυξημένη απάντηση της LH στη GnRH στις ανωορρηκτικές γυναίκες με PCOS (Mortimer et al., 1978; Steck et al., 1991; Patel et al., 2004). Ακολουθώντας οι γυναίκες αυτές θεραπεία με προγεστερόνη, η αυξημένη αυτή απάντηση επανερχόταν στο φυσιολογικό και γίνονταν παρόμοια με εκείνη που παρατηρούνταν στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου σε υγιείς γυναίκες. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα μετά από θεραπεία με προγεστερόνη μόνον, ή σε συνδυασμό προγεστερόνης με E2 (Christman et al., 1991; Fiadet et al., 1996; Padmanabhan et al., 2001), αλλά υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στην παρούσα και στις προηγούμενες μελέτες. Ειδικότερα σ' αυτή τη μελέτη, υιοθετήσαμε μια δυναμική προσέγγιση με την εξωγενή χορήγηση της FSH, ενώ ως έκκριση της LH εκτιμήθηκε η σε 30' απάντηση στην υπομεγίστη δόση των 10μg GnRH, η οποία αναπαριστά την ευαισθησία της υπόφυσης σε αυτό το πεπτίδιο (Wang et al., 1976).

Η δυναμική προσέγγιση επιλέχθηκε, επειδή σε προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί ότι ακόμα και μία μόνο δόση εξωγενούς FSH, χορηγούμενη σε φυσιολογικές γυναίκες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, διεγείρει την παραγωγή στεροειδών ορμονών (E2) και διαφόρων ωθητικών πεπτιδίων και του GnSAF από τις ωθήκες, ο οποίος αμβλύνει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH (Messinis et al., 1993; 1994; 1998). Τέτοια προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί σαν *in vivo* βιομέθοδος για τον GnSAF (Messinis, 2006). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ακολουθώντας μία προσομοιωμένη ωχρινική φάση, κατά τη διάρκεια της εξωγενούς χορήγησης της προγεστερόνης, μία προσομοιωμένη αρχόμενη ωοθυλακική φάση 6 ημερών μελετήθηκε σε γυναίκες με PCOS, σε σύγκριση με την αρχόμενη ωοθυλακική φάση φυσιολογικών γυναικών. Η ευαισθησία της LH στη GnRH σ' αυτή την περίοδο μετά την ένεση της FSH ήταν παρόμοια στις υγιείς και στις γυναίκες με PCOS. Αν και η φυσιολογική απάντηση της LH στη διέγερση με GnRH την 1<sup>η</sup> πειραματική ημέρα (Σχήμα 2) σχετίζεται με τη δράση της προγεστερόνης, η περαιτέρω σημαντικά μειωμένη απαντητικότητα της LH, κατά τη διάρκεια των επόμενων 2 ημερών, οφείλεται στην αυξημένη

δραστικότητα ωοθηκικών ορμονών, που ρυθμίζονται από την FSH με τρόπο παρόμοιο με αυτόν στη φυσιολογική αρχόμενη ωοθυλακική φάση (Messinis et al., 1993; 1994; 1998). Αυτό συνιστά ότι, κάτω από συνθήκες προσομοιωμένης ωοθυλακικής φάσης, η παραγωγή των ωοθηκικών παραγόντων που ελέγχουν την έκκριση της LH από τη GnRH στις ανωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS είναι συγκρίσιμη με αυτή των υγιών γυναικών. Ο κύριος ωοθηκικός παράγων που φυσιολογικά επηρεάζει την ευαισθησία της LH στη GnRH είναι η E2 (Lasley et al., 1975; Dafopoulos et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη, μία παρόμοια αύξηση στις συγκεντρώσεις της E2 στον ορό βρέθηκε στις φυσιολογικές και στις γυναίκες με PCOS. Αυτό το στεροειδές ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH για την παραγωγή γοναδοτροφινών μέσω πολλαπλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης και της αύξησης του αριθμού των υποδοχέων της GnRH (self-priming effect) (Ramey et al., 1987; Danforth et al., 1990; Laws et al., 1990). Υπάρχουν συσσωρευμένες αποδείξεις ότι ένας μη στεροειδικός ωοθηκικός παράγων, που ονομάζεται GnSAF, πιθανόν να εμπλέκεται στον έλεγχο της υποφυσιακής ευαισθησίας στη GnRH στις φυσιολογικές γυναίκες, ανταγωνιζόμενος την ευαισθητοποιούσα επίδραση της E2 (Messinis and Templeton, 1989; Fowler et al., 2003; Messinis, 2006). Πρόσφατα δεδομένα παρέχουν ενδιαφέρουσες πληροφορίες όσον αφορά το χαρακτηρισμό αυτού του παράγοντα (Karlgiotou et al., 2006). Είναι δελεαστικό λοιπόν, να ισχυριστεί κανείς ότι κάτω από τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, η ποσότητα του GnSAF που παράγεται από τις πολυκυστικές ωοθήκες είναι παρόμοια με αυτή που παράγεται από τις φυσιολογικές ωοθήκες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνιστούν ότι υπήρχε μια διαφορά στη δράση της E2 στην υπόφυση, κατά τη διάρκεια των πειραματικών περιόδων ανάμεσα στις δύο ομάδες των γυναικών με PCOS (Exp-1 PCOS και Exp-2 PCOS). Αν και η απάντηση της E2 στην FSH ήταν παρόμοια και στις δύο πειραματικές ομάδες των γυναικών με PCOS (Exp-1 PCOS και Exp-2 PCOS), στην πρώτη ομάδα (Exp-1 PCOS) φαίνεται ότι η μακροχρόνια, ευδοτική, μη αντιστρεπτή από προγεστερόνη, δράση της E2 στην υπόφυση μπορούσε να ξεπεράσει αυτή την ανασταλτική δράση των ωοθηκικών ορμονών, ενώ στη δεύτερη πειραματική ομάδα (Exp-2 PCOS), που είχε προηγηθεί η χορήγηση της προγεστερόνης, φαίνεται ότι δεν μπορούσε. Ο μηχανισμός αυτής

της διαφοράς δεν είναι σαφής, αν και η προγεστερόνη θα μπορούσε να τροποποιήσει τη δράση της E2 κεντρικά, ελαττώνοντας τον αριθμό των υποδοχέων της E2 (Smanik et al., 1983; Blaustein and Brawn, 1984). Σύμφωνα με αυτή την άποψη, είναι πιθανόν η αυξημένη ευασθησία της υπόφυσης στη GnRH, η αυξημένη δηλαδή έκκριση της LH κατά τη διάρκεια της ανοοθυλακιορρηξίας στις γυναίκες με PCOS, να μην οφείλεται σε ελαττωμένη παραγωγή ουσιών από τις ωοθήκες, αλλά σε ελαττωματική δράση αυτών των ωοθηκικών ουσιών στο υποθαλαμοϋποφυσιακό σύστημα. Δεν θα πρέπει να αποκλειστεί και το γεγονός να παίζει κάποιο ρόλο και η προγεστερόνη κατά τη διάρκεια της προσομοιωμένης αρχόμενης ωοθυλακικής φάσης (Exp-2 PCOS), αν και τα επίπεδα αυτού του στεροειδούς δεν άλλαξαν μετά την ένεση της FSH. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία της προγεστερόνης και των υποδοχέων της στη δημιουργία του φαινομένου της αυτοπριμοδότησης (self-priming effect) και του κύματος της LH σε πειραματόζωα και γυναίκες κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Kazem et al., 1996; Chappell et al., 1999; Gordon et al., 2008). Πέρα από τη διαφορετική ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH στις γυναίκες με PCOS και στις υγιείς, η παρούσα μελέτη έδειξε και κάποιες άλλες διαφορές ανάμεσα στις φυσιολογικές και πολυκυστικές ωοθήκες, που θα μπορούσαν να αναπαριστούν διαφορετικές λειτουργικές δυναμικές. Τα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της ινχιπίνης A μετά τη χορήγηση της προγεστερόνης στις γυναίκες με PCOS (Exp-2 PCOS) θα μπορούσαν να οφείλονται στα ελαττωμένα επίπεδα της LH. Επίσης, τα σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της ινχιπίνης A στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-controls) θα μπορούσαν να σχετίζονται με την παραγωγή αυτής της πρωτεΐνης από το προϋπάρχον ωχρό σωματίο, που δεν υφίσταται στις γυναίκες με PCOS (Exp-1 PCOS και Exp-2 PCOS) (Groome et al., 1996). Παρά το γεγονός ότι οι υποφυσιακές γοναδοτροφίνες είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της παραγωγής των ινχιπινών (Anderson et al., 1998; Welt et al., 2001; 2002), η αδυναμία της FSH στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα να αυξήσει τα επίπεδα των δύο ινχιπινών στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-controls) και η αύξησή τους στις ομάδες των γυναικών με PCOS (Exp-1 PCOS και Exp-2 PCOS) έδειξε ότι οι πολυκυστικές ωοθήκες είναι πιο ευαίσθητες στη δράση της FSH. Εάν αυτή η διαφορά έχει κάποια επίδραση στην αρνητική παλλίνδρομη



ρύθμιση των ωοθηκών στην έκκριση της FSH στις γυναίκες με PCOS, δεν είναι σαφές από την παρούσα μελέτη εξαιτίας της εξωγενούς χορήγησης αυτής της γοναδοτροφίνης. Πάντως, τα δεδομένα στη βιβλιογραφία όσον αφορά τα κυκλοφορούντα επίπεδα των δύο ινχιμπινών στις γυναίκες με PCOS, σε σύγκριση με των υγιών, είναι αντικρουόμενα (Anderson et al., 1998; Pigny et al., 2000; Welt et al., 2002; Laven and Fauser, 2004; Tsigkou et al., 2008).

Αναλυτικότερα στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) παρατηρήθηκε μια μείωση στην απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH στο πρώτο 24ώρο (Σχήμα 2). Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί με την παραγωγή του GnSAF από τα μικρά ωοθυλάκια λόγω της ένεσης της ανασυνδυασμένης FSH. Ο GnSAF παράγεται από τα μικρού μεγέθους ωοθυλάκια μεγέθους 6-8mm κατά την αρχόμενη και μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου κάτω από την επίδραση της FSH, ενώ τα επίπεδά του πέφτουν κατά την όψιμη ωοθυλακική φάση (Fowler et al., 2001). Μετά την έναρξη της θεραπείας με FSH και σε γυναίκες και σε αγελάδες η βιοδραστικότητα του GnSAF αυξάνει πιο γρήγορα από την E2 και την ινχιμπίνη. Η ελάττωση του εύρους και της συχνότητας του παλμού της LH επιτυγχάνεται 20 ώρες μετά από τη χορήγηση FSH σε αγελάδες (Gosselin et al., 2000) δείχνοντας αυξημένη βιοδραστικότητα του GnSAF in vivo. Ο χρόνος διέγερσης της βιοδραστικότητας του GnSAF από καλλιεργημένα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα που συλλέχθηκαν από μικρά (6-9mm) ωοθυλάκια, είναι γρήγορη (Fowler and Mason, 2000), υποστηρίζοντας την παρατήρηση της ανίχνευσης GnSAF βιοδραστικότητας in vivo μέσα σε 8 ώρες, από μία ένεση FSH, σε γυναίκα. Η διέγερση άλλων ορμονών που πιθανόν καταστέλλουν την έκκριση της LH από τη GnRH όπως E2, ινχιμπίνη Α και ινχιμπίνη Β, συμβαίνει σαφώς αργότερα από τη διέγερση του GnSAF (Messinis et al., 1991, 1993a, 1994a; Fowler and Price, 1997; Burger et al., 1998; Gosselin et al., 2000; Welt et al., 2001). Είναι άγνωστο αν ο GnSAF δρα στον υποθάλαμο απευθείας ώστε να επηρεάζει τη συχνότητα του παλμού της GnRH, αλλά αυτό είναι απίθανο, εφόσον είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 60-70 kDa. Κατόπιν όμως, η αύξηση και των επιπέδων της E2 που επέρχονταν και αυτή από την ένεση της ανασυνδυασμένης FSH, αλλά καθυστερούσε σε σχέση με εκείνη του GnSAF όπως προαναφέρθηκε, ξεπερνούσε την ανασταλτική δράση του

GnSAF στην έκκριση της LH, με αποτέλεσμα την αυξημένη απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH.

Στην ομάδα μελέτης-2 των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) η απάντηση της υπόφυσης στη GnRH ήταν παρόμοια (Σχήμα 2). Αρχικά υπήρχε μια σημαντική ελάττωση στο 1<sup>ο</sup> 24ωρο που πιθανόν να οφείλονταν, όπως και στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS, στην ταχεία παραγωγή του GnSAF από την ένεση της ανασυνδυασμένης FSH και κατόπιν μία τάση για αύξηση, που οφείλονταν και στην αύξηση της παραγωγής E2, που όμως δε φαίνονταν να υπερνικά φανερά και παρόμοια με την ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) τη δράση του GnSAF.

Στατιστικά σημαντική διαφορά, μεταξύ της ομάδας-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control), όσον αφορά την απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH, υπήρχε μόνο την 6<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας και ήταν αυξημένη στην ομάδα των υγιών γυναικών δείχνοντας έτσι την πορεία τους προς την ωορρηξία.

Η απαντητικότητα της υπόφυσης στη GnRH ήταν αυξημένη στην ομάδα-1-μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σχέση με την ομάδα-2-μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και την ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και στατιστικά σημαντικά αυξημένη τις ημέρες 1, 2 και 5 (Σχήμα 2). Προφανώς αυτό οφείλονταν στη χρόνια δράση της E2 και πράγματι, οι τιμές της E2 ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα-1 των γυναικών της ομάδας μελέτης με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σχέση με αυτές των γυναικών της ομάδας ελέγχου (Exp-control) (Σχήμα 5). Έχει βρεθεί ότι η βραχυπρόθεσμη (<12 ώρες) έκθεση των καλλιεργημένων υποφυσιακών κυττάρων στην E2 αυξάνει τον αριθμό των υποδοχέων της GnRH (Gregg et al., 1990) και την από τη GnRH προκαλούμενη έκκριση της LH (Huang and Miller, 1980). Η μακροπρόθεσμη (24-48 ώρες) in vitro έκθεση των γοναδοτρόφων του επίμουσ (Speight and Fink, 1981b) ή του προβάτου (Fowler et al., 1992, 1993) στην E2 έχει μικρή επίδραση στην έκκριση της LH από τη GnRH, αν και η συνεχής έκθεση στην E2 κατά τη διάρκεια μίας πρόκλησης με GnRH ενισχύει την από τη GnRH προκαλούμενη σύνθεση και έκκριση της LH (Ramey et al., 1987). Έχει προταθεί ότι η αυξημένη στον ορό LH

που παρατηρείται περίπου στο 40% των ασθενών με PCOS σχετίζεται με τη συνεχή θετική δράση της E2 στην υπόφυση (Lobo et al., 1981; Waldstreicher et al., 1988). Αν και αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί, τέτοια δράση δεν πληρεί τα κριτήρια μιας θετικής παλλίνδρομης ρύθμισης (positive feedback). Όμως, η συνεχής ευαισθητοποιός δράση της E2 στην υπόφυση που επαυξάνει την υποφυσιακή απάντηση στη GnRH στις ασθενείς με PCOS δε μπορεί να αποκλειστεί, αν και δεδομένα σε πθήκους δεν υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση (Richardson et al., 1992).

Η σημαντικά ελαττωμένη απάντηση της υπόφυσης στη GnRH που παρατηρήθηκε στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS), θα μπορούσε να ερμηνευτεί και ως αδυναμία της E2 να ευαισθητοποιήσει την υπόφυση στη GnRH και επομένως υπερίσχυση της δράσης του GnSAF (ο οποίος θεωρείται ότι εκκρίνεται από τα μικρά ωοθυλάκια μετά την ένεση της FSH) ενώ στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) η δράση της E2 ξεπερνούσε εκείνη του GnSAF και αυτό οφείλονταν στη χρόνια, μη αναστρέψιμη με προγεστερόνη, επίδραση της E2. Αυτή η αδυναμία της E2, στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) να υπερνικήσει τη δράση του GnSAF, φανερά σχετίζεται με τη χορήγηση προγεστερόνης, η οποία πιθανόν να μεταβάλει τους υποδοχείς της E2 στην υπόφυση. Και είναι απαραίτητη η προηγηθείσα δράση της E2 για την επίτευξη από την προγεστερόνη της αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) των ωοθηκών στην έκκριση των γοναδοτροφινών κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου (Soules et al., 1984). Η κατασταλτική δράση αυτών των δύο στεροειδών στην έκκριση των γοναδοτροφινών πιθανόν να γίνεται μέσω μίας αύξησης στη δραστηριότητα της β-ενδορφίνης στον υποθάλαμο (Wehrenberg et al., 1982).

Οι τιμές της FSH ήταν παρόμοιες και στις 3 ομάδες των γυναικών (Σχήμα 3). Παρατηρήθηκε αρχικά μια αύξηση των επιπέδων της στο 1<sup>ο</sup> 24ωρο των πειραματικών διαδικασιών και τούτο οφείλεται στην εξωγενή χορήγηση της ανασυνδυασμένης FSH και κατόπιν μια σταδιακή μείωση. Παρά την ύπαρξη μελετών που υποστηρίζουν ότι στις γυναίκες με PCOS, η αδυναμία των ωοθυλακίων να ωριμάσουν στο πρωορρηκτικό στάδιο οφείλεται, τουλάχιστον μερικά, στην έλλειψη της διακυκλικής αύξησης της FSH και όταν οι

συγκεντρώσεις της FSH γίνουν λίγο υψηλότερες, με εξωγενή χορήγηση αυτής της ορμόνης, τότε μπορεί να λάβει χώρα η επιλογή του ωοθυλακίου (van der Meer et al., 1994), στη μελέτη μας οι τιμές της, όπως προαναφέρθηκε, ήταν παρόμοιες καθόλη την πειραματική διαδικασία και στις 3 ομάδες των γυναικών. Η σταδιακή πτώση των επιπέδων της FSH οφείλονταν στην παραγωγή ινχμπινών A και B από τα ωοθυλάκια από την επίδραση της ένεσης της ανασυνδυασμένης FSH.

Οι τιμές της LH ήταν αυξημένες καθόλη την πειραματική διαδικασία στην ομάδα μελέτης-1 των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σχέση με εκείνες της ομάδας-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και της ομάδας ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) και στατιστικά σημαντικά αυξημένες στις ημέρες 1, 2, 3 και 5. Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες με PCOS έχουν αυξημένα βασικά επίπεδα LH και τούτο φαίνονταν στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) (Σχήμα 4). Οι τιμές όμως της LH ομαλοποιούνταν στις ίδιες γυναίκες μετά την εξωγενή χορήγηση μικροκρυσταλικής προγεστερόνης και ήταν παρόμοιες με εκείνες των υγιών γυναικών της ομάδας ελέγχου (Exp-control). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία και με τη μελέτη του Buckler et al., 1992., όπου η εξωγενής χορήγηση αυτού του στεροειδούς σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) οδήγησε σε σημαντική μείωση των ήδη αυξημένων επιπέδων της LH, αλλά είχαν επιτευχθεί τότε επίπεδα προγεστερόνης της ωχρινικής φάσης, που φυσικά είναι πολύ ανώτερα από τα φυσιολογικά κυκλοφορούντα επίπεδα της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου. Πάντως και η ενδογενής προγεστερόνη φαίνεται να συνεισφέρει στην αρνητική παλλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback) της ωοθήκης στην LH (Daforoulou et al., 2004a). Επιπλέον, η θεραπεία φυσιολογικών γυναικών με το αντιπρογεσταγόνο, mifepristone, κατά τη διάρκεια της αρχόμενης και μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου οδηγεί σε μια σημαντική αύξηση των βασικών επιπέδων της LH (Kazem et al., 1996). Δεν υπάρχουν άλλες μελέτες που να ερεύνησαν ιδιαίτερα την ικανότητα της προγεστερόνης, σε συγκεντρώσεις βέβαια που φυσιολογικά παρατηρούνται κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου, να ελέγξει την έκκριση των γοναδοτροφινών στις γυναίκες.

Επίσης παρατηρήθηκε μια πτώση στις τιμές της LH στο 1<sup>ο</sup> 24ωρο από τη χορήγηση της ανασυνδυασμένης FSH και στις 3 ομάδες των γυναικών οι οποίες

κατόπιν παραμένουν περίπου σταθερές (Σχήμα 4) και τούτο ίσως να οφείλεται στη δράση του GnSAF.

Οι τιμές της E2 ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες την 1<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και στην ομάδα-2-μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) από ότι στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control), πριν δηλαδή τη χορήγηση της ανασυνδουασμένης FSH (Σχήμα 5). Τούτο έδειξε τη χρόνια υπεροιστρογοναιμία των γυναικών με PCOS καθώς και την αδυναμία της προγεστερόνης να επαναφέρει τα επίπεδα των οιστρογόνων στην ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) σ' αυτά των υγιών γυναικών της ομάδας ελέγχου (Exp-control).

Μετά την ένεσης της FSH τα επίπεδα της E2 αυξήθηκαν και στις 3 ομάδες των γυναικών μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Αυτό ήταν αναμενόμενο γιατί η FSH διεγείρει την παραγωγή E2 από τα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη ο Messinis et al., 1994, έδειξε ότι η χορήγηση ενδομυκώς μίας μόνο δόσης 450 IU FSH σε φυσιολογικές γυναίκες την ημέρα 2 του γεννητικού κύκλου αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της FSH στον ορό για τις επόμενες τρεις ημέρες και αυτό συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση της E2 του ορού, η μέση τιμή των συγκεντρώσεων της οποίας έφθασε τα 600 pmol/l την ημέρα 4 του κύκλου και επέστρεψαν στα βασικά επίπεδα την ημέρα 6.

Οι τιμές της E2 ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στην ομάδα-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) σε σχέση με την ομάδα-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) και την ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) το 1<sup>ο</sup> 24ωρο από την ένεση της ανασυνδουασμένης FSH (Σχήμα 5). Αυτό έχει δειχθεί και σε *in vitro* μελέτες, με καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από ωοθήκες γυναικών με PCOS που έδειξαν μια αυξημένη παραγωγή E2 μετά τη διέγερσή τους με FSH σε σχέση υγιών γυναικών (Erickson et al., 1992), αλλά και σε *in vivo* μελέτες (Coffler et al., 2003; D.S. Wachs et al., 2006), όπου η απάντηση στη διέγερση με FSH των γυναικών με PCOS με παραγωγή E2 είναι σημαντικά μεγαλύτερη εκείνης των υγιών γυναικών. Και τούτο οφείλεται είτε στον αυξημένο αριθμό των ωοθυλακίων με άντρο που έχουν οι γυναίκες με PCOS, είτε

σε αυξημένη ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων των ωοθηκών στο PCOS στην FSH, είτε και στα δύο (Anderson et al., 1998; Lockwood 2000; Pigny et al., 2003). Βέβαια, στη μελέτη της Wachs et al., 2006 η αύξηση στα επίπεδα της E2 στις γυναίκες με PCOS μετά τη διέγερση με FSH ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας και συνοδεύτηκε από σημαντική πτώση μετέπειτα, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας.

Οι τιμές της προγεστερόνης ήταν χαμηλές και παρόμοιες και στις 3 ομάδες των γυναικών δείχνοντας ότι η προγεστερόνη υπάρχει στην κυκλοφορία και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (Σχήμα 6). Η προγεστερόνη φυσιολογικά παράγεται από τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα και τα ωχρά κύτταρα. Αν και η πηγή της παραγωγής της κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου δεν έχει αποσαφηνιστεί, μία μελέτη έχει προτείνει τα επινεφρίδια (Judd et al., 1992). Όμως πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι μετά από ωοθηκεκτομία που γίνεται στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου, οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στον ορό πέφτουν σχεδόν σε μη μετρήσιμα επίπεδα (Alexandris et al., 1997). Αυτό σημαίνει ότι η ωοθήκη παράγει προγεστερόνη ακόμα και στην ωοθυλακική φάση του κύκλου.

Η αυξημένη τιμή που παρουσιάστηκε την 1<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στην ομάδα-2-των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS) οφείλονταν στο ότι μόλις πριν από 12 ώρες σταμάτησε η από του στόματος χορήγηση μικροκρυσταλλικής προγεστερόνης σε αυτές τις γυναίκες.

Τα επίπεδα της ινχιπίνης A ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) σε σχέση με εκείνα της ομάδας-1 και-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και (Exp-2-PCOS) πριν τη διέγερση με την ανασυνδρασμένη FSH (Σχήμα 7). Τούτο είναι δύσκολο να εξηγηθεί, ίσως η προηγηθείσα παρουσία ωχρού σωματίου στις υγιείς γυναίκες να ήταν η αιτία της διαφοράς αυτής. Μετά την ένεση της FSH, παρατηρήθηκε μία βαθμιαία αύξηση στις τιμές της ινχιπίνης A μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και (Exp-2-PCOS), όπως άλλωστε αναμενόταν και από προηγούμενες μελέτες (Wachs et al., 2006), ενώ στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) αυτή η αύξηση σταματούσε τη 2<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Κατόπιν

οι τιμές της ινχιμπίνης Α παρέμεναν σταθερές ή βαθμιαία ελαττώνονταν και στις 3 ομάδες των γυναικών. Τα χαμηλότερα επίπεδα της ινχιμπίνης Α που παρατηρήθηκαν καθόλη την πειραματική διαδικασία στις γυναίκες με PCOS μετά τη χορήγηση προγεστερόνης (Exp-2-PCOS) σε σχέση με εκείνα της ομάδας-1 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) μπορεί να αποδοθούν στα ελαττωμένα επίπεδα της LH της ομάδας-2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-2-PCOS). Είναι γνωστό ότι η παραγωγή της ινχιμπίνης Α διεγείρεται και από την FSH και από την LH, ενώ της ινχιμπίνης Β κυρίως από την FSH (Anderson et al., 1998; Welt et al., 2001; 2002).

Τα επίπεδα της ινχιμπίνης Β ήταν αρχικά παρόμοια και στις 3 ομάδες των γυναικών και αυτό είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Laven and Fauser, 2004; Welt et al., 2005; Torgac et al., 2005; Laven et al., 2001; Magoffin et al., 1998) (Σχήμα 8).

Μετά τη διέγερση με την ανασυνδυασμένη FSH τα επίπεδα της ινχιμπίνης Β αυξήθηκαν ταχέως και σημαντικά και παρόμοια μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και (Exp-2-PCOS) όπως και στη μελέτη της Wachs et al., 2006. Αυτό οφείλονταν, είτε στον αυξημένο αριθμό μικρών ωοθυλακίων (στο στάδιο του προάντρου ή του άντρου), είτε σε αυξημένη ευαισθησία των κοκκωδών κυττάρων στο PCOS στην FSH, είτε και στα δύο. Μάλιστα, η ινχιμπίνη Β αποδεικνύεται πιο ευαίσθητος δείκτης της λειτουργικής ικανότητας των κοκκωδών κυττάρων από την E2, αφού η αύξηση της είναι ταχύτερη και μεγαλύτερη στη διέγερση με FSH. Η σταδιακή πτώση των επιπέδων της ινχιμπίνης Β μετά την 3<sup>η</sup> ημέρα της πειραματικής διαδικασίας στις ομάδες -1 και -2 μελέτης των γυναικών με PCOS (Exp-1-PCOS) και (Exp-2-PCOS), οφείλονταν προφανώς στην πτώση των επιπέδων της FSH.

Στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών (Exp-control) η ινχιμπίνη Β αυξήθηκε ελάχιστα στις πρώτες 12 ώρες της πειραματικής διαδικασίας και κατόπιν επανήλθε στα βασικά επίπεδά της δείχνοντας ότι πιθανόν να υπήρχε διαφορά στη λειτουργικότητα των κοκκωδών κυττάρων μεταξύ υγιών και γυναικών με PCOS. Η αδυναμία της FSH να αυξήσει τα επίπεδα των δύο ινχιμπινών στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών πιθανότατα σχετίζεται με το χρονοδιάγραμμα της

θεραπείας και δείχνει ότι οι ωοθήκες των γυναικών με PCOS είναι πιο ευαίσθητες στην FSH από εκείνες των υγιών γυναικών. Αυτό είναι μια συνεισφορά στη διχογνωμία για το αν και κατά πόσο οι πολυκυστικές ωοθήκες παράγουν περισσότερο ινχιμπίνες από τις φυσιολογικές ωοθήκες (Laven and Fauser, 2004; Wachs et al., 2006; Messinis 2006; Tsigkou et al., 2008).

Συνολικά όλα αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να ερμηνευθούν με την παραδοχή ότι μικρότερες ποσότητες GnSAF παράγονται από τις ωοθήκες των γυναικών με PCOS σε σχέση με τις ωοθήκες των γυναικών της ομάδας ελέγχου μετά την ένεση της FSH. Αυτή η ερμηνεία δεν είναι όμως και τόσο πιθανή για τους ακόλουθους λόγους. Η ένεση της FSH έχει σαν αποτέλεσμα μια παρόμοια αύξηση των συγκεντρώσεων της E2 και στην ομάδα ελέγχου των γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με PCOS κατά τη διάρκεια και των δύο πειραματικών περιόδων δείχνοντας ότι οι ωοθήκες των γυναικών με PCOS δεν είναι πιο ευαίσθητες στην στεροειδική παραγωγή από αυτές των φυσιολογικών της ομάδας ελέγχου. Βασιζόμενοι επίσης στο γεγονός ότι τα επίπεδα της FSH, ακολούθως της εξωγενούς χορήγησης, ήταν παρόμοια και στα 3 πειράματα και ότι η FSH είναι ο κύριος διεγέρτης στην παραγωγή του GnSAF από τα κοκκώδη κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων (Fowler et al., 2003; Messinis, 2006), υποτίθεται ότι αυτός ο παράγοντας είναι σε παρόμοια επίπεδα στην ομάδα των γυναικών με PCOS πριν και μετά τη θεραπεία με προγεστερόνη όπως επίσης και στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η E2 αυξάνει την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH (Lasley et al., 1975; Dafopoulos et al., 2004) ενώ ο GnSAF ανταγωνίζεται την ευαισθητοποίηση αυτή δράση της (Messinis, 2006).

Είναι πιθανόν γι' αυτό, η ελαττωμένη απάντηση της LH στη GnRH μετά τη χορήγηση της προγεστερόνης στην ομάδα των γυναικών με PCOS να μην μπορεί να εξηγηθεί με διαφορές στη δραστικότητα του GnSAF, αλλά μάλλον με τη διαφορετική δράση της E2 στην υπόφυση κατά τη διάρκεια των 2 πειραματικών περιόδων. Δηλαδή, η μακροχρόνια έκθεση της υπόφυσης σε μια μη αντιστρεπτή από προγεστερόνη δράση της E2, μπορεί να υπερκεράσει την ανταγωνιστική δράση του GnSAF στην υπόφυση πριν, αλλά όχι μετά τη χορήγηση προγεστερόνης. Είναι πιθανόν η προγεστερόνη να τροποποιεί τη δράση της E2 στην υπόφυση ελατώνοντας τον αριθμό των E2 υποδοχέων που υπάρχουν



σ' αυτή (Smanik et al., 1983; Blaustein and Brawn, 1984). Η δυνατότητα η προγεστερόνη να διεγείρει απευθείας την έκκριση GnSAF από τις ωθήκες δεν είναι πιθανή, πρώτον διότι άλλες ουσίες όπως η E2 και η ινχμπίνη B έδειξαν μια παρόμοια αύξηση μετά την ένεση της FSH, πριν και μετά τη χορήγηση προγεστερόνης και δεύτερον επειδή τα κοκκώδη κύτταρα των ωθυλακίων με άντρο κατά τη φάση της ωθυλακιογένεσης δεν έχουν προγεστερονικούς υποδοχείς.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι η αυξημένη απάντηση της LH στη GnRH σε γυναίκες με PCOS δεν ελαττώνεται με την εξωγενή χορήγηση μιάς υψηλής δόσης FSH, αλλά επανέρχεται στο φυσιολογικό μετά τη θεραπεία με προγεστερόνη. Αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν ότι 1) η αυξημένη υποφυσιακή ευαισθησία στη GnRH δηλαδή η αυξημένη έκκριση της LH κατά τη διάρκεια των περιόδων της ανωθυλακιορρηξίας στις γυναίκες με PCOS δεν οφείλεται σε ελαττωμένη παραγωγή των ωθητικών παραγόντων αλλά σε ελαττωμένη δράση τους στο υποθαλαμοϋποφυσιακό σύστημα και 2) οι πολυκυστικές ωθήκες συγκρινόμενες με τις φυσιολογικές, είναι πιο ευαίσθητες στην FSH όσον αφορά την παραγωγή ινχιμίνης A και κυρίως ινχιμίνης B.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Οι γυναίκες με PCOS έχουν μιά αυξημένη υποφυσιακή απάντηση στη διέγερση με GnRH. Αν και έχουν ενοχοποιηθεί η διαταραχή των μηχανισμών παλλίνδρομης ρύθμισης και η υποθαλαμική δυσλειτουργία, ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι αποσαφηνισμένος. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει τον ωοθηκικό έλεγχο στην απαντητικότητα της LH στη GnRH σε ανωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS.

**Υλικό & Μεθοδος:** Δέκα (n=10) γυναίκες με PCOS (ηλικίας 21-28 ετών) και οκτώ (n=8) υγιείς γυναίκες (ηλικίας 26-33 ετών) συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη. Μία δόση (450IU) ανασυνδυασμένης FSH ενέθηκε στις γυναίκες με PCOS δύο φορές, την πρώτη φορά 15-20 ημέρες μετά από μία αυτόματη εμμηνορυσία και αφού είχε διαπιστωθεί υπερηχογραφικά η απουσία ωριμάζοντος ωοθυλακίου και επιβεβαιωνόταν εργαστηριακά η απουσία ωχρού σωματίου με μέτρηση της P4 στον ορό του αίματος (Exp-1 PCOS) και τη δεύτερη φορά μετά από 20 ημέρες θεραπείας με προγεστερόνη (Exp-2 PCOS), ενώ στις υγιείς γυναίκες ενέθηκε τη 2<sup>η</sup> ημέρα ενός αυτόματου κύκλου (Exp- controls). Και στις 3 τρείς πειραματικές ομάδες (Exp-1 PCOS, Exp-2 PCOS και Exp-controls) μελετήθηκε η απάντηση της LH σε μία iv δόση 10μg GnRH (ΔLH) αμέσως πριν και 12 ώρες μετά την ένεση της FSH και κατόπιν κάθε 24 ώρες για άλλες 5 ημέρες. Τα δείγματα αίματος σε σχέση με τη χορήγηση της GnRH (χρόνος 0) ελήφθησαν -15', 0 και +30'. Σε όλα τα δείγματα αίματος μετρήθηκαν τα επίπεδα στον ορό των FSH, LH, E2, P4, Inhibin A και Inhibin B. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την one-way analysis of variance (ANOVA) ακολουθούμενη από το Bonferroni post hoc test, paired t-test και repeated measures ANOVA με προσαρμογές Geisser-Greenhouse ακολουθούμενες από το Bonferroni post hoc testing. Όλες οι τιμές εκφράστηκαν σαν μέσος όρος ± σταθερή απόκλιση.

**Αποτελέσματα:** Οι τιμές της ΔLH, της απάντησης της υπόφυσης δηλαδή στη GnRH, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένες στην ομάδα 1 των γυναικών με PCOS από ότι στην ομάδα 2 των γυναικών με PCOS και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών.

Στην ομάδα 1 των γυναικών με PCOS οι τιμές της ΔLH παρέμειναν μάλλον σταθερές μέχρι τη δεύτερη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας και κατόπιν αυξήθηκαν ( $p < 0.05$ ).

Στην ομάδα 2 των γυναικών με PCOS και στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών οι τιμές της ΔLH ήταν παρόμοιες και παρουσίασαν μία μείωση τις πρώτες 3 ημέρες της πειραματικής διαδικασίας και κατόπιν αυξήθηκαν ( $p < 0.05$ ).

Οι τιμές της E2 στον ορό αυξήθηκαν παρόμοια και στις 3 πειραματικές ομάδες των γυναικών μετά την ένεση της FSH.

Οι τιμές της Inhibin A και της Inhibin B αυξήθηκαν στις ομάδες 1 και 2 των γυναικών με PCOS κατά την ένεση της FSH, ενώ παρέμειναν μάλλον σταθερές στην ομάδα ελέγχου των υγιών γυναικών.

Οι τιμές της FSH αυξήθηκαν μετά την εξωγενή χορήγησή της στο πρώτο 24ωρο και κατόπιν εμφάνισαν βαθμιαία πτώση και ήταν παρόμοιες και στις 3 πειραματικές ομάδες των γυναικών ( $p < 0.05$ ).

Οι τιμές της P4 ήταν χαμηλές και παρόμοιες και στις 3 πειραματικές ομάδες των γυναικών, αλλά είχαν αυξηθεί κατά τη διάρκεια της εξωγενούς χορήγησής της.

**Συζήτηση:** Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε τους ωοθηκικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την υποφυσιακή απάντηση, δηλαδή την έκκριση της LH, στη GnRH στις ανωοθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS. Επιλέχθηκε μια δυναμική προσέγγιση με διέγερση των ωοθηκών με χορήγηση μίας υψηλής δόσης ανασυνδυασμένης FSH, πριν και μετά τη θεραπεία με 300mg μικροκρυσταλλικής προγεστερόνης, στις γυναίκες με PCOS. Η P4 χορηγήθηκε με σκοπό να επαναφέρει στο φυσιολογικό την αυξημένη απάντηση της LH στη GnRH και να προσομοιώσει μία αρχόμενη ωοθυλακική φάση στις γυναίκες με PCOS. Με την ένεση της FSH διεγέρθηκε η παραγωγή από τις ωοθήκες διαφόρων στεροειδικών και μη ουσιών. Βρέθηκε λοιπόν ότι στην προσομοιωμένη αρχόμενη ωοθυλακική φάση των γυναικών με PCOS, η απαντητικότητα της LH στη GnRH μετά την ένεση της FSH ήταν παρόμοια με των υγιών γυναικών στην ίδια φάση του κύκλου. Οι τιμές της E2 αυξήθηκαν από την FSH παρόμοια και στις 3 πειραματικές ομάδες, ενώ οι τιμές των Inhibin A και Inhibin B αυξήθηκαν μόνο στις ομάδες των γυναικών με PCOS. Από τα αποτελέσματα αυτά συνάγεται ότι η

παραγωγή των ωοθηκικών ουσιών που επηρεάζουν την απαντητικότητα της LH στη GnRH είναι παρόμοια στις γυναίκες με PCOS και στις υγιείς.

**Συμπερασματικά**, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά, ότι η ωοθηκική διέγερση με μία μόνη υψηλή δόση FSH απέτυχε να ελαττώσει την υποφυσιακή απάντηση στη GnRH στις ανωθυλακιορρηκτικές γυναίκες με PCOS, αλλά το πέτυχε σε μία προσομοιωμένη αρχόμενη ωοθυλακική φάση σε αυτές τις γυναίκες που ακολούθησε την εξωγενή χορήγηση προγεστερόνης. Όλα αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν ότι: 1) η αυξημένη υποφυσιακή ευαισθησία στη GnRH, η αυξημένη έκκριση της LH δηλαδή, κατά τις περιόδους ανωθυλακιορρηξίας στις γυναίκες με PCOS δεν οφείλεται σε ελαττωμένη παραγωγή κάποιων ωοθηκικών ουσιών, αλλά σε ελαττωματική δράση των ωοθηκικών παραγόντων στο υποθαλαμοϋποφυσιακό σύστημα και 2) οι πολυκυστικές ωοθήκες είναι πιο ευαίσθητες από τις φυσιολογικές στην παραγωγή των Inhibin A και Inhibin B.

## SUMMARY

**Introduction:** It is well known that women with the polycystic ovary syndrome (PCOS) demonstrate an increased pituitary response to GnRH. Although both a disturbance in the feedback mechanisms and hypothalamic dysfunction have been implicated, the mechanism is not clear. The study aim was to investigate the ovarian control of LH responsiveness to GnRH in anovulatory women with the polycystic ovary syndrome (PCOS).

**Material & methods:** Ten (n=10) women with PCOS (aged 21-28 years) volunteered for the study. A single dose (450 IU) of recombinant FSH (experimental day 1) was injected into women with PCOS twice, i.e. 15-20 days following a spontaneous menstrual period and confirmed ovarian quiescence by ultrasonography and serum P4 measurement (Exp-1-PCOS) and after 20 days treatment with oral progesterone (Exp-2-PCOS) and into 8 normal controls on cycle day 2 (Exp-control). In each experiment, the 30-minutes response of LH to a single i.v. dose of 10 µg GnRH ( $\Delta$ LH) was investigated before the FSH injection and 12 hours later and then every 24 hours for the next five days. Blood samples in relation to GnRH injection (time 0) were taken at -15, 0 and 30 minutes. FSH, LH, E2, progesterone, inhibin A and inhibin B were measured in all blood samples. Statistical analysis was performed by paired t-test and repeated measures one-way analysis of variance with Geisser-Greenhouse adjustments. The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

**Results:**  $\Delta$ LH values were higher in Exp-1-PCOS than in Exp-2-PCOS and Exp-control.

In Exp-1-PCOS,  $\Delta$ LH values following FSH injection remained rather stable until day 2, increasing thereafter ( $p < 0.05$ ).

In Exp-2-PCOS and Exp-control,  $\Delta$ LH values were almost identical, decreasing until day 3 and increasing thereafter ( $p < 0.05$ ).

Estradiol values increased similarly in all three experiments after the FSH injection, while values of inhibins A and B increased in Exp-1-PCOS and Exp-2-PCOS, but not in Exp-control.

FSH levels were similar in all three experiments. They have increased significantly within the first 24 h after FSH injection and they have declined gradually thereafter ( $p < 0.05$ ).

Serum progesterone concentrations were low in all three experiments but have increased significantly in between Exp-1 and Exp-2, i.e. during the exogenous administration of this steroid.

**Discussion:** In the present study we investigated ovarian mechanisms that control the LH response to GnRH in anovulatory women with the polycystic ovary syndrome (PCOS). A dynamic approach involving ovarian stimulation with a single high dose FSH was applied before and after the administration of progesterone to the women. Progesterone was given in order to normalize the enhanced LH response to GnRH and to create a simulated early follicular phase in the PCOS women. With the injection of FSH, the production of various steroidal and non-steroidal factors was stimulated. We found that during the simulated follicular phase in the PCOS, the responsiveness of LH to GnRH following the FSH injection was almost identical to that in the early follicular phase of a group of normal women. Although FSH stimulated estradiol production similarly in the two groups, it failed to increase the levels of Inhibins A and B only in the normal women. It is suggested from these results that the production of ovarian factors controlling LH sensitivity to GnRH in anovulatory women with PCOS is comparable to that in normal women.

**In conclusion,** the present study demonstrates for the first time that ovarian stimulation with a single high dose FSH did not decrease the enhanced pituitary sensitivity of LH secretion to GnRH in anovulatory women with PCOS, but it did so during a simulated early follicular phase following treatment with a progesterone regimen. These results suggest that: 1) the enhanced pituitary sensitivity to GnRH in terms of LH secretion during the periods of anovulation in women with PCOS is not due to a reduced production but to a defective action of ovarian factors on the hypothalamic-pituitary system and 2) the polycystic ovaries are more sensitive to FSH than the controls regarding the production of inhibin A and inhibin B.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achard C, Thiers J** (1921). Le virilisme pileire et son association al'insuffisance glycolytique (diabete des femme a barbe). *Bull Acad Natl Med*: 86:51–83.
- Adams J, Polson DW, Franks S** (1986). Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J* 293: 355–359.
- Adams LA, Clifton DK, Bremner WJ, Steier RA** (1988). Testosterone modulates the differential release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone that occurs in response to changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the male monkey. *Biol Reprod* 38:156-162.
- Adams JM, Taylor AE, Schoenfeld DA, Crowley WF Jr, Hall JE** (1994). The midcycle gonadotropin surge in normal women occurs in the face of an unchanging gonadotropin-releasing hormone pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab* 79:858-864.
- Alexandris E, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, Lolis D, Messinis IE** (1997). Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:721-726.
- Ali Hassan H, El-Gezeiry D and Nafaa TM** (2001). Improved responsiveness of PCOS patients to clomiphene after CYP17a inhibitor. *J Assist Reprod Genet* 18:608–611.
- Amer SA, Li TC and Ledger WL** (2004). Ovulation induction using laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovarian syndrome: predictors of success. *Hum Reprod* 19:1719–1724.
- Anderson RA, Groome NP, Baird DT** (1998). Inhibin A and inhibin B in women with polycystic ovarian syndrome during treatment with FSH to induce mono-ovulation. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 48:577-584.
- Andreani CL, Pierro E, Lazzarin N, Lanzone A, Caruso A and Mancuso S** (1996). Effect of follicular fluid on granulosa luteal cells from polycystic ovary. *Hum Reprod* 11:2107–2113.
- Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF** (2000). A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2434–2438.
- Attardi B, Keeping HS, Winters SJ, Kotsuji F and Troen P** (1991). Comparison of the effects of cycloheximide and inhibin on the gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 128:119–125.
- Attardi B, Vaughan J and Vale W** (1992). Regulation of FSH beta messenger ribonucleic acid levels in the rat by endogenous inhibin. *Endocrinology* 130:557–559.
- Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fox L, Boots LR** (1999). Screening for 21-hydroxylase deficient non-classic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril* 72:915–925.
- Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, Whitcomb RW, Hanley R, Fereshetian AG, et al.** PCOS/Troglitazone Study Group (2001). Troglitazone improves



- ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*;86:1626–1632.
- Baccarelli A, Morpurgo PS, Corsi A, Vaghi I, Fanelli M, Cremonesi G, Vaninetti S, Beck-Peccoz P and Spada A** (2001). Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middleaged and elderly healthy subjects. *Exp Gerontol* 36:1403–1412.
- Balen AH, Er J, Rafferty B and Rose M** (1995a). In vitro bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor is not affected by an antibody to human inhibin. *J Reprod Fertil* 104:285–289.
- Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C and Jacobs HS** (1995b). Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod* 10:2107–2111.
- Batista MC, Cartledge TP, Zellmer AW, Nieman LK, Merriam GR and Loriaux DL** (1992). Evidence for a critical role of progesterone in the regulation of the midcycle gonadotropin surge and ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 74:565–570.
- Bergquist C, Nillius SJ, Bergh T, Skarin G, Wide L** (1979a). Inhibitory effects of gonadotropin secretion and gonadal function in men during chronic luteinizing hormone-releasing hormone analogue. *Acta Endocrinol (Copenh)* 91:601-608.
- Bergquist C, Nillius SJ, Wide L** (1979b). Reduced gonadotropin secretion in postmenopausal women during treatment with a stimulatory LRH analogue. *J Clin Endocrinol Metab* 49:472-474.
- Bicsak TA, Tucker EM, Cappel S, Vaughan J, Rivier J, Vale W and Hsueh AJ** (1986). Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 119:2711–2719.
- Bilezikjian LM, Vaughan JM and Vale WW** (1993). Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133:2545–2553.
- Bilezikjian LM, Corrigan AZ and Vale WW** (1994). Activin-B, inhibin-B and follistatin as autocrine/paracrine factors of the rat anterior pituitary. In Burger HG (ed.), *Challenges in Endocrinology and Modern Medicine*, Vol. 3. Ares Serono Symposium, Rome, Italy, pp. 81–99.
- Bili H, Laven J, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC** (2001). Age-related differences in features associated with polycystic ovary syndrome in normogonadotrophic oligo-amenorrhoeic infertile women of reproductive years. *Eur J Endocrinol* 145:749–755.
- Blake CA** (1978). Changes in plasma luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropin concentrations during constant rate intravenous infusion of luteinizing hormone-releasing hormone in cyclic rats. *Endocrinology* 102:1043-1052.
- Blaustein JD, Brown TJ** (1984). Progesterone decreases the concentration of hypothalamic and anterior pituitary estrogen receptors in ovariectomized rats. *Brain Research* 304:225-236.
- Boots LR, Potter S, Potter HD, Azziz R** (1998). Measurement of total serum testosterone levels using commercially available kits: high degree of between-kit variability. *Fertil Steril* 69:286–292.
- Buckler HM, Bangah M, Healy DL and Burger HG** (1992). Vaginal progesterone administration in physiological doses normalizes raised luteinizing

hormone levels in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 6:275–282.

**Burger HG, Cahir N, Robertson DM, Groome NP, Dudley E, Green A and Dennerstein L** (1998). Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:550.

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

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

**Carey AH, Chan KL, Short F, White D, Williamson R, Franks S** (1993). Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol* 38:653–658.

**Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA** (1992). Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism in insulin resistance in the polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 167:1807–1812.

**Carmina E, Lobo RA** (2001). Polycystic ovaries in hirsute women with normal menses. *Am J Med* 111:602–606.

**Caspar RF, Yen SSC, Wilkes MM** (1979). Menopausal flushes: a neuroendocrine link with pulsatile luteinizing hormone secretion. *Science* 205:823–825.

**Cetel NS, Rivier J, Vale W, Yen SSC** (1983). The dynamics of gonadotropin inhibition in women induced by an antagonistic analog of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 57:62–65.

**Chabbert-Buffeta N, Skinner DC, Caraty A and Bouchard P** (2000). Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 65:613–620.

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

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

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

**Christin-Maitre S, Taylor AE, Houry RH, Hall JE, Martin KA, Smith PC, Albanese C, Jameson JL, Crowley WF Jr and Sluss PM** (1996). Homologous in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) reveals increased FSH biological signal during the mid- to late luteal phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2080–2088.

**Christman GM, Randolph JF, Kelch RP, Marshall JC** (1991). Reduction of gonadotropin releasing hormone pulse frequency is associated with subsequent selective follicle-stimulating hormone secretion in women with polycystic ovarian disease *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 72:1278–1285.

**Cibula D, Hill M and Starka L** (2000). The best correlation of the new index of hyperandrogenism with the grade of increased hair. *Eur J Endocrinol* 143:405–408.

- Coffler MS, Patel K, Dahan MH et al.** (2003) Evidence for abnormal granulosa cell responsiveness to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 1742-1747.
- Comite F, Cutler GB, Rivier J, Vale WW, Loriaux DL, Crowley WF** (1981). Short-term treatment of idiopathic precocious puberty with a long-acting analog of luteinizing hormone-releasing hormone. *N Engl J Med* 305:1546-1550.
- Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH and Vale W** (1991). Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 128:1682-1684.
- Crowley WF Jr, Whitcomb RW, Jamesn JL, Weiss J, Finkelstein JS, O'Dea L St L** (1991). Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent Prog Horm Res* 47:27-62.
- Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, Kallitsaris A, Galazios G, Zintzaras E, Sotiros P and Messinis IE** (2004a). Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen-treated post-menopausal women: evidence that gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum Reprod* 19:1985-1992.
- Dafopoulos KC, Kotsovassilis CP, Milingos SD, Kallitsaris AT, Georgadakis GS, Sotiros PG and Messinis IE** (2004b). FSH and LH responses to GnRH after ovariectomy in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:120-124.
- Dafopoulos K, Mademtzis I, Vanakara P, Kallitsaris A, Stamatiou G, Kotsovassilis C and Messinis IE** (2006). Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab* 91:641-645.
- Danforth DR, Elkind-Hirsch K, Hodgen GD** (1990). In vivo and in vitro modulation of gonadotrophin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 127:319-324.
- Danforth DR, Arbogast LK, Mroueh J, Kim MH, Kennard EA, Seifer DB and Friedman CI** (1998). Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril* 70:119-123.
- Daw E** (1974). Luteinising hormone (LH) changes in women undergoing artificial menopause. *Curr Med Res Opin* 2:256-259.
- De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, Nieschlag E and Holzgreve W** (2002). Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Hum Reprod* 17:933-939.
- de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL and Phillips DJ** (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8:529-541.
- Derksen J, Nagesser SK, Meinders AE, Haak HR and van de Velde CJ** (1994). Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. *N Engl J Med* 331:968-973.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP and Fauser BC** (2002). Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 77:357-362.
- Diamanti-Kandarakis E, Koulie CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al** (1999). A survey of the polycystic ovary syndrome

in the Greek Island of Lesbos: a hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4006–4011.

**Djahanbakhch O, McNeilly AS, Warner PM, Swanston IA and Baird DT** (1984). Changes in plasma levels of prolactin, in relation to those of FSH, oestradiol, androstenedione and progesterone around the preovulatory surge of LH in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 20:463–472.

**Doldi N, Gessi A, Destefani A, Calzi F and Ferrari A** (1998). Polycystic ovary syndrome: anomalies in progesterone production. *Hum Reprod* 13:290–293.

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

**Duleba AJ, Banaszewska B, Spaczynski RZ and Pawelczyk L** (2003). Success of laparoscopic ovarian wedge resection is related to obesity, lipid profile, and insulin levels. *Fertil Steril* 79:1008–1014.

**Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS and Marshall JC** (2000). Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4047–4052.

**Ehrmann DA, Schneider DJ, Sobel BE, Cavaghan MK, Imperial J, Rosenfield RL and Polonsky KS** (1997). Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2108–2116

**Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial Jb** (1999). Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22:141–146.

**Ehrmann D** (2005). Polycystic ovary syndrome. *N Eng J Med* 352:1223-1236.

**Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP and Chang RJ** (1992). Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum Reprod* 7:293–299.

**ESHRE Capri Workshop Group** (1995). Anovulatory infertility. *Hum Reprod* 10:1549-1553.

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

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

**Evans LW, Muttukrishna S and Groome NP** (1998). Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for human follistatin. *J Endocrinol* 156:275–282.

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

- Farnworth PG** (1995). Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J Endocrinol* 145:387-395.
- Fauser BC, Pache TD, Lamberts SW, Hop WC, de Jong FH and Dahl KD** (1991). Serum bioactive and immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in women with cycle abnormalities, with or without polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 811–817.
- Ferin M, Dyrenfurth I, Cowchock S, Warren M and Wiele RL** (1974). Active immunization to 17 beta-estradiol and its effects upon the reproductive cycle of the rhesus monkey. *Endocrinology* 94:765–776.
- Ferin M, Rosenblatt H, Carmel PW, Antunes JL and Vande Wiele RL** (1979). Estrogen-induced gonadotropin surges in female rhesus monkeys after pituitary stalk section. *Endocrinology* 104:50–52.
- Fiad TM, Cunningham SK, McKenna TJ** (1996). Role of progesterone deficiency in the development of luteinizing hormone and androgen abnormalities in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology* 135:335-339.
- Ficioglu C, Api M and Ozden S** (1996). The number of follicles and ovarian volume in the assessment of response to clomiphene citrate treatment in polycystic ovarian syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 75:917–921.
- Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF Jr** (1986). Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 62:1136-1144.
- Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Ferrari P, Meriggiola MC, Michelacci L, Pareschi A, Valdiserri A** (1989). Evidence for a specific role of GnRH pulse frequency in the control of the human menstrual cycle. *Am J Physiol* 257:E930-E936.
- Finkelstein JS, Badger TM, O’Dea L St L, Spratt DI, Crowley WF** (1988). Effects of decreasing the frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation on gonadotropin secretion in gonadotropin-releasing hormone-deficient men and perfuse rat pituitary cells. *J Clin Invest* 81:1725-1733.
- Fisher SA, Reid RL, Van Vugt DA and Casper RF** (2002). A randomized double-blind comparison of the effects of clomiphene citrate and the aromatase inhibitor letrozole on ovulatory function in normal women. *Fertil Steril* 78:280–285.
- Fowler PA, Messinis IE, Templeton AA** (1990). Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. *J Reprod Fertil* 90:587-594.
- Fowler PA, Townsend C, Messinis IE, Cunningham P, Templeton A** (1992). Gonadotrophin surge-attenuating factor attenuates in-vitro LH secretion induced by gonadotrophin-releasing hormone from cultured ovine pituitary cells only during the breeding season. *J Endocrinol* 135:221-227.
- Fowler PA, Messinis IE, Cunningham P, Fraser M, Templeton AA** (1993). Effects of gonadotrophin surge attenuating factor on the two pools of GnRH-induced LH secretion. *Hum Reprod* 8:822-828.
- Fowler PA and Price C** (1997) Follicle-stimulating hormone stimulates circulating gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor bioactivity in cows *Biology of Reproduction* 57:278–285.

- Fowler PA and Mason HD** (2000). Human granulosa cells secrete gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity acutely in response to FSH in vitro. *Journal of Endocrinology* 164: Supplement P 243.
- Fowler PA, Sorsa T, Harris WJ, Knight PG, Mason HD** (2001). Relationship between follicle size and gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women. *Hum Reprod* 16:1353-1358.
- Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W and Mason HD** (2003). Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction* 126:689–699.
- Franks S** (1989). Polycystic ovary syndrome: a changing perspective (review). *Clin Endocrinol* 31:87–120.
- Franks S** (2002). Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16:263-272.
- Fraser HM, McNeilly AS, Popkin RM** (1986). Effect of LHRH immunoneutralization on follicular development, the LH surge and luteal function in the stump-tailed macaque monkey (*Macaca arctoides*). *J Repro Fertil* 76:299-309.
- Furuhashi M, Suganuma N and Nishimori K** (2002). Successful pregnancy in a patient having high basal serum levels of sex steroid hormones. *Arch Gynecol Obstet* 267:46–48.
- Futterweit W, Dunaif A, Yeh C, Kingsley P** (1988). The prevalence of hyperandrogenism in 109 consecutive female patients with diffuse alopecia. *J Med Acad Dermatol* 19:831–836.
- Garcia A, Schiff M, Marshall JC** (1984). Regulation of pituitary GnRH receptors by pulsatile GnRH injections in male rats. *J Clin Invest* 74:920-928.
- Gebre-Medhin G, Husebye ES, Mallmin H, Helstrom L, Berne C, Karlsson FA and Kampe O** (2000). Oral dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement therapy in women with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:775–780.
- Genazzani AD, Rodbard D, Forti G, Petraglia F, Baraghini GF, Genazzani AR** (1990). Estimation of instantaneous secretory rate of luteinizing hormone in women during the menstrual cycle and in men. *Clin Endocrinol* 32:573-581.
- Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW and Franks S** (1994). Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1158–1165.
- Gjonnaess H** (1994). Ovarian electrocautery in the treatment of women with polycystic ovary syndrome (PCOS) Factors affecting the results. *Acta Obstet Gynecol Scand* 73:407–412.
- Gordon A, Garrido-Gracia JC, Aguilar R et al.** (2008). The ovary-mediated FSH attenuation of the LH surge in the rat involves a decreased gonadotroph progesterone receptor (PR) action but not PR expression. *Journal of Endocrinology* 196:583-592.
- Gosselin N, Price CA, Roy R and Carriere PD** (2000). Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: evidence for negative feedback other than oestradiol and progesterone. *Theriogenology* 54:507–521.
- Graham JD and Clarke CL** (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502–519.

- Greenblatt E and Casper RF** (1987). Endocrine changes after laparoscopic ovarian cautery in polycystic ovarian syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 156:279–285.
- Gregg DW, Allen MC, Nett TM** (1990). Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 43:1032-1036.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, McNeilly AS** (1994). Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol* 40:717-723.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS** (1996). Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1401-1405.
- Gross KM, Matsumoto AM, Bremner WJ** (1987). Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by luteinizing hormone-releasing hormone pulse frequency in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64:675-680.
- Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ellis TR, Paul SJ, Marshall JC** (1990). Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by GnRH pulse amplitude in female rats. *Endocrinology* 127:2869-2875.
- Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA and Crowley WF Jr** (1992). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 74:600–607.
- Hall JE, Lavoie HB, Marsh EE, Martin KA** (2000). Decrease in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency with ageing in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1794-1800.
- Hasegawa I, Murakawa H, Suzuki M, Yamamoto Y, Kurabayashi T and Tanaka K** (1999). Effect of troglitazone on endocrine and ovulatory performance in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 71:323–327.
- Hendriks ML, Brouwer J, Hompes PG et al.** (2008). LH as a diagnostic criterion for polycystic ovary syndrome in patients with WHO II oligo/amenorrhoea. *Reproductive Biomedicine Online* 16:765-771.
- Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC** (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57:751-759.
- Herbison AE** (1998). Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330.
- Hoff JD, Lasley CL, Wang CF, Yen SSC** (1977). The two pools of the pituitary gonadotropin: regulation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 44:302-313.
- Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC** (1983). Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 57:792-796.
- Huang ES, Miller WL** (1980). Effects of estradiol-17 $\beta$  on basal and luteinising hormone releasing hormone-induced secretion of luteinising hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture. *Biol Reprod* 23:124-134.

- Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Marcos MV, Rodriguez-Hierro F and de Zegher F** (2001). Sensitization to insulin induces ovulation in nonobese adolescents with anovulatory hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3595–3598.
- Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB and De Zegher F** (2002). Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2870–2874.
- Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Marcos MV, Rodriguez-Hierro F and de Zegher F** (2001). Sensitization to insulin induces ovulation in nonobese adolescents with anovulatory hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3595–3598.
- Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB and De Zegher F** (2002). Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2870–2874.
- Iliff-Sizemore SA, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Krueger KA, Marshall JC** (1990). Testosterone differentially modulates gonadotropin subunit mRNA responses to GnRH pulse amplitude. *Endocrinology* 127:2876-2883.
- Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Payne NN, Bouchard P, Giudice LC and Fauser BC** (2000). Free androgen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85:676-682.
- Johansson ED and Wide L** (1969). Periovulatory levels of plasma progesterone and luteinizing hormone in women. *Acta Endocrinol (Copenh)* 62:82–88.
- Judd S, Terry A, Petrucco M and White G** (1992). The source of pulsatile secretion of progesterone during the human follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab* 74:299–305.
- Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW** (2001). Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 13:741-748.
- Karande VC, Scott RT Jr and Archer DF** (1990). The relationship between serum estradiol-17 beta concentrations and induced pituitary luteinizing hormone surges in postmenopausal women. *Fertil Steril* 54:217–221.
- Karsch FJ, Weick RF, Butler WR, Dierschke DJ, Krey LC, Weiss G, Hotchkiss J, Yamasi T, Knobil E.** (1973). Induced LH surges in the rhesus monkey: strength-duration characteristics of the estrogen stimulus. *Endocrinology* 92:1740-1747.
- Kawakami M, Uemura T, Hayashi R** (1982). Electrophysiological correlates of pulsatile gonadotropin release in rats. *Neuroendocrinology* 35:63-67.
- Kazem R, Messinis IE, Fowler P, Groome NP, Knight PG, Templeton AA** (1996). Effect of mifepristone (RU486) on the pituitary response to gonadotrophin releasing hormone in women. *Hum Reprod* 11:2585-2590.
- Kelner KL and Peck EJ Jr** (1984). Differential sensitivity of estrogen target tissues: implications for estrogen regulation of serum luteinizing hormone. *J Neurosci Res* 11:79–89.
- Kettel LM, DePaolo LV, Morales AJ, Apter D, Ling N, Yen SS** (1996). Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertil Steril* 65:472-476.



- Keye WR Jr and Jaffe RB** (1975). Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. I. Effects of varying duration of estradiol administration. *J Clin Endocrinol Metab* 41:1003–1008.
- Khoury RH, Wang QF, Crowley WF Jr, Hall JE, Schneyer AL, Toth T, Midgley AR Jr and Sluss PM** (1995). Serum follistatin levels in women: evidence against an endocrine function of ovarian follistatin. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1361–1368.
- King JC, Tai DW, Hanna IK, Pfeiffer A, Haas P, Ronsheim PM, Mitchell SC, Turcotte JC, Blaustein JD** (1995). A subgroup of LHRH neurons in guinea pigs with progesterin receptors is centrally positioned within the total population of LHRH neurons. *Neuroendocrinology* 61:265-275.
- Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE and Soules MR** (1996). Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2742–2745.
- Klein NA, Houmard BS, Hansen KR, Woodruff TK, Sluss PM, Bremner WJ and Soules MR** (2004). Age-related analysis of inhibin A, inhibin B, and activin a relative to the intercycle monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2977–2981.
- Klungland H, Andersen O, Kisen G, Alestrom P, Tora L** (1993). Estrogen receptor binds to the salmon GnRH gene in a region with long palindromic sequences. *Mol Cell Endocrinol* 95:147-54.
- Knobil E** (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36:53-88.
- Knobil E** (1988). The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod* 3:469–472.
- Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R** (1988). Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women in the Southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3078–3082.
- Kovacs G, Smith J** (2002). *A Guide to the Polycystic Ovary: Its effects on health and fertility*. Castle Hill Barns, UK: TFM Publishing.
- Kreisberg RA** (1994). Clinical problem-solving. Half a loaf. *N Engl J Med* 330:1295–1299.
- Krosnick A** (2000). The diabetes and obesity epidemic among the Pima Indians. *N J Med* 97:31-37.
- Laatikainen T, Raisanen I, Tulenheimo A and Salminen K** (1985). Plasma betaendorphin and the menstrual cycle. *Fertil Steril* 44:206–209.
- Laborde N, Carril M, Cheviakoff S, Croxatto HD, Pedroza E and Rosner JM** (1976). The secretion of progesterone during the periovulatory period in women with certified ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 43:1157–1163.
- Lagrange AH, Rønnekleiv OK, Kelly MJ** (1995). Estradiol-17 $\beta$  and  $\mu$ -opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback. *Endocrinology* 136:2341-2344.
- la Marca A, Morgante G, Paglia T, Ciotta L, Cianci A and De Leo V** (1999).

Effects of metformin on adrenal steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 72:985–989.

**la Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F and De Leo V** (2002). Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 78:1234–1239.

**Landgren BM, Aedo AR, Nunez M, Cekan SZ and Diczfalusy E** (1977). Studies on the pattern of circulating steroids in the normal menstrual cycle. 4. Perioviulatory changes in relation to the LH surge. *Acta Endocrinol (Copenh)* 84:620–632.

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

**Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC** (2002). New approaches to PCOS and other forms of anovulation. *Obstet Gynecol Surv* 57:755–767.

**Laven JS, Fauser BC** (2004). Inhibins and adult ovarian function. *Molecular Cellular Endocrinology* 225:37–44.

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

**Laws SC, Webster JC, Miller WL** (1990b). Estradiol alters the effectiveness of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology* 127:381–386.

**Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D and Bouchard P** (1993). Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 77:439–442.

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

**Lee WS, Smith MS and Hoffman GE** (1990). Progesterone enhances the surge of luteinizing hormone by increasing the activation of luteinizing hormone releasing hormone neurons. *Endocrinology* 127:2604–2606.

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

**Legro RS, Ary BA, Paulson RJ, Stanczyk FZ and Sauer MV** (1993). Premature luteinization as detected by elevated serum progesterone is associated Menstrual status in PCOS with a higher pregnancy rate in donor oocyte in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 8:1506–1511.

**Legro RS, Driscoll D, Strauss JF III, Fox J, Dunaif A** (1998). Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14956–14960.

**Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A** (1999). Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:165–169.

**Leranth C, MacLusky NJ, Brown TJ, Chen EC, Redmond DE, Naftolin F** (1992). Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive

progesterin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 55:667-682.

**Li Q, Niwa K and Hunter MG** (2004). Effects of 17beta-estradiol on in vitro maturation of pig oocytes in protein-free medium. *J Reprod Dev* 50: 305–313.

**Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R** (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$ -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779-782.

**Lind T, Cameron EH and Hunter WM** (1978). Serum prolactin, gonadotrophin and oestrogen levels in women receiving hormone replacement therapy. *Br J Obstet Gynaecol* 85:138–141.

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

**Liu ZH, Shintani Y, Wakatsuki M, Sakamoto Y, Harada K, Zhang CY and Saito S** (1996a). Regulation of immunoreactive activin A secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr J* 43:39–44.

**Liu ZH, Shintani Y, Sakamoto Y, Harada K, Zhang CY, Fujinaka Y, Abe M, Goto T and Saito S** (1996b). Effects of LHRH, FSH and activin A on follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr J* 43:321-327.

**Lobo RA, Granger L, Goebelsmann U and Mishell DR Jr** (1981). Elevations in unbound serum estradiol as a possible mechanism for inappropriate gonadotropin secretion in women with PCO. *J Clin Endocrinol Metab* 52:156–158.

**Lockwood GM** (2000). The role of inhibin in polycystic ovary syndrome. *Hum Fertil (Camb)* 3:86–92.

**Lopez-Lopez E, Noguera MC, Fuente T, Parrilla JJ and Abad L** (1987). Response to clomiphene citrate in the polycystic ovarian syndrome according to different LH/FSH ratios. *Hum Reprod* 2:635–638.

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

**Loverro G, Lorusso F, De Pergola G, Nicolardi V, Mei L and Selvaggi L** (2002). Clinical and endocrinological effects of 6 months of metformin treatment in young hyperinsulinemic patients affected by polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 16:217–224.

**Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL and Yen SSC** (1987). Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1109–1114.

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

**Marshall JC and Kelch RP** (1986). Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 315:1459–1468.

**Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML and Kelch RP** (1992). GnRH pulses—the regulators of human reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 104:31–46.

- Mather JP, Woodruff TK and Krummen LA** (1992). Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 201:1–15.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV** (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339.
- McCartney CR, Gingrich MB, Hu Y, Evans WS and Marshall JC** (2002). Hypothalamic regulation of cyclic ovulation: evidence that the increase in gonadotropin-releasing hormone pulse frequency during the follicular phase reflects the gradual loss of the restraining effects of progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2194–2200.
- McConnell DS, Wang Q, Sluss PM, Bolf N, Khoury RH, Schneyer AL, Midgley AR Jr, Reame NE, Crowley WF Jr and Padmanabhan V** (1998). A two-site chemiluminescent assay for activin-free follistatin reveals that most follistatin circulating in men and normal cycling women is in an activin-bound state. *J Clin Endocrinol Metab* 83:851–858.
- McCormack JT, Plant TM, Hess DL, Knobil E** (1977). The effect of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) antiserum administration on gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 100:663-667.
- McEwen BS** (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12:141-147.
- McIntosh RP, McIntosh JE** (1985). Amplitude of episodic release of LH as a measure of pituitary function analyzed from the time-course of hormone levels in the blood: comparison of 4 menstrual cycles in an individual. *J Endocrinol* 107:231-239.
- McLachlan RI, Dahl KD, Bremner WJ, Schwall R, Schmelzer CH, Mason AJ and Steiner RA** (1989). Recombinant human activin-A stimulates basal FSH and GnRH-stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology* 125:787–2789.
- McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R and Ryan KJ** (1979a). The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49:687–699.
- McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R and Ryan KJ** (1979b). The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49:851–860.
- Meldrum DR and Abraham GE** (1979). Peripheral and ovarian venous concentrations of various steroid hormones in virilizing ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 53:36-43.
- Messinis IE and Templeton AA** (1987a). Endocrine and follicle characteristics of cycles with and without endogenous luteinizing hormone surges during superovulation induction with pulsatile follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 2:11–16.
- Messinis IE and Templeton AA** (1987b). Disparate effects of endogenous and exogenous oestradiol on luteal phase function in women. *J Reprod Fertil* 79:549–554.
- Messinis IE and Templeton AA** (1988a). The endocrine consequences of multiple folliculogenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 36:27–37.

- Messinis IE and Templeton A** (1988b). Blockage of the positive feedback effect of oestradiol during prolonged administration of clomiphene citrate to normal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 29:509–516.
- Messinis IE, Templeton AA** (1989). Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. *J Reprod Fertil* 87:633-639
- Messinis IE, Templeton AA** (1990a). Effects of supraphysiological concentrations of progesterone on the characteristics of the oestradiol-induced gonadotrophin surge in women. *J Reprod Fertil* 88:513-519.
- Messinis IE, Templeton AA** (1990b). In vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol (Oxf)* 33:213-218.
- Messinis IE, Templeton AA** (1990c). Superovulation induction in women suppresses luteinising hormone secretion at the pituitary level. *Clin Endocrinol (Oxf)* 32:107-114.
- Messinis IE, Templeton AA** (1991a). Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol (Oxf)* 34:259-263.
- Messinis IE, Templeton AA** (1991b) Evidence that gonadotrophin surge-attenuation factor exists in man. *J Reprod Fert* 92:217-223.
- Messinis IE, Hirsch P, Templeton AA** (1991). Follicle stimulating hormone stimulates the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf)* 35:403-407.
- Messinis IE, Mademtzis I, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Tsolas O, Templeton AA** (1992). Positive feedback effect of oestradiol in superovulated women. *Hum Reprod* 7:469-474.
- Messinis IE, Koutsoyiannis D, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Lolis D, Templeton AA** (1993a). Changes in pituitary response to GnRH during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38:159-163.
- Messinis IE, Lolis D, Papadopoulos L, Tsahalina T, Papanikolaou N, Seferiadis K, Templeton AA** (1993b). Effect of varying concentrations of follicle stimulating hormone on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39:45-50.
- Messinis IE, MacTavish A, Templeton AA** (1993c). Activity of gonadotrophin surge-attenuating factor during the luteal phase in superovulated women. *J Reprod Fertil* 97:271-275.
- Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA** (1994a). Effect of an increase in FSH on the production of gonadotrophin-surge-attenuating factor in women. *J Reprod Fertil* 101:689-695.
- Messinis IE, Lolis D, Papastergiopoulou L, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA** (1994b). Effect of follicle stimulating hormone treatment on the pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in post-menopausal women. *Hum Reprod* 9:241-244.
- Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA** (1994c). Modulation of the action of gonadotrophin surge-attenuating factor by gonadotrophin-releasing hormone. *Hum Reprod* 9:1437-1441.
- Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K and Templeton AA** (1996). Effect of follicle stimulating hormone or human chorionic gonadotrophin treatment on the production of gonadotrophin surge attenuating

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

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

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

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

**Messinis IE, Loutradis D, Domali E, Kotsovassilis CP, Papastergiopoulou L, Kallitsaris A, Drakakis P, Dafopoulos K and Milingos S** (2005). Alternate day and daily administration of GnRH antagonist may prevent premature luteinization to a similar extent during FSH treatment. *Hum Reprod* 20:3192–3197.

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

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

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

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

**Michelmore KF, Balen AH, Dunger DB, Vessey MP** (1999) Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in youngwomen. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:779-86.

**Miro F and Aspinall LJ** (2005). The onset of the initial rise in follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 20:96–100.

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

**Mitwally MF and Casper RF** (2001). Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril* 75:305–309.

**Mitwally MF and Casper RF** (2002). Aromatase inhibition for ovarian stimulation: future avenues for infertility management. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:255–263.

**Miyake A, Tasaka K, Kawamura Y, Sakumoto T and Aono T** (1982). Progesterone facilitates the LRH releasing action of oestrogen. *Acta Endocrinol (Copenh)* 101:321–324.

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

- Moenter SM, Caraty A, Locatelli A, Karsch FJ** (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 129:1175-1182.
- Moller DE, Cohen O, Yamaguchi Y, Azziz R, Grigorescu F, Eberle A, et al** (1994). Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 43:247-255.
- Molskness TA, Woodruff TK, Hess DL, Dahl KD and Stouffer RL** (1996). Recombinant human inhibin-A administered early in the menstrual cycle alters concurrent pituitary and follicular, plus subsequent luteal, function in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4002-4006.
- Monroe SE, Jaffe RB and Midgley AR Jr** (1972a). Regulation of human gonadotropins. XII. Increase in serum gonadotropins in response to estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 34:342-347.
- Monroe SE, Jaffe RB and Midgley AR Jr** (1972b) Regulation of human gonadotropins.13. Changes in serum gonadotropins in menstruating women in response to oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 34:420-422.
- Moran C, Knochenhauer E, Boots LR and Azziz R** (1999). Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil Steril* 71:671-674.
- Mori Y, Nishihara M, Tanaka T, Shimizu T, Yamaguchi M, Takeuchi Y, Hoshino K** (1991). Chronic recording of electrophysiological manifestation of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the goat. *Neuroendocrinology* 53:392-395.
- Mortimer RH, Lev-Gur M, Freeman R, Fleischer N** (1978). Pituitary response to bolus and continuous intravenous infusion of luteinizing hormone-releasing factor in normal women and women with polycystic ovarian syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 130:630-634.
- Muttukrishna S, Knight PG** (1991). Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J Mol Endocrinol* 6:171-178.
- Muttukrishna S, Fowler PA, George L, Groome NP, Knight PG** (1996). Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3328-3334.
- Muttukrishna S, Child T, Lockwood GM, Groome NP, Barlow DH and Ledger WL** (2000). Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroids during the menstrual cycle in older women. *Hum Reprod* 15:549-556.
- Muttukrishna S, Sharma S, Barlow DH, Ledger W, Groome N and Sathanandan M** (2002). Serum inhibins, estradiol, progesterone and FSH in surgical menopause: a demonstration of ovarian pituitary feedback loop in women. *Hum Reprod* 17:2535-2539.
- Muttukrishna S, Tannetta D, Groome N and Sargent I** (2004). Activin and follistatin in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 225:45-56.
- Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E** (1978). On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102: 1008-1014.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K and Sugino H** (1990). Activin binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247:836-838.

- Nelson LR and Bulun SE** (2001). Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45:S116–S124.
- Nelson VL, Legro RS, Strauss JF III, McAllister JM** (1999). Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 13:946-957.
- Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, et al.** (2001). The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:
- Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R** (1998). Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*;338:1876–1880.
- Nippoldt B, Reame NE, Kelch RP, Marshall JC** (1989). The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69:67-76.
- O'Byrne KT, Chen MD, Nishihara M, Williams CL, Thalabard JC, Hotchkiss J, Knobil E** (1993). Ovarian control of gonadotropin hormone-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: duration of the associated hypothalamic signal. *Neuroendocrinology* 57:588-592.
- Pache TD, Chadha S, Gooren LJ, Hop WC, Jaarsma KW, Dommerholt HB, et al** (1991). Ovarian morphology in long-term androgen-treated female-to-male transsexuals. A human model for the study of PCOS? *Histopathology* 19:445–452.
- Padmanabhan V, McNeilly AS** (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 121:21-30.
- Padmanabhan V, Christman GM, Randolph JF et al.** (2001) Dynamics of bioactive follicle-stimulating hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome: effects of estradiol and progesterone. *Fertility and Sterility* 75:881-888.
- Padmanabhan V, Battaglia D, Brown MB, Karsch FJ, Lee JS, Pan W, Phillips DJ and Van Cleeff J** (2002). Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion. II. Is follistatin-induced suppression of FSH secretion mediated via changes in activin availability and does it involve changes in gonadotropin-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 66:1395–1402.
- Palter SF, Tavares AB, Hourvitz A, Veldhuis JD and Adashi EY** (2001). Are estrogens of import to primate/human ovarian folliculogenesis? *Endocr Rev* 22:389–424.
- Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS and Marshall JC** (1998). Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 83:582–590.
- Patel K, Coffler MS, Dahan MH et al.** (2004). Relationship of GnRH-stimulated LH release to episodic LH secretion and baseline endocrine-metabolic measures in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 60:67-74.
- Pickering AJ-MC, Fink G** (1979). Variation in size of the “readily releasable pool” of luteinizing hormone during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 83:53-59.



- Pigny P, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Deroubaix D, Soudan B, Duhamel A and Dewailly D** (2000). Serum levels of inhibins are differentially altered in patients with polycystic ovary syndrome: effects of being overweight and relevance to hyperandrogenism. *Fertil Steril* 73:972–977.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D** (2003) Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5957–5962.
- Plant TM, Krey LC, Moossy J, McCormack JT, Hess DL, Knobil E** (1978). The arcuate nucleus and the control of gonadotropin and prolactin secretion in the female rhesus monkey (*maccaca mulatta*). *Endocrinology* 1012:52-62.
- Pohl CR, Richardson DW, Hutchinson JS, Germak LA, Knobil E** (1983). Hypophysiotropic signal frequency and the functioning of the pituitary-ovarian system in the rhesus monkey. *Endocrinology* 112:2076-2080.
- Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L** (1994). Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1–1. *Endocrinology* 135:2623-2628.
- Polson DW, Wadsworth J, Adams J, Franks S** (1988). Polycystic ovaries a common finding in normal women. *Lancet* 1:870–872.
- Pugeat M, Nicolas MH, Craves JC, Alvarado-Dubost C, Fimbel S, Cechaud H, et al** (1993). Androgens in polycystic ovarian syndrome. *Ann NY Acad Sci* 687:124–135.
- Radovick S, Wray S, Muglia L, Westphal H, Olsen B, Smith E, Patriquin E, Wondisford FE** (1994). Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals. *Horm Behav* 28:520-529.
- Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR** (1997). Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-neuron signaling pathway. *J Neurosci* 17:9145-9156.
- Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger WW, Baldwin DM** (1987). The effects of gonadotropin-releasing hormone and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1503-1513.
- Reame N, Sauder SE, Kelch RP, Marshall JC** (1984). Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 59:328-337.
- Richardson DW, Gordon K, Billiar RB and Little AB** (1992). Chronic hyperestrogenemia: lack of positive feedback action on gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone release and dual site of negative feedback action. *Endocrinology* 130:1090–1096.
- Rittmaster RS** (1993). Androgen conjugates: physiology and clinical significance. *Endocrine Rev* 14:121–132.
- Rivier C, Vale W** (1991). Effects of recombinant activin-A on gonadotrophin secretion in the female rat. *Endocrinology* 129:2463-2465.
- Rivier C, Rivier J and Vale W** (1986). Inhibin-mediated feedback control of folliclestimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234:205–208.

- Rivier C, Schwall R, Mason A, Burton L, Vaughan J and Vale W** (1991). Effect of recombinant inhibin on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 128:1548–1554.
- Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS** (1993). Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1402-1410.
- Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG and de Kretser DM** (1987). The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun* 149:744–749.
- Rodbard D** (1970). Pituitary and gonadal hormones in women during spontaneous and induced ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 26:1–62.
- Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG and Yen SSC** (1989). Dynamic changes in circulating inhibin levels during the lutealfollicular transition of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1033–1039.
- Rosner W** (1997). Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2014–2015.
- Ross GT, Cargille CM, Lipsett MB, Rayford PL, Marshall JR, Strott CA and Roy D, Angelini NL, Belsham DD** (1999). Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$ -expressing GT1–7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140:5045-5053.
- Rowe PJ, Comhaire FH and Hargreave TB** (2000). Female partner. In: WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge University Press, pp. 40-67.
- Ruutiainen K, Erkkola R, Gronroos MA, Irjala K** (1998). Influence of body mass index and age on the grade of hair growth in hirsute women of reproductive ages. *Fertil Steril* 50:260–265.
- Santoro N, Banwell T, Tortoriello D, Lieman H, Adel T and Skurnick J** (1998). Effects of aging and gonadal failure on the hypothalamic-pituitary axis in women. *Am J Obstet Gynecol* 178:732–741.
- Santoro N, Adel T and Skurnick JH** (1999). Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril* 71:658–662.
- Sattar N, Hopkinson ZE and Greer IA** (1998). Insulin-sensitising agents in polycystic-ovary syndrome. *Lancet* 351:305–307.
- Schally AV, Arimura A, Baba Y** (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43:393-399.
- Schumacher M** (1990). Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci* 13: 359–361.
- Schreihofe DA, Stoler MH and Shupnik MA** (2000). Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ER $\alpha$  protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 141:2174–2184.

- Schreihofe DA, Rowe DF, Rissman EF, Scordalakes EM, Gustafsson JJA and Shupnik MA** (2002). Estrogen receptor-alpha (ERalpha), but not ERbeta, modulates estrogen stimulation of the ER alpha-truncated variant, TERP-1. *Endocrinology* 143:4196–4202.
- Seli E and Duleba AJ** (2002). Should patients with polycystic ovarian syndrome be treated with metformin? *Hum Reprod* 17:2230–2236.
- Shaw RW** (1976). Tests of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Clin Obstet Gynaecol* 3:485–503.
- Shen ES, Meade EH, Pe´rez MC, Deecher DC, Negro-Vilar A, Lopez FJ** (1998). Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology* 139:939-948.
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW** (1983). Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304:345-347.
- Shoham Z, Schacter M, Loumaye E, Weissman A, MacNamee M and Insler V** (1995). The luteinizing hormone surge – the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering. *Fertil Steril* 64:237–251.
- Shulman A, Ghetler Y, Beyth Y and Ben-Nun I** (1996). The significance of an early (premature) rise of plasma progesterone in in vitro fertilization cycles induced by a “long protocol” of gonadotropin releasing hormone analogue and human menopausal gonadotropins. *J Assist Reprod Genet* 13:207–211.
- Sim JA, Skynner MJ, Herbison AE** (2001). Direct regulation of postnatal GnRH neurons by the progesterone derivative allopregnanolone in the mouse. *Endocrinology* 142:4448-4453.
- Simon JA, Bustillo M, Thorneycroft IH, Cohen SW and Buster JE** (1987). Variability of midcycle estradiol positive feedback: evidence for unique pituitary responses in individual women. *J Clin Endocrinol Metab* 1987: 789–793.
- Skinner DC, Evans NP, Delaleu B, Goodman RL, Bouchard P, Caraty A** (1998). The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10978-10983.
- Skinner DC, Caraty A, Allingham R** (2001). Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* 142:573-579.
- Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE** (1999). Detection of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140: 5195-5201.
- Slayden SM, Moran C, Sams WM Jr, Boots LR, Azziz R** (2001). Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril* 75:889–892.
- Smanik EJ, Young HK, Muldoon TG, Mahesh VB** (1983). Analysis of the effect of progesterone in vivo on estrogen receptor distribution in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 113:15-22.
- Sollenberger MJ, Carlsen EC, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS** (1990a). Specific physiological regulation of LH secretory events throughout the human menstrual cycle: new insights into the pulsatile mode of gonadotropin release. *J Neuroendocrinol* 2:845-852.

- Sollenberger MJ, Carlsen EC, Booth RA Jr, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS** (1990b). Nature of gonadotropin-releasing hormone self-priming of luteinizing hormone secretion during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 163:1529-1534.
- Southworth MB, Matsumoto AM, Gross KM, Soules MR, Bremner WJ** (1991). The importance of signal pattern in the transmission of endocrine information: pituitary gonadotropin response to continuous and pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1286-1289.
- Soma KK, Sinchak K, Lakhter A, Schlinger BA and Micevych PE** (2005). Neurosteroids and female reproduction: estrogen increases 3 $\beta$ -HSD mRNA and activity in rat hypothalamus. *Endocrinology* 146:4386–4390.
- Sopelak VM and Hodgen GD** (1984). Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys: a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertil Steril* 41:108–113.
- Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S and Bremner WJ** (1984). Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 58:378–383.
- Soules MR, Battaglia DE and Klein NA** (1998). Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* 30:193–204.
- Southworth MB, Matsumoto AM, Gross KM, Soules MR, Bremner WJ** (1991). The importance of signal pattern in the transmission of endocrine information: pituitary gonadotropin response to continuous and pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1286-1289.
- Spratt DI, Fiknelstein JS, Butler JP, Badger TM, Crowley WF** (1987). Effects of increasing the frequency of low doses of gonadotropin releasing hormone (GnRH) on gonadotropin secretion in GnRH deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1179-1186.
- Speight A, Fink G** (1981a). Changes in responsiveness of dispersed pituitary cells to luteinizing hormone releasing hormone at different times of the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 89:129-134.
- Speight A, Fink G** (1981b). Comparison of steroid and LH-RH effects on the responsiveness of hemipituitary glands and dispersed pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 24:267-281.
- Steck T, Wernze H, Albert PJ** (1991). Response of gonadotropins to pituitary stimulation with luteinizing hormone releasing hormone is a more specific than sensitive parameter for the polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology* 5: 235-247.
- Stein IF, Leventhal ML** (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29:181–191.
- Stouffer RL, Woodruff TK, Dahl KD, Hess DL, Mather JP and Molskness TA** (1993). Human recombinant activin-A alters pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 77:241–248.
- Stouffer RL, Dahl KD, Hess DL, Woodruff TK, Mather JP and Molskness TA** (1994). Systemic and intraluteal infusion of inhibin A or activin A in rhesus monkeys during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 50:888–895.

- Sullivan K, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ** (1995). GnRH neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res* 685:198-200.
- Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga L and Zeleznik AJ** (1999). Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation *Endocrinology* 84:228–232.
- Taylor AE, Whitney H, Hall JE, Martin K and Crowley WF Jr** (1995). Midcycle levels of sex steroids are sufficient to recreate the follicle-stimulating hormone but not the luteinizing hormone midcycle surge: evidence for the contribution of other ovarian factors to the surge in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1541–1547.
- Taylor AE, Adams JM, Mulder JE, Martin KA, Sluss PM and Crowley WF Jr** (1996). A randomized, controlled trial of estradiol replacement therapy in women with hypergonadotropic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3615–3621.
- Terasawa E, Noonan J and Bridson WE** (1982). Anaesthesia with pentobarbitone blocks the progesterone-induced luteinizing hormone surge in the ovariectomized rhesus monkey. *J Endocrinol* 92:327–339.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group** (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 19:41-47.
- Thornycroft IH, Sribyatta B, Tom WK, Nakamura RM and Mishell DR Jr** (1974). Measurement of serum LH, FSH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17beta levels at 4-hour intervals during the periovulatory phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 39:754–758.
- Tilbrook AJ, De Kretser DM and Clarke IJ** (1993). Human recombinant inhibin A suppresses plasma follicle-stimulating hormone to intact levels but has no effect on luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* 49:779–788.
- Tilbrook AJ, Clarke IJ and de Kretser DM** (1995). Human recombinant follistatin-288 suppresses plasma concentrations of follicle-stimulating hormone but is not a significant regulator of luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* 53:1353–1358.
- Tsai CC and Yen SSC** (1971). The effect of ethinyl estradiol administration during early follicular phase of the cycle on the gonadotropin levels and ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 33:917–923.
- Tsigkou A, Luisi S, De Leo V et al.** (2008). High serum concentration of total inhibin in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* [Epub ahead of print]
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S and Guillemin R** (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8282–8286.
- Urban RJ, Padmanabham V, Beitins I, Veldhuis JD** (1991). Metabolic clearance of human follicle-stimulating hormone assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay, and in vitro Sertoli cell bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 73:818-823.

- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J** (1986). Purification and characterization of a FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321:776-779.
- van der Meer M, Hompes PG, Scheele F, Schoute E, Veersema S and Schoemaker J** (1994). Follicle stimulating hormone (FSH) dynamics of low dose step-up ovulation induction with FSH in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 9:1612–1617.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH and Themmen AP** (2002). Serum anti-mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 17:3065–3071.
- van Santbrink EJ, Hop WC, van Dessel TJ, de Jong FH and Fauser BC** (1995). Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 64:37–43.
- van Santbrink EJ, Hop WC and Fauser BC** (1997). Classification of normogonadotropin infertility: polycystic ovaries diagnosed by ultrasound versus endocrine characteristics of PCOS. *Fertil Steril* 67:452-458.
- Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ** (1994). Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 43:647–654.
- Veldhuis JD, Beitins IZ, Johnson ML, Serabian MA, Dufau ML** (1984). Biologically active luteinizing hormone is secreted in episodic pulsations that vary in relation to stage of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 58:1050-1058.
- Veldhuis JD, Evans WS, Johnson ML, Wills MR, Rogol AD** (1986). Physiological properties of the luteinizing hormone pulse signal: impact of intensive and extended venous sampling paradigms on its characterization in healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 62:881-891.
- Veldhuis JD, Carlson ML, Johnson ML** (1987). The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7686-7690.
- Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM** (1999). A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3666–3672.
- Vicino M, Loverro G, Bettocchi S, Simonetti S, Mei L and Selvaggi L** (2000). Predictive value of serum androstenedione basal levels on the choice of gonadotropin or laparoscopic ovarian electrocautery as ovulation induction in clomiphene citrate-resistant patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 14:42–49.
- Wachs DS, Coffler MS, Malcom PJ, Chang RJ** (2006). Comparison of follicle-stimulating-hormone-stimulated dimeric inhibin and estradiol responses as indicators of granulosa cell function in polycystic ovary syndrome and normal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91:2920-2925.
- Waggoner W, Boots LR, Azziz R** (1999). Total testosterone and DHEAS levels as predictors of androgen-secreting neoplasms: a populational study. *Gynecol Endocrinol* 13:394–400.
- Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M and Crowley WF Jr** (1988). Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic

ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 66:165–172.

**Wallach EE, Root AW and Garcia CR** (1970). Serum gonadotropin responses to estrogen and progesterone in recently castrated human females. *J Clin Endocrinol Metab* 31:376–381.

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

**Waring DW and Turgeon JL** (1992) A pathway for luteinizing hormone releasing hormone self-potential: cross-talk with the progesterone receptor. *Endocrinology* 130:3275–3282.

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

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

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

**Welt CK, Martin KA, Taylor AE, Lambert-Messerlian GM, Crowley WF Jr, Smith JA, Schoenfeld DA and Hall JE** (1997). Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2645–2652.

**Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE and Hall JE** (1999). Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 84:105–111.

**Welt CK, Smith ZA, Pauler DK, Hall JE** (2001). Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:2531-2537.

**Welt CK, Taylor AE, Martin KA, Hall JE** (2002) Serum inhibin B in polycystic ovary syndrome: regulation by insulin and luteinizing hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:5559-5565.

**Welt CK, Pagan YL, Smith PC, Rado KB and Hall JE** (2003). Control of folliclestimulating hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1766–1771.

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

- Welt CK, Taylor AE, Fox J, Messerlian GM, Adams JM and Schneyer AL** (2005b). Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5582–5587.
- Wildt, Hausler A, Marsall G, Hutchinson JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E** (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109:376-385.
- Williams CL, Thalabard J-C, O’Byrne KT, Grosser PM, Nishihara M, Hotchkiss J, Knobil E** (1990). Duration of the phasic electrical activity of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator and dynamics of luteinizing hormone pulses in the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci* 87:8580-8582.
- Wilson RC, Kesner JS, Kaufman JM, Uemura T, Akema T, Knobil E** (1984). Central electrophysiologic correlates of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 39:256-260.
- Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J and Ferin M** (1992). A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131:2812–2820.
- Yen SSC and Tsai CC** (1971a). The effect of ovariectomy on gonadotropin release. *J Clin Invest* 50:1149–1153.
- Yen SSC and Tsai CC** (1971b). The biphasic pattern in the feedback action of ethinyl estradiol on the release of pituitary FSH and LH. *J Clin Endocrinol Metab* 33:882–887.
- Yen SSC and Lein A** (1976). The apparent paradox of the negative and positive feedback control system on gonadotropin secretion. *Am J Obstet Gynecol* 126:942–954.
- Yin P, Kawashima K and Arita J** (2002). Direct actions of estradiol on the anterior pituitary gland are required for hypothalamus-dependent lactotrope proliferation and secretory surges of luteinizing hormone but not of prolactin in female rats. *Neuroendocrinology* 75:392–401.
- Young JR and Jaffe RB** (1976). Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 42:432–442.
- Zawadski JK, Dunaif A** (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, eds. *Polycystic ovary syndrome*. Boston: Blackwell Scientific: 377–384.