



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. Δ. ΛΩΛΗΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΩΟΘΗΚΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ  
ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ**

**ΕΥΘΑΛΙΑ ΤΣΑΧΑΛΙΝΑ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1999**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345887





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής κ. Δ. Λώλης

Ο ρόλος μη στεροειδών ωθηκικών ουσιών στην  
έκκριση των γοναδοτροπινών.

**ΕΥΘΑΛΙΑ ΤΣΑΧΑΛΙΝΑ**  
**ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1999



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Επιβλέπων: Δ. Λώλης**

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Μέλη:**

**Ι. Μεσσήνης**

Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κ. Σεφεριάδης**

Αν. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Λώλης Δ.** Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Μεσσήνης Ι.** Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Σεφεριάδης Κ.** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Αντωνιάδης Γ.** Καθηγητής Μικροβιολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Παρασκευαΐδης Ε.** Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και  
Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων
- Στέφος Θ.** Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και  
Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων
- Γεωργίου Ι.** Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



**Στους Γονείς μου**

**Στους Δασκάλους μου**

“..... if you can dream – and not make dreams your master  
if you can think – and not make thoughts your aim ....  
If you can wait and not be tired by waiting .....”

**R. Kipling**



---

## Περιεχόμενα

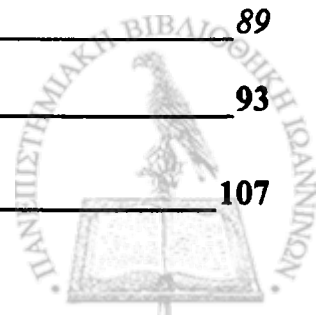
---

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ</b>	<b>3</b>
1.1 Εισαγωγή	3
1.2 ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ-ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ (Πυλαία κυκλοφορία)	4
1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ GnRH	8
1.4 ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ GnRH	10
1.5 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ GnRH-ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΑΥΤΟΕΠΑΓΩΓΗΣ (SELF PRIMING EFFECT)	13
1.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ UP & DOWN REGULATION	15
1.6.1 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΥΛΙΚΗΣ ΚΥΚΛΑΣΗΣ ΟΡΙΣΜΟΣ G-ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ	18
1.6.2 ΟΙ G-ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	19
1.6.3 ΑΠΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ (DESENSITIZATION)	20
1.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ GnRH ΕΚΚΡΙΣΗΣ	21
<i>Η ντοπαμινεργική οδός</i>	21
<i>Η αδρενεργική οδός</i>	22
1.8 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	23
1.9 ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ ΚΑΙ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΡΡΕΙΑ	27
1.10 ΟΙ ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	29
1.10.1 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ-ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	29
1.10.2 ΣΥΝΘΕΣΗ - ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ	31
1.11 ΩΘΗΚΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	33
1.11.1 ΑΡΧΕΓΟΝΟ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟ - ΣΤΑΔΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ	33
1.11.2 ΘΕΩΡΙΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΔΥΟ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ	37





1.11.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ	39
1.12 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΘΜΙΣΗΣ (FEEDBACK MECHANISMS)	42
<b>2. Ο ΡΟΛΟΣ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟ</b>	
<b>ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΥΚΛΟ</b>	<b>47</b>
2.1 INHIBIN - ACTIVIN - FOLLISTATIN	47
2.1.1 INHIBIN	47
2.1.2 ACTIVIN	50
2.1.3 FOLLISTATIN	52
<b>3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΚΥΚΛΙΟΥ</b>	
<b>ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΚΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ (Gonadotrophin surge Attenuating Factor, GnSAF).</b>	<b>55</b>
3.1 Εισαγωγή	55
3.2 IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ GnSAF	56
3.2.1 ΜΕΣΟΚΥΚΛΙΑ ΑΙΧΜΗ ΤΗΣ LH	56
3.2.2 ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ ΣΤΗΝ GnRH	58
3.3 IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ GnSAF	61
<b>4. ΕΙΔΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>65</b>
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	65
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	65
4.3 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ	71
4.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	73
4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
4.5.1 Αποτελέσματα της πρώτης ομάδας	74
4.5.2 Αποτελέσματα της δεύτερης ομάδας	78
Αποτελέσματα δεύτερης υποομάδας	78
Αποτελέσματα δεύτερης υποομάδας	83
4.5.3 Αποτελέσματα της τρίτης ομάδας	85
4.5.4 Αποτελέσματα της τέταρτης ομάδας	89
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>93</b>
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>107</b>



**ΠΕΡΙΛΗΨΗ** 109

**SUMMARY** 113

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** 117

Επισημαίνεται η σημασία της μελέτης της ιστορίας της παιδείας στην Ελλάδα, η οποία αποτελεί σημαντικό μέρος της ιστορίας του έθνους. Η μελέτη αυτή είναι απαραίτητη για να κατανοήσουμε καλύτερα την κοινωνία μας σήμερα. Η παιδεία είναι ο βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη και την πρόοδο ενός έθνους. Η ιστορία της παιδείας στην Ελλάδα είναι γεμάτη από ενδιαφέροντα γεγονότα και προσωπικότητες. Η μελέτη αυτή θα προσφέρει στον αναγνώστη μια ολοκληρωμένη εικόνα της παιδείας στην Ελλάδα από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα.

Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας.

Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας. Η μελέτη αυτή είναι η αποτέλεσμα της έρευνας που έγινε στο Παιδαγωγικό Ινστιτούτο της Αθήνας.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εισαγωγικά, θα ήθελα να αναφέρω, ότι στόχος της παρούσας διατριβής είναι να θέσει κάποιους προβληματισμούς και ερωτήματα, να προκαλέσει αμφισβητήσεις και διάλογο, να συμπληρώσει δειλά αλλά σταθερά, τα πιθανά κενά στη αλληλουχία των πολύπλοκων ενδοκρινολογικών μηχανισμών, έτσι ώστε, να αναπτυχθεί η κρίση, η οξύτητα και η εμπειρία του συγγραφέα αλλά και του αναγνώστη, διαδικασία που θα οδηγήσει στη ουσιαστικότερη και βαθύτερη κατάκτηση της γνώσης.

Από τη θέση αυτή θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητές κ. κ. Δημήτριο Λώλη, Ιωάννη Μεσσήνη και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, για την ανάθεση και επίβλεψη του θέματος αυτής της μελέτης.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή μου κ. Δημήτριο Λώλη Καθηγητή της Γυναικολογίας και Μαιευτικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή του σε όλο το χρονικό διάστημα που διήρκησε αυτή η μελέτη.

Επίσης επιθυμώ να εκφράσω την μεγάλη μου ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Μεσσήνη, Καθηγητή της Γυναικολογίας και Μαιευτικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το αμείωτο ενδιαφέρον, τη συνεχή και πολύτιμη επίβλεψη και συμπαράστασή του στην παρούσα μελέτη.

Θερμά ευχαριστώ τον Καθηγητή της Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ορέστη Τσόλα καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή



Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, τόσο για την καθοδήγησή τους, όσο και για την εξασφάλιση των απαραίτητων μέσων και υλικών για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Από τη θέση αυτή επίσης θέλω να εκφράσω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον βιοχημικό κ. Γεώργιο Κολλιό, του εργαστηρίου της Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την προθυμία με την οποία μου παρείχε κάθε απαιτούμενη βοήθεια.

---

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

---

### 1.1 Εισαγωγή

Η ορμόνη σύμφωνα με το κλασσικό πλέον ορισμό της αποτελεί, χημικά, μία ουσία η οποία προερχόμενη από έναν ιστό, ταξιδεύει μέσω της αιματικής κυκλοφορίας σε μακρινά κύτταρα-στόχους, όπου θα προκαλέσει συγκεκριμένες χαρακτηριστικές επιδράσεις. Αυτό που κάποτε πιστεύαμε σαν ένα απλό ταξίδι, στην ουσία αποτελεί μία *Οδύσσεια*, η οποία περιπλέκεται ακόμη περισσότερο, στα ερευνητικά εργαστήρια διαφόρων σημείων του πλανήτη.

Η απομόνωση των συμπλεγμάτων ορμονών και ορμονοϋποδοχέων στους πρωτογενείς μονοκύτταρους οργανισμούς, ισχυροποίησε την υπόθεση, ότι, τα ενδοκρινή κύτταρα αποτελούν μεταγενέστερο στάδιο της εξέλιξης. Μόνο όταν τα είδη του ζωικού βασιλείου εξελίχθησαν σε πιο πολύπλοκους οργανισμούς, οι ειδικοί αδένες άρχισαν την παραγωγή έκκρισης ορμονών, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν με πιο εκλεπτυσμένους μηχανισμούς.

Έτσι, συνειδητοποιούμε, ότι οι ορμόνες και οι ορμονονευροϋποδοχείς ήταν και είναι μια μορφή επικοινωνίας, η οποία θα εκφρασθεί ως σχέσεις εξάρτησης, δέσμευσης, ρύθμισης, έκκρισης και πρόκλησης, τελικού φαινομένου στόχου. ↵



Υπάρχουν δυο τμήματα του εγκεφάλου που κατέχουν το σημαντικότερο ρόλο στην ρύθμιση και λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, ο υποθάλαμος και η υπόφυση.

## **1.2 ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ-ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΟΣ ΑΞΟΝΑΣ (Πυλαία κυκλοφορία)**

Ο υποθάλαμος αποτελεί μέρος του διεγκεφάλου. Βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου, η οποία σχηματίζει το έδαφος της τρίτης κοιλίας και μέρος των πλαγίων τοιχωμάτων της. Ο υποθάλαμος αποτελείται από νευροκρινή κύτταρα τα οποία έχουν την ιδιότητα να είναι ταυτόχρονα νευρικά και εκκριτικά κύτταρα, δηλαδή, να εκκρίνουν άλλοτε έκλυτικές και άλλοτε κατασταλτικές ορμόνες. Τα κύτταρα αυτά μοιράζονται ταυτόχρονα τα χαρακτηριστικά των νευρώνων και των ενδοκρινικών αδενικών κυττάρων. Απαντούν το ίδιο καλά στα ερεθίσματα που προέρχονται τόσο από διάφορες ορμονικές χημικές ουσίες, οι οποίες μεταφέρονται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, όσο και στους νευρομεταβιβαστές του εγκεφάλου, σε μια διαδικασία η οποία είναι γνωστή ως νευροέκκριση (neurosecretion).

Κατά την παραπάνω διαδικασία, η νευροορμόνη ή νευρομεταβιβαστής παράγεται στα ριβοσωμάτια του κυτταροπλάσματος του νευρώνα, αποθηκεύεται σε κόκκους στο σύστημα Golgi και στην συνέχεια μεταφέρεται με ενεργή μεταφορά στις νευρικές τελικές απολήξεις, διαμέσου του νευράξονα. Από εκεί θα απελευθερωθεί είτε στην αιματική κυκλοφορία, είτε στην νευρική σύναψη.

Ο υποθάλαμος βρίσκεται ανατομικά στη βάση του εγκεφάλου ακριβώς πάνω από τα οπτικά χιάσματα. Επικοινωνεί με την υπόφυση μέσω νευρομεταβιβαστών. Η αγγειακή επικοινωνία της πρόσθιας υπόφυσης, αποτελείται από ένα πλέγμα τριχοειδών αγγείων, το οποίο σχηματίζει ένα πλούσιο δίκτυο γύρω από την μέση προεξοχή του υποθαλάμου. Οι αρτηρίες που το αποτελούν είναι οι άνω υποφυσιακές αρτηρίες, οι οποίες παροχετεύονται στα πυλαία τριχοειδή, που κατέρχονται διαμέσου του μίσχου της υπόφυσης στην πρόσθια υπόφυση. Η διεύθυνση της αιματικής ροής στην πυλαία κυκλοφορία είναι από τον υποθάλαμο προς την υπόφυση. Έτσι, η πρόσθια υπόφυση είναι κάτω από τον έλεγχο του υποθαλάμου, μέσω των νευροορμονών που απελευθερώνονται στην πυλαία κυκλοφορία.

Αξίζει να τονισθεί παράλληλα η ύπαρξη και παλίνδρομη ροή της κυκλοφορίας έτσι ώστε οι ορμόνες της υπόφυσης επιδρούν άμεσα στον υποθάλαμο, δημιουργώντας έτσι τις προϋποθέσεις για την υποφυσιακή παλίνδρομη ρύθμιση στον υποθάλαμο<sup>(1)</sup>.

Η υπόφυση είναι ο σπουδαιότερος από τους ενδοκρινείς αδένες. Είναι ένα μικρό ωοειδές και ερυθρόφαιο σωματίο, το οποίο βρίσκεται στο τουρκικό εφίππιο, καλυπτόμενο από μία οστεοινώδη κάψα. Αποτελείται από δύο λοβούς, τον πρόσθιο και τον οπίσθιο που έχουν διαφορετική καταγωγή, κατασκευή και λειτουργία. Ανάμεσα σ' αυτούς υπάρχει η διάμεση μοίρα της υπόφυσης, η οποία αναπτύσσεται κατά την εμβρυϊκή ζωή, ατροφεί όμως μετά την γέννηση<sup>(2)</sup>.

Εμβρυολογικά ο πρόσθιος λοβός προέρχεται από το εκτόδερμα (θύλακος του Rathke), ενώ ο οπίσθιος λοβός προέρχεται επίσης από το νευροεκτόδερμα αλλά από μία πάχυνση του μέσου εγκεφάλου που αναπτύσσεται προς τα κάτω.

Ο πρόσθιος λοβός ή αδενούπόφυση αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα που διαιρούνται στις ακόλουθες κατηγορίες ανάλογα με την αντίδρασή τους στη χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Στα χρωμόφοβα τα οποία χρωματίζονται ελαφρά και δεν περιέχουν κοκκία και στα χρωμόφιλα που χρωματίζονται έντονα και περιέχουν κοκκία. Τα χρωμόφιλα από τις χρώσεις που λαμβάνουν διαιρούνται σε οξεόφιλα που χρωματίζονται κόκκινα και βασεόφιλα που χρωματίζονται μπλε. Πρόσφατες ανοσοενζυμικές ιστοχημικές τεχνικές χρώσεων, διαιρούν τα χρωμόφιλα κύτταρα, σε κύτταρα τύπου α, τα οποία εκκρίνουν την αυξητική ορμόνη και προλακτίνη, σε κύτταρα τύπου β<sub>1</sub>, τα οποία εκκρίνουν την θυροειδοτρόπο ορμόνη και σε δ κύτταρα που πιθανά εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες (τα οποία επίσης διαφοροποιούνται σε δ<sub>1</sub> και δ<sub>2</sub>)<sup>(3)</sup>.

Όπως αναφέρθηκε η πυλαία κυκλοφορία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα παρακάτω πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν και τονίζουν τη σημασία αυτή. Διατομή του μίσχου της υπόφυσης, συνεπάγεται διακοπή της πυλαίας κυκλοφορίας, η οποία οδηγεί στην απενεργοποίηση και ατροφία των γονάδων, ενώ παράλληλα ελαττώνεται η επινεφριδιακή και θυροειδική λειτουργία σε βασικά επίπεδα<sup>(4)</sup>. Συμπληρωματικά, μεταμόσχευση της υπόφυσης σε έκτοπο κέντρο



(π.χ. κάτω από την νεφρική κάψα) οδηγεί σε έκπτωση της γοναδικής λειτουργίας. Στη συνέχεια επαναμεταμόσχευση σε ανατομικό σημείο κάτω από τη μέση προεξοχή, θα προκαλέσει την αναγέννηση του πυλαίου συστήματος και φυσιολογική υποφυσιική λειτουργία.

Νευροορμονικές ουσίες προερχόμενες από τον υποθάλαμο επιδρούν στην αυξητική ορμόνη, ή Growth Hormone (GH), στην θυρεοειδοτρόπο ορμόνη ή Thyroid Stimulating Hormone (TSH), στην φλοιοπινεφριδοτρόπο ορμόνη ή Adrenocorticotropic Hormone (ACTH), καθώς επίσης και στις γοναδοτροπίνες, την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη ή Follicle Stimulating Hormone (FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη των ωοθηκών ή Luteinizing Hormone (LH). Η νευροορμόνη που ελέγχει την έκκριση των γοναδοτροπινών ονομάζεται γοναδοτροπική εκλυτική ορμόνη ή Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH).

Η νευροορμόνη που ελέγχει την έκκριση της προλακτίνης δεν έχει ακόμη απομονωθεί, ονομάζεται αναστολέας της προλακτίνης ή Prolactin Inhibin Factor (PIF) και πιθανά είναι η ντοπαμίνη.

Η εκλυτική ορμόνη της ACTH είναι ή Corticotrophin Releasing Hormone (CRH), αποτελείται από 41 αμινοξέα (AA), η οποία εκτός από την κυρίως λειτουργία της στην ρύθμιση της ACTH, επιδρά επίσης ευωδοτικά στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Η CRH καταστέλλει την γοναδοτροπική έκκριση μέσω των ενδορφινών, ενώ παράλληλα έχει απομονωθεί σε διάφορους ιστούς εκτός αυτού του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Κ.Ν.Σ.),



όπως στους ιστούς του παγκρέατος, του ήπατος, του γαστρεντερικού σωλήνα (Γ.Σ.), του πλακούντα και των επινεφριδίων.

Η GnRH έχει τόσο αυτοκρινική<sup>1</sup> όσο και παρακρινική<sup>2</sup> λειτουργία. Έχει απομονωθεί τόσο σε νευρικούς όσο και σε μη νευρικούς ιστούς, ενώ υποδοχείς της υπάρχουν σε πολλούς εξωϋποφυσιακούς ιστούς (π.χ. πλακούντας και ωοθυλάκιο). Επίσης είναι γνωστό ότι, η GnRH είναι χημικά ταυτόσημη σε όλα τα θηλαστικά, πράγμα που υποδηλώνει ότι το μόριό της, υπάρχει τα τελευταία 500 εκατομμύρια χρόνια<sup>(5)</sup>. Το γονίδιο που ευθύνεται για τα 92AA της GnRH (που αποτελεί τη πρόδρομη μορφή), εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 8(4).

### **1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ GnRH**

Η ανακάλυψη της δομής και κατ' επέκταση η σύνθεση της υποθαλαμικής GnRH, ενός δεκαπεπτιδίου, από τον Schally<sup>(6)</sup> και τους συνεργάτες του (1971) αποτέλεσε ένα ακρογωνιαίο λίθο στην εξέλιξη της φυσιολογίας της ενδοκρινολογίας και στην κατανόηση της παθολογίας της.

Αποτελεί αναμφισβήτητη κλινική γνώση ότι ο υποθάλαμος και ιδιαίτερα ο τοξοειδής πυρήνας με την μέση προεξοχή, παράγει και εκκρίνει την GnRH, γνωστή επίσης και ως ωχρινοτρόπο εκλυτική ορμόνη (LHRH).

Τα κύτταρα που εκκρίνουν την GnRH προέρχονται από την οσφρητική περιοχή. Με την μετανάστευσή τους κατά την εμβρυογένεση, θα

---

<sup>1</sup> Αυτοκρινική επικοινωνία είναι η ενδοκυτταριακή απελευθέρωση ρυθμιστικών ουσιών, οι οποίες επιδρούν σε υποδοχείς ή σε μέρη του ίδιου του κυττάρου που τις εκκρίνει.

μεταφερθούν κατά μήκος των κρανιακών νεύρων συνδέοντας έτσι, την οσφρητική περιοχή και τον πρόσθιο εγκέφαλο, με την πρωτογενή εντόπισή τους, τον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου<sup>(7)</sup>. Οι GnRH νευρώνες εμφανίζονται στη μέση οσφρητική χώρα (πάχυνση που προέρχεται από το εκτόδερμα από το οποίο αναπτύσσεται το αισθητήριο όργανο), στη συνέχεια εισέρχονται στον εγκέφαλο μέσω του τριδύμου. Μέσω αυτής της κρανιακής συζυγίας προβάλλουν από την περιοχή της ρινός, στο διαφραγματικό προοπτικό πυρήνα του εγκεφάλου<sup>(8)</sup>. Αυτή η εκπληκτική διαδρομή, αιτιολογεί τη συμπτωματολογία στο σύνδρομο Kallman<sup>3</sup>, όπου η απουσία της GnRH παρουσιάζεται με ταυτόχρονη απώλεια της όσφρησης (πλήρους ή μερικής).

Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για το παραπάνω σύνδρομο αφορούν ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του Χ-χρωματοσώματος στη Χρ22.3 περιοχή. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (ομόλογη με την οικογένεια της fibronectin) η οποία είναι υπεύθυνη για την κυτταρική σύμφυση και αναστολή των πρωτεασών, λειτουργίες απαραίτητες για την νευρωνική μετανάστευση<sup>(9,10)</sup>. Ο εντοπισμός αυτού του γονιδίου στο Χ-χρωματόσωμα εξηγεί γιατί 5-7 φορές συναντάται το σύνδρομο Kallman σε άρρενες ασθενείς.

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών (αντισώματα κατά GnRH) έγινε δυνατή η απεικόνιση ινών που κατέρχονται από τον οπίσθιο υποθάλαμο στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης και από τον πρόσθιο υποθάλαμο, στις

<sup>2</sup> Παρακρινική είναι η από κύτταρο σε κύτταρο επικοινωνία. Η έκφρασή της αποτελεί την απλή διάχυση ρυθμιστικών ουσιών από το ένα κύτταρο στο αμέσως γειτονικό του.

<sup>3</sup> Αδυναμία του οσφρητικού άξονα και της μετανάστευσης των GnRH νευρώνων από την οσφρητική χώρα (placode)

πλάγιες περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου. Παρόλα αυτά, αλλοιώσεις που διακόπτουν την πορεία των GnRH νευρώνων, δεν θα επηρεάσουν την έκκριση των γοναδοτροπινών, εκτός εάν οι αλλοιώσεις περιλαμβάνουν την μέση περιοχή. Μόνο αλλοιώσεις του τοξοειδή πυρήνα σε πειράματα σε πιθήκους, οδήγησαν σε ατροφία των γονάδων και αμηνόρροια<sup>(11)</sup>.

Κατ' επέκταση ο τοξοειδής πυρήνας με τη μέση προεξοχή μπορούν να αποτελέσουν εκείνη τη μονάδα, η οποία κατέχει τον κυρίαρχο ρόλο στον υποθάλαμο για την έκκριση της GnRH στην πυλαία κυκλοφορία.

#### **1.4 ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ GnRH**

Ο χρόνος ημιζωής της GnRH είναι μόλις 2-3 λεπτά. Λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της, σε συνδυασμό με την τεράστια αραίωση κατά την είσοδό της στην αιματική κυκλοφορία, οι βιολογικά αποτελεσματικές ποσότητες της GnRH εντοπίζονται έγκαιρα από το πυλαίο σύστημα. Έτσι, ο έλεγχος της αναπαραγωγικής ζωής εξαρτάται άμεσα από την συνεχή απελευθέρωση της GnRH.

Αυτή η λειτουργία όμως εξαρτάται από μια σειρά πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εκκρινόμενων ορμονών, άλλων νευροορμονών, των υποφυσιακών γοναδοτροπινών και των ωθηκικών στεροειδών.

Οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω ουσιών κυβερνώνται από τους μηχανισμούς της παλίνδρομης ρύθμισης, τόσο θετικής (εκλυτικός) όσο και

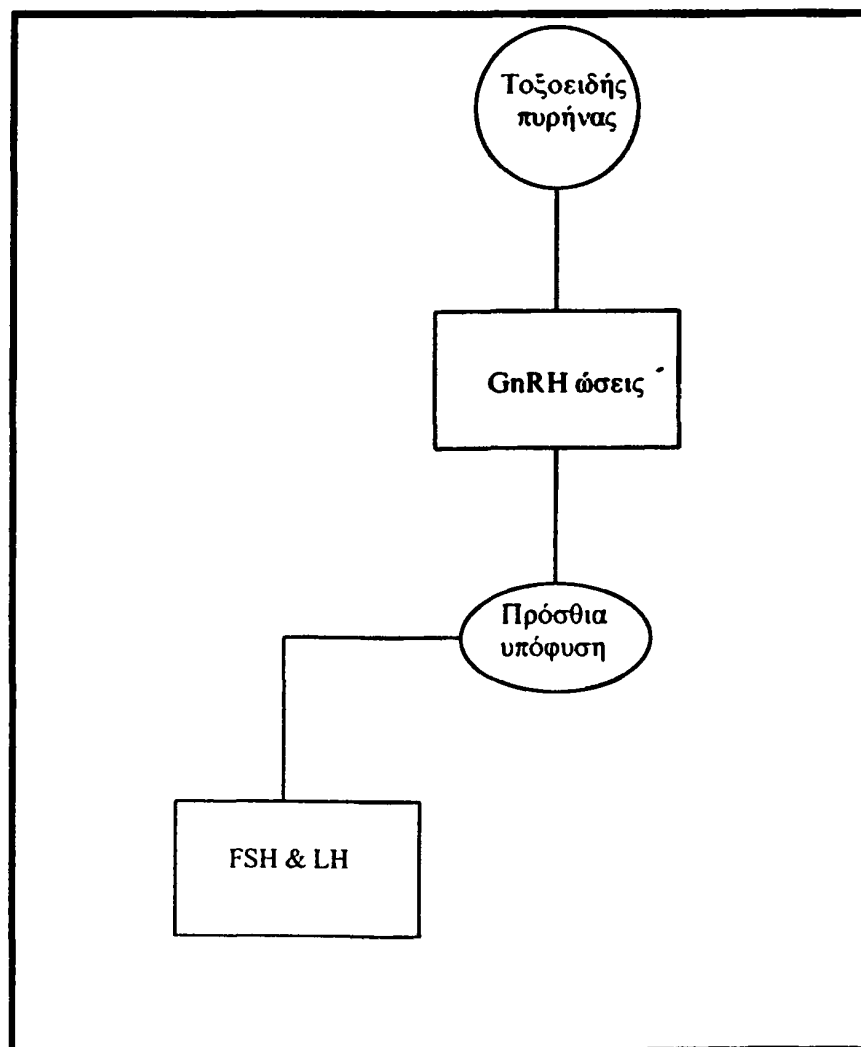
αρνητικής (ανασταλτικός). Η μακρά οδός (*long feedback loop*) αναφέρεται στην παλίνδρομη ρύθμιση των κυκλοφορούντων ορμονών από τους αδένες στόχους και εμφανίζεται τόσο στον υποθάλαμο όσο και στην υπόφυση. Η βραχεία οδός (*short feedback loop*) υποδεικνύει αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση των υποφυσιακών ορμονών στην ίδια τους την έκκριση, πιθανά μέσω των ανασταλτικών επιδράσεων στις εκλυτικές ορμόνες του υποθαλάμου. Η υπερβραχεία οδός (*ultrashort feedback*) αναφέρεται στην αναστολή από τις εκλυτικές ορμόνες στην ίδια τους τη σύνθεση (αυτοαναστολή). Τόσο οι παραπάνω επιδράσεις όσο και οι επιδράσεις από το ανώτερο Κ.Ν.Σ. μπορούν να τροποποιήσουν την έκκριση της GnRH, μέσω των νευρομεταβιβαστών, κυρίως της ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης και ενδορφινών, αλλά επίσης και της σεροτονίνης και της μελατονίνης.

Οι GnRH νευρώνες στερούνται υποδοχέων οιστραδιόλης, έτσι ώστε τείνει να πιστεύεται ότι οι στεροειδικές ορμόνες δρουν μέσω των παραπάνω νευρομεταβιβαστών.

Η πιο σημαντική σύλληψη ήταν η άποψη ότι, ο τοξοειδής πυρήνας είναι το ρυθμιστικό κέντρο, το οποίο απελευθερώνει την GnRH, στην πυλαία κυκλοφορία κατά ώσεις. (βλέπε σχήμα 1).

Σε μια σειρά κλασσικών πειραματικών εργασιών, αποδείχθηκε ότι η φυσιολογική γοναδοτροπική έκκριση απαιτεί την απελευθέρωση κατά ώσεις της GnRH σε συγκεκριμένη συχνότητα και εύρος<sup>(12)</sup>. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η διακύμανση των ώσεων αυτών ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη. Η χορήγηση σε πιθήκους 1μg GnRH ανά λεπτό κάθε ώρα (μία ώση ανά ώρα), παράγει

συγκέντρωση στην πυλαία κυκλοφορία, περίπου ίση με την αιχμή της συγκέντρωσης της GnRH στην ανθρώπινη πυλαία κυκλοφορία, δηλαδή περίπου 2ng/mL. Αύξηση της συχνότητας σε 2 με 5 ώσεις ανά ώρα εξαλείφει τη γοναδοτροπική έκκριση. Μια παρόμοια ελάττωση της γοναδοτροπικής έκκρισης επιτυγχάνεται με την αύξηση της δόσης της GnRH. Ελάττωση στην συχνότητα των ώσεων προκαλεί ελάττωση στην έκκριση της LH, αλλά αυξάνει την έκκριση της FSH.



Σχήμα 1: Μηχανισμός έκκρισης της GnRH και των γοναδοτροπινών.

Όπως η GnRH έτσι και οι γοναδοτροπίνες εκκρίνονται κατά ώσεις. Πράγματι, πιστεύεται ότι η έκκριση κατά ώσεις των γοναδοτροπινών αντανακλά, την έκκριση κατά ώσεις της GnRH<sup>(13)</sup>. Η έκκριση των γοναδοτροπινών εμφανίζεται κατά την εφηβεία συνοδευόμενη από αύξηση της LH κατά την διάρκεια της νύχτας. Στην εφηβεία η δράση του τοξοειδή πυρήνα αρχίζει την έκκριση της GnRH με χαμηλές συχνότητες οι οποίες προοδευτικά αυξάνουν, έως ότου φτάσουν, εκείνη του ενήλικα. Η μέτρηση των ώσεων της LH χρησιμοποιείται ως δείκτης των ώσεων της GnRH (ο παρατεταμένος χρόνος ημιζωής της FSH την αποκλείει). Έτσι, η συχνότητα των ώσεων είναι αυξημένη αλλά το εύρος μικρό κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, συγκρινόμενη με την ωχρινική. Φυσιολογική γοναδοτροπική έκκριση και ωοθηκική λειτουργία και κατ' επέκταση εμμηνορρυσία, προϋποθέτει την διατήρηση της έκκρισης της GnRH κατά ώσεις.

### **1.5 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ GnRH-ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΑΥΤΟΕΠΑΓΩΓΗΣ (SELF PRIMING EFFECT)**

Η GnRH συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στα αδενούποφυσιακά γοναδοτρόπα κύτταρα και προκαλεί την σύνθεση και έκκριση της LH και FSH. Η εκκριτική δράση εμφανίζεται αμέσως και ταυτόχρονα με την απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η GnRH επάγει τους δικούς της υποδοχείς και ότι, ο αριθμός των υποδοχέων στα γοναδοτρόπα κύτταρα, αλλάζει σημαντικά κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες.



Ο αριθμός των GnRH υποδοχέων είναι μέγιστος όταν η γοναδοτροπική απάντηση στην GnRH είναι μέγιστη.

Η σύνδεση της GnRH με τους υποδοχείς της στην υπόφυση, ενεργοποιεί μια αλληλουχία μηχανισμών. Η άμεση απάντηση θα προκαλέσει την έκκριση των γοναδοτροπινών ενώ η μεταγενέστερη θα προετοιμάσει το έδαφος για τον επόμενο κύκλο.

Ένας από τους παραπάνω μηχανισμούς που παίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση και ρύθμιση των γοναδοτροπινών, αποτελεί το **αυτοεπαγωγικό φαινόμενο** της GnRH. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην ακόμα μεγαλύτερη απελευθέρωση της έκκρισης της GnRH κατά ώσεις, μέσω μιας πολύπλοκης σειράς, βιοχημικών και βιοφυσιολογικών ενδοκυττάρων αλλαγών. Το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο, είναι ιδιαίτερα σημαντικό, στην πραγματοποίηση της αιχμής της μεσοκύκλιας έκκρισης των γοναδοτροπινών. Απαιτεί την επίδραση των οιστρογόνων και επαυξάνεται από τη προγεστερόνη. Αυτή η σημαντική δράση της προγεστερόνης, προαπαιτεί οιστρογονική έκθεση για να προκληθεί αύξηση των προγεστερονικών υποδοχέων και η ενεργοποίησή τους μέσω της προκαλούμενης φωσφορυλίωσης.

Σε απουσία του ωοθυλακικού feedback (ωθηκεκτομή), η αύξηση των GnRH υποδοχέων, προκαλείται λόγω της αύξησης της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο. Στο επίπεδο της υπόφυσης τα ωθηκικά στεροειδή ασκούν το αρνητικό τους feedback, όχι όμως διαμέσου της ελάττωσης του αριθμού των υποδοχέων<sup>(14)</sup>.



Συνεχής φόρτιση των GnRH υποδοχέων με συνεχή χορήγηση GnRH έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση στη σύνθεση και έκκριση των γοναδοτροπινών, μέσω ενός φαινομένου γνωστό ως ρύθμιση των υποδοχέων σε χαμηλό επίπεδο (αρνητική ρύθμιση ή *down regulation*) ή μέσω του φαινομένου της απευαισθητοποίησης<sup>(15)</sup>.

Σε αντιδιαστολή με το φαινόμενο του *down regulation* υπάρχει και το φαινόμενο της ρύθμισης των υποδοχέων σε υψηλό επίπεδο (θετική ρύθμιση ή *up regulation*) σύμφωνα με το οποίο η χορήγηση κατά ώσεις της GnRH (χρονικά διαστήματα 90 και 120 λεπτών) αυξάνει την απάντηση της υπόφυσης και το εύρος των ώσεων των γοναδοτροπινών. Τα δύο αυτά φαινόμενα θα περιγραφούν αναλυτικότερα στην επόμενη παράγραφο.

## 1.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ UP & DOWN REGULATION

Η θετική ή αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων από ομόλογες ορμόνες συνθέτει το φαινόμενο του *up και down regulation*. Λίγα γνωρίζουμε για τον μηχανισμό του φαινομένου, όμως ορμόνες όπως η προλακτίνη και η GnRH, μπορούν να αυξήσουν τους υποδοχείς των κυτταρικών τους μεμβρανών.

Θεωρητικά, απενεργοποίηση του συστήματος ορμόνη-υποδοχέας μπορεί να επιτευχθεί με διάσπαση, διαχωρισμό των μερών του συστήματος ή με απώλεια των υποδοχέων από το κύτταρο, είτε μέσω απόπτωσης, είτε μέσω της διαδικασίας της εσωτερικοποίησης (*internalization*). Αυτή η



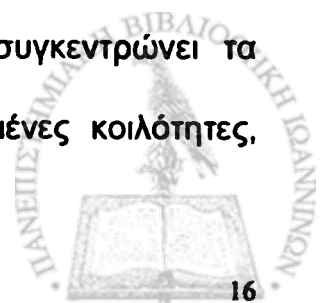
διαδικασία της εσωτερικοποίησης είναι ο κύριος βιολογικός μηχανισμός μέσω του οποίου πολυπεπτιδικές ορμόνες, ρυθμίζουν αρνητικά τους υποδοχείς τους κι έτσι περιορίζουν την ορμονική τους δραστηριότητα.

Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης των τροφικών ορμονών, όπως η LH ή η GnRH, θα ενεργοποιήσει την διαδικασία της εσωτερικοποίησης και θα οδηγήσει σε απώλεια των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και ελάττωση της βιολογικής απάντησης.

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε την πολυπλοκότητα αλλά και την τελειότητα των μηχανισμών ρύθμισης των παραπάνω φαινομένων, θα αναφέρουμε σε συντομία κάποια βασικά σημεία των φαινομένων που τα διέπουν.

Οι υποδοχείς πιστεύεται ότι έχουν τρία σημαντικά μέρη, μια *εξωτερική θέση* σύνδεσης η οποία είναι ειδική για κάθε πολυπεπτιδική ορμόνη, μια *διαμεμβρανική περιοχή* και μια *εσωτερική θέση*, η οποία παίζει κυρίαρχο ρόλο στην διαδικασία της εσωτερικοποίησης.

Όταν ο υποδοχέας συνδέεται με την πολυπεπτιδική ορμόνη, το σύμπλεγμα ορμόνη-υποδοχέα κινείται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης με μια διαδικασία που ονομάζεται πλευρική μετακίνηση (*lateral migration*). Η πλευρική μετακίνηση μεταφέρει το σύμπλεγμα σε μια ειδική περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης, την *επικαλυμμένη κοιλότητα (coated pit)*. Κάθε κύτταρο που βρίσκεται στους ιστούς στόχους, περιέχει από 500 έως 1.500 τέτοιες ειδικές περιοχές. Η πλευρική μετακίνηση έτσι, συγκεντρώνει τα συμπλέγματα ορμονών-υποδοχέων στις ειδικές επικαλυμμένες κοιλότητες,



επιτρέποντας την αύξηση της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων, μέσω ενός μηχανισμού διευκολυνόμενης ενδοκυττώσεως των υποδοχέων. Η οργάνωση των κοιλοτήτων οι οποίες περιέχουν τα συμπλέγματα των ορμονών-υποδοχέων, αποτελεί ένα πολύπλοκο δίκτυο, εξαγωνικών και πενταγωνικών σχηματισμών.

Εκτός της αρνητικής ρύθμισης των πολυπεπτιδικών ορμονικών υποδοχέων, η διαδικασία της εσωτερικοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλα κυτταρικά μεταβολικά φαινόμενα, όπως αυτά της μεταφοράς σημαντικών ουσιών στο κύτταρο, π.χ. του σιδήρου και των βιταμινών.

Οι κυτταρικοί μεμβρανικοί υποδοχείς μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο τάξεις:

Η **1η τάξη (class I) υποδοχείς**: είναι τυχαία διασκορπισμένοι στη μεμβράνη του κυττάρου και μεταφέρουν πληροφορίες που ρυθμίζουν τη συμπεριφορά του κυττάρου. Γι αυτούς τους υποδοχείς η εσωτερικοποίηση είναι μια μορφή του φαινομένου down regulation ή αρνητικής ρύθμισης και επιτελείται στα λυσοσώματα με την διαδικασία της αποδόμησης.

Ορμόνες που χρησιμοποιούν αυτή την κατηγορία των υποδοχέων είναι οι FSH, LH, GnRH, TSH, TRH και η ινσουλίνη. Γι αυτές τις ορμόνες οι επικαλυμμένες κοιλότητες αποτελούν μια παγίδα ακινητοποίησης των συμπλεγμάτων ορμονών-υποδοχέων.

Η **2η τάξη (class II) υποδοχέων**: εντοπίζονται στις επικαλυμμένες κοιλότητες και η δέσμευσή τους οδηγεί στην εσωτερικοποίηση. Έτσι, είτε παρέχουν στο κύτταρο απαραίτητους παράγοντες μέσω της μεταφορά

ουσιών (transendocytosis), είτε συμμετέχουν στην αφαίρεση βλαβερών ουσιών από τα βιολογικά υγρά.

Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας των υποδοχέων συμπεριλαμβάνουν τις λιποπρωτείνες χαμηλής πυκνότητας ή Low Density Lipoproteins (LDL), (οι οποίες παρέχουν την χοληστερόλη στα κύτταρα που παράγουν στεροειδή), την κοβαλαμίνη και την τρανσφερρίνη, (η οποία παρέχει Β12 και σίδηρο αντίστοιχα) και την μεταφορά των ανοσοσφαιρινών διαμέσου του πλακούντα (οι οποίες παρέχουν την εμβρυϊκή ανοσία)<sup>(16)</sup>.

#### **1.6.1 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΥΛΙΚΗΣ ΚΥΚΛΑΣΗΣ ΟΡΙΣΜΟΣ G-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ**

Η βιολογική δραστηριότητα των γλυκοπρωτεϊνών όπως αυτή της FSH και της LH, μπορεί να μεταβληθεί από τα φαινόμενα της αρνητικής και θετικής ρύθμισης όπως προαναφέρθηκε, αλλά επίσης και από την ρύθμιση της δραστηριότητας ενός ενζύμου, που ονομάζεται αδενυλική κυκλάση. Η σύντομη αναφορά στο ένζυμο αυτό στο παρών κεφάλαιο είναι απαραίτητη, για την κατανόηση του φαινομένου της απευαισθητοποίησης που θα αναφερθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

Η αδενυλική κυκλάση αποτελείται από τρεις μονάδες πρωτεϊνών τις οποίες και θα αναφέρουμε. Πρώτο τον υποδοχέα, δεύτερο ένα γουανυλοβουκλεοτίδιο που αποτελεί την ρυθμιστική μονάδα και τέλος μια καταλυτική μονάδα<sup>(17)</sup>.

Για τις διάφορες κατηγορίες των υποδοχέων έχουμε αναφερθεί παραπάνω.

Η ρυθμιστική μονάδα είναι μια συνδεδεμένη πρωτεΐνη, ρυθμιζόμενη από τα γουανινικά νουκλεοτίδια, (ειδικά το γουανοσινο-5-τριφωσφατάσης GTP) και γι' αυτό ονομάζεται GTP πρωτεΐνη ή για χάρη συντομίας **G-πρωτεΐνη<sup>(18)</sup>**.

Η καταλυτική μονάδα είναι ένα ένζυμο το οποίο μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP. Ο υποδοχέας και η νουκλεοτιδική ρυθμιστική μονάδα G-πρωτεΐνη, είναι δομικά συνδεδεμένες αλλά παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση έως ότου, η ορμόνη δεσμευθεί από τον υποδοχέα. Κατά την δέσμευση το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα και νουκλεοτιδικής ρυθμιστικής μονάδας ενεργοποιείται, οδηγώντας έτσι, στην δέσμευση της GTP-πρωτεΐνης.

Οι G-πρωτεΐνες αποτελούνται από μια α, β και γ υποομάδα, κάθε μια προερχόμενη από ξεχωριστό γονίδιο. Οι β και γ υποομάδες είναι παρόμοιες, αλλά η α υποομάδα είναι μοναδική.

### 1.6.2 ΟΙ G-ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι υποδοχείς που ενώνονται με τις G-πρωτεΐνες προέρχονται από μια οικογένεια γονιδίων (supergene family), η οποία αρχικά προήλθε από ένα κοινό αρχέγονο γονίδιο. Αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα στην οποία εναλλάσσονται υδρόφοβα και υδρόφιλα αμινοξέα.

Η ένωσή τους με τις G-πρωτεΐνες, οδηγεί σε δομικές αλλαγές οι οποίες με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν, είτε ένζυμα, είτε ιόντα, απαραίτητα για την



επόμενη φάση ενεργοποίησης του συστήματος ορμόνης-υποδοχέα. Παραδείγματα τέτοιων υποδοχέων είναι οι τροφικές ορμόνες.

### 1.6.3 ΑΠΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ (DESENSITIZATION)

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης του μηχανισμού της αρνητικής ρύθμισης είναι το φαινόμενο της απευαισθητοποίησης ή desensitization όπως αρχικά ονομάστηκε. Η αύξηση των επιπέδων των τροφικών ορμονών, όπως των γοναδοτροπινών, είναι άμεσα συνδεδεμένη με την απευαισθητοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, ανεξάρτητα από το φαινόμενο της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων.

Η απευαισθητοποίηση είναι η ταχεία και αιφνίδια αλλαγή, της απάντησης της αδενυλικής κυκλάσης, χωρίς όμως απώλεια των υποδοχέων της, σε αντιδιαστολή με το βραδύ φαινόμενο της εσωτερικοποίησης, που περιλαμβάνει απώλεια των υποδοχέων.

Οι LH/HCG υποδοχείς, είναι μέλη της οικογένειας των G-πρωτεϊνών και εμφανίζουν το φαινόμενο της απευαισθητοποίησης ως απάντηση στην έκκριση της LH και της HCG.

Συμπερασματικά, η αρνητική ρύθμιση είναι η ελάττωση της απάντησης σε συνεχή εκλυτικά ερεθίσματα και συμπεριλαμβάνει τρεις μηχανισμούς. Την απώλεια υποδοχέων, με τον μηχανισμό της εσωτερικοποίησης, την απευαισθητοποίηση, και τέλος, τον αποχωρισμό της ρυθμιστικής και

καταλυτικής μονάδας από την αδενυλική κυκλάση, μηχανισμός που δεν αναλύθηκε στο παρών κείμενο.

### **1.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ GnRH ΕΚΚΡΙΣΗΣ**

Η φυσιολογική εμμηνορρυσία προϋποθέτει την διατήρηση της GnRH έκκρισης κατά ώσεις, με συγκεκριμένη συχνότητα και εύρος. Αυτή η μορφή έκκρισης διατηρείται μέσω των κατεχολαμινεργικών μηχανισμών και μπορεί να τροποποιηθεί, τόσο από τα ωθητικά στεροειδή, όσο και από μια ποικιλία διαφόρων εγκεφαλικών πεπτιδίων.

#### **Η ντοπαμινεργική οδός**

Τα κύτταρα που συνθέτουν ντοπαμίνη βρίσκονται στον τοξοειδή και στους περικοιλιακούς πυρήνες. Η ντοπαμινεργική οδός ξεκινά από τον βασικό υποθάλαμο και προβάλλει στη μέση προεξοχή.

Η ενδοφλέβια χορήγηση ντοπαμίνης τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες, προκαλεί καταστολή των επιπέδων της προλακτίνης και των γοναδοτροπινών ορμονών στην κυκλοφορία<sup>(19)</sup>. Η ντοπαμίνη δεν έχει άμεση επίδραση στην γοναδοτροπική έκκριση από την πρόσθια υπόφυση, ασκεί όμως επίδραση στην απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο.

Παρ' όλο ότι, η ακριβής χημική σύσταση του ενδογενή αναστολέα της προλακτίνης είναι ακόμη άγνωστη, υπάρχουν ενθαρρυντικές ενδείξεις ότι η

ντοπαμίνη, είναι ο υποθαλάμιος αναστολέας της προλακτίνης. Εκκρίνεται απευθείας στην πυλαία κυκλοφορία όπως και οι νευροορμόνες.

Επομένως η ντοπαμίνη, μπορεί να καταστείλει την GnRH από τον τοξοειδή πυρήνα και επίσης με τη μεταφορά της στη πυλαία κυκλοφορία να καταστείλει απευθείας την υποφυσιακή έκκριση της προλακτίνης.

Τα εργοειδή παράγωγα π.χ. η βρωμοκρυπτίνη, χρησιμοποιήθηκαν στη κλινική πράξη για την θεραπεία της υπερπρολακτιναιμίας. Δρουν μέσω των ντοπαμινεργικών υποδοχέων και αναστέλλουν απευθείας την έκκριση της προλακτίνης με τρόπο παρόμοιο με αυτό της ντοπαμίνης.

Πολλές πειραματικές μελέτες (in vitro) έχουν αποδείξει ότι, η ντοπαμίνη προκαλεί την απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο<sup>(20)</sup>. Αν και αυτό αποτελεί ένα παράδοξο φαινόμενο, υποδεικνύει επίσης ότι, η τελική ρύθμιση της έκκρισης της GnRH αντικατοπτρίζει ένα πολύπλοκο μηχανισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των στεροειδών και των νευρομεταβιβαστών.

### Η αδρενεργική οδός

Τα περισσότερα από τα κύτταρα που εκκρίνουν νορεπινεφρίνη βρίσκονται στο μεσεγκέφαλο και στο κάτω τμήμα του στελέχους του εγκεφάλου. Τα κύτταρα της παραπάνω περιοχής συνθέτουν επίσης και άλλη μια ουσία την σεροτονίνη.

Η πρόσφατη επικρατέστερη αντίληψη είναι ότι, οι κατεχολαμίνες ρυθμίζουν τη έκκριση της GnRH (κατά ώσεις). Η νορεπινεφρίνη θεωρήθηκε ότι ασκεί εκλυτική δράση στην GnRH, ενώ η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη ανασταλτική.



Πρέπει να αναφερθεί ότι για την δράση της σεροτονίνης πολύ λίγα γνωρίζουμε. Ο πιθανότερος τρόπος δράσης των κατεχολαμινών είναι ότι ασκούν επίδραση στη συχνότητα (και ίσως στο εύρος) της έκκρισης της GnRH.

Έτσι, φαρμακολογικοί και ψυχολογικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την υποφυσιακή λειτουργία, πιθανώς μέσω της αλλαγής στη σύνθεση ή στο μεταβολισμό των κατεχολαμινών και κατ' επέκταση στην έκκριση της GnRH.

### **1.8 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ**

Υπάρχουν πολλά πεπτιδία τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως νευρομεταβιβαστές. Παρ' όλο που η σύνθεση και η έκκριση των υποφυσιακών ορμονών βρίσκεται κάτω από την επίδραση κλασικών ορμονικών μεταβιβαστών, σημαντική αλληλεπίδραση υπάρχει μεταξύ των κυττάρων σε τοπικό επίπεδο.

Παραδείγματα εγκεφαλικών πεπτιδίων που δρουν ως νευρομεταβιβαστές αποτελούν τα παρακάτω:

I. Νευροπεπτίδιο Υ: Η έκκριση και η γονιδιακή έκφραση του νευροπεπτιδίου Υ στους υποθαλάμιους νευρώνες ρυθμίζεται από τα ωοθηκικά στεροειδή<sup>(21)</sup>. Το νευροπεπτίδιο Υ ρυθμίζει την κατά ώσεις έκκριση της GnRH και αυξάνει την απάντηση των γοναδοτροπινών στην εκλυόμενη GnRH. Έτσι, διευκολύνει τόσο, την έκκριση της GnRH, όσο και των



γοναδοτροπινών. Σε περιβάλλον απουσίας οιστρογόνων το νευροπεπτίδιο Υ, αναστέλλει την γοναδοτροπική έκκριση. Έρευνες, σε ασθενείς που πάσχουν από ψυχογενή ανορεξία ή βουλημία, έδειξαν ότι το νευροπεπτίδιο Υ αποτελεί ένα συνδετικό κρίκο μεταξύ διατροφής και αναπαραγωγικής λειτουργίας<sup>(22,23)</sup>.

II. Σωματοστατίνη: Αυτό το υποθαλάμιο πεπτίδιο αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, της προλακτίνης και της TSH από την υπόφυση. Είναι ένα τυπικό εντερο-εγκεφαλικό πεπτίδιο, το οποίο εντοπίζεται στους νευρώνες του εγκεφάλου, του στομάχου, του εντέρου και του παγκρέατος. Αναστέλλει την έκκριση του γλυκογόνου, της ινσουλίνης και της γαστρίνης και εντοπίζεται στους αισθητικούς νευρώνες όπου πιθανά αποτελεί έναν από τους νευρομεταβιβαστές του πόνου.

III. Αγγειοτενσίνη II: Πολλοί παράγοντες του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης εντοπίζονται στον εγκέφαλο. Υποδοχείς για την αγγειοτενσίνη II έχουν απομονωθεί σε διάφορα υποφυσιακά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η αγγειοτενσίνη II επηρεάζει τις νορεπινεφριδικές και ντοπαμινεργικές επιδράσεις, τους εκλυτικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκκριση των γοναδοτροπινών και της προλακτίνης στον υποθάλαμο. Φαίνεται έτσι ότι, η συμμετοχής της στην έκκριση των υποφυσιακών ορμονών εντοπίζεται σε εγκεφαλικό επίπεδο.

IV. Νευροτενσίνη: Είναι ένα εγκεφαλικό πεπτίδιο το οποίο προκαλεί αγγειοδιαστολή, προάγει την απελευθέρωση ορμονών από την υπόφυση και ελαττώνει τη θερμοκρασία του σώματος.

V. Αυξητικοί παράγοντες (Growth factors) : Οι πολυ-εντοπιζόμενοι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την παραγωγή και έκκριση των υποφυσιακών ορμονών. Ο messenger RNA, που κωδικοποιεί αρκετούς αυξητικούς παράγοντες, βρέθηκε σε μεγάλες ποσότητες στο Κ.Ν.Σ. καθώς επίσης και στην υπόφυση.

VI. Ενδογενή οπιοειδή: Αποτελούν την πιο ενδιαφέρουσα πεπτιδική οικογένεια. Όλα τα πεπτιδικά οπιοειδή προέρχονται από τρεις πρόδρομες μορφές πεπτιδίων.

- Προοπιομελανικορτίνη (POMC) - πηγή ενδορφινών.
- Προεφκεφαλίνη Α και Β - πηγή αρκετών εγκεφαλινών.
- Προδυνορφίνη - πηγή των δυνορφινών.

Η POMC είναι το πρώτο πρόδρομο πεπτίδιο το οποίο ταυτοποιήθηκε. Παράγεται στον πρόσθιο και ενδιάμεσο λοβό της υπόφυσης (ο οποίος είναι αναπτυγμένος μόνο κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής), στον υποθάλαμο και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου και του Κ.Ν.Σ., καθώς επίσης και από άλλους ιστούς, όπως τον πλακούντα, τις ωθήκες, το γαστρεντερικό σύστημα και τους πνεύμονες. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκεται στην υπόφυση. Η POMC όταν διασπασθεί, θα δώσει την ACTH και την β-lipotrofin. Η β-lipotrofin δεν έχει οπιοειδική δραστηριότητα. Όταν διασπασθεί θα δώσει την β μελανοκυτταρική εκλυτική ορμόνη (MSH), εγκεφαλίνες και α, γ και β ενδορφίνες.

Οι εγκεφαλίνες και οι  $\alpha$  και  $\gamma$ -ενδορφίνες έχουν παρόμοια δραστηριότητα με αυτή της μορφίνης, ενώ η δραστηριότητα των  $\beta$ -ενδορφινών είναι 5-10 φορές ισχυρότερη. Τα παράγωγα που σχηματίζονται στην υπόφυση του ενήλικα είναι οι ACTH, η  $\beta$ -lipotrofin και σε μικρότερο βαθμό οι ενδορφίνες.

Τα βασικότερα παράγωγα που σχηματίζονται στον εγκέφαλο είναι τα οπιοειδή, με μικρότερη την έκκριση της ACTH. Στον υποθάλαμο τα βασικότερα παράγωγα είναι οι  $\beta$ -ενδορφίνες και η  $\alpha$ -MSH στην περιοχή του τοξοειδή πυρήνα.

Οι  $\beta$ -ενδορφίνες θεωρούνται νευρομεταβιβαστές, νευροορμόνες και νευρορυθμιστές. Επηρεάζουν μια ποικιλία υποθαλαμίων λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων της ρύθμισης της αναπαραγωγής, της θερμοκρασίας, της καρδιαγγειακής και αναπνευστικής λειτουργίας. Καθώς επίσης και εξωυποθαλάμιες λειτουργίες όπως αυτή της αντίληψης του πόνου και της ψυχολογικής διάθεσης.

Ο ρυθμός της έκκρισης των οπιοειδών παίζει σημαντικό ρόλο στην περιοδικότητα της εμμηνορρυσίας<sup>(24)</sup>. Παρά το γεγονός ότι η οιστραδιόλη αυξάνει την έκκριση των ενδορφινών, τα υψηλότερα επίπεδα των ενδορφινών εμφανίζονται μετά από χορήγηση οιστραδιόλης ακολουθούμενη από χορήγηση προγεστερόνης (πειράματα σε πιθήκους μετά από ωοθηκεκτομή). Τα ενδογενή οπιοειδή αναστέλλουν την έκκριση των γοναδοτροπινών, διαμέσου της καταστολής της απελευθέρωσης της υποθαλαμικής GnRH. Τα βασικότερα οπιοειδή που επιδρούν στην GnRH είναι οι  $\beta$ -ενδορφίνες και οι

δυνορφίνες, πιθανά μέσω της κατεχολαμινικής οδού, κυρίως της νορεπινεφρίνης<sup>(25)</sup>.

## 1.9 ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ ΚΑΙ ΩΘΟΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ

Πειραματικές μελέτες (χρησιμοποιώντας τρωκτικά για πειραματόζωα) υποδεικνύουν την ύπαρξη κέντρων παλίνδρομης ρύθμισης (feedback) στον υποθάλαμο, τα οποία απαντούν στα στεροειδή με την απελευθέρωση της GnRH. Αυτή η απελευθέρωση είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων αλλά συντονισμένων αλληλεπιδράσεων, μεταξύ των νευροορμονών, των υποφυσιακών γοναδοτροπινών και των ωθητικών στεροειδών, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως μηχανισμοί θετικής και αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης.

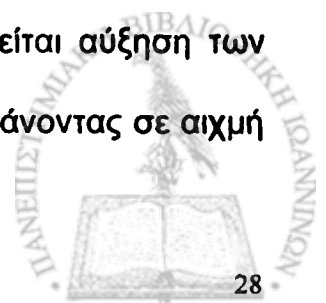
Τα επίπεδα της FSH βρίσκονται κυρίως κάτω από τον έλεγχο της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης της οιστραδιόλης και λιγότερο της θετικής. Ενώ, η LH ρυθμίζεται εξίσου από την αρνητική και από την θετική παλίνδρομη ρύθμιση της οιστραδιόλης (feedback). Τα κέντρα παλίνδρομης ρύθμισης βρίσκονται στον υποθάλαμο και ονομάζονται τονικά και κυκλικά κέντρα. Τα *τονικά κέντρα* ελέγχουν τα ημερήσια βασικά επίπεδα των γοναδοτροπινών και απαντούν στο αρνητικό μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης των στεροειδών. Τα *κυκλικά κέντρα* είναι υπεύθυνα για την μεσοκύκλια αιχμή των γοναδοτροπινών, φαινόμενο που οφείλεται στο μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης των οιστρογόνων. Ειδικότερα, η μεσοκύκλια αιχμή των γοναδοτροπινών, θεωρείται ότι συμβαίνει εξαιτίας της υπερβολικής

έκκρισης της GnRH, που προκλήθηκε ως απάντηση στο μηχανισμό θετικής παλίνδρομης ρύθμισης της οιστραδιόλης.

Στα θηλαστικά το "κέντρο" για τη μεσοκύκλια αιχμή των γοναδοτροπινών μεταφέρθηκε από τον υποθάλαμο στην υπόφυση. Πειράματα σε πιθήκους απέδειξαν ότι η GnRH η οποία εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Η έκκρισή της κατά ώσεις, είναι μια σημαντική προϋπόθεση για την φυσιολογική υποφυσιακή λειτουργία, ενώ οι μηχανισμοί παλίνδρομης ρύθμισης που ρυθμίζουν το επίπεδο των γοναδοτροπινών, ελέγχονται από τα ωθητικά στεροειδή τα οποία επιδρούν με τη σειρά τους στα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης<sup>(26)</sup>.

Η παραπάνω θεωρία προήλθε από πειράματα στα οποία η βασική μέση μοίρα του υποθαλάμου, είτε καταστράφηκε<sup>(27)</sup>, είτε ο υποθάλαμος χειρουργικά αποχωρίστηκε από την υπόφυση<sup>(28)</sup>. Χορήγηση κατά ώσεις της GnRH μέσω ενδοφλέβιας αντλίας, επανέφερε την έκκριση της LH. Η χορήγηση της οιστραδιόλης στη συνέχεια ήταν ικανή να προκαλέσει, τόσο θετικές, όσο και αρνητικές feedback απαντήσεις, φαινόμενα που οφείλονται καθαρά στη πρόσθια υπόφυση, εφόσον όπως αναφέρθηκε ο υποθάλαμος τεχνικά απουσίαζε. Ταυτόχρονα η χορήγηση της GnRH γίνονταν κατά ώσεις, με συγκεκριμένη συχνότητα και εύρος, μιμούμενη έτσι το φυσιολογικό τρόπο έκκρισης.

Σε άλλη πειραματική μελέτη στην οποία η χορήγηση της GnRH γίνονταν εφάπαξ ενδοφλεβίως, παρατηρήθηκε ότι προκαλείται αύξηση των επιπέδων της LH και FSH στο αίμα, στα πρώτα 5 λεπτά, φτάνοντας σε αιχμή



μετά από περίπου 20 έως 25 λεπτά για την LH και 45 λεπτά για την FSH. Όταν σταματούσε η εξωγενής χορήγηση, τα επίπεδα επέστρεφαν στις αρχικές τους τιμές μετά τη πάροδο αρκετών ωρών. Ενώ όταν η χορήγηση εξακολουθούσε με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση, αρχικά σημειώνονταν μια αύξηση, με αιχμή στα πρώτα 30 λεπτά, η οποία όμως ακολουθούνταν από μια πτώση ή ένα plateau στα επίπεδα των τιμών, σε διάστημα περίπου 45 έως 90 λεπτών. Στη συνέχεια ακολουθούσε μια δεύτερη και παρατεταμένη αύξηση περίπου σε 225 με 240 λεπτά.

Αυτή η διφασική απάντηση προτείνει την ύπαρξη δύο λειτουργικών αποθηκών των υποφυσιακών γοναδοτροπινών<sup>(29)</sup>. Η αρχική απάντηση αποτελεί τη πρώτη εκλυόμενη αποθήκη και η καθυστερημένη, την δεύτερη εφεδρική αποθήκη των γοναδοτροπινών.

## **1.10 ΟΙ ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ**

### **1.10.1 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ-ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ**

Οι γλυκοπρωτείνες όπως οι FSH και LH δεν είναι δυο μεμονωμένες πρωτείνες, αλλά είναι μέλη μιας οικογένειας με ετερογενείς μορφές και διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά. Τα ισομερή τα οποία έχουν απομονωθεί παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορετικά μοριακά βάρη (MB), χρόνους ημιζωής και βιολογικές δραστηριότητες. Κατά την διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου υπάρχουν στην αιματική κυκλοφορία τουλάχιστον 20 έως 30 ισομερή, τόσο της FSH όσο και της LH<sup>(30)</sup>. Η συνολική δραστηριότητα

μιας γλυκοπρωτεΐνης λοιπόν, οφείλεται στο αποτέλεσμα της δράσης των διαφορετικών της ισομερών, τα οποία θα συνδεθούν με τα κύτταρα στόχους.

Τα γλυκοπεπτίδια FSH, LH, TSH και HCG αποτελούνται από δυο γλυκοσιλιωμένες πολυπεπτιδικές υποομάδες, τις α και β-υποομάδες, οι οποίες είναι ισχυρά συνδεδεμένες. Η τρισδιάστατη δομή των υποομάδων εξασφαλίζεται από εσωτερικούς δισουλφιδικούς δεσμούς.

Όλες οι γλυκοπρωτεΐνες του ανθρώπινου είδους (FSH, LH, TSH και HCG) μοιράζονται την ίδια α-υποομάδα, η οποία αποτελείται από 92 AA. Οι β-υποομάδες διαφέρουν τόσο στα αμινοξέα όσο και στα υδατανθρακικά μέρη, προσδίδοντας έτσι, την ειδικότητα στη δράση της κάθε μιας από τις γλυκοπρωτεΐνες. Το υδατανθρακικό τμήμα των γλυκοπρωτεϊνών περιλαμβάνει τις φρουκτόζη, γαλακτόζη, μανόζη, γαλακτοζαμίνη, γλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ. Το τελευταίο, σιαλικό οξύ, είναι αυτό που καθορίζει τον χρόνο ημιζωής. Αφαίρεση του σιαλικού οξέος από το μόριο των HCG, FSH και LH οδηγεί στην ελάττωση του χρόνου ημιζωής.

Η μεγαλύτερη β-υποομάδα είναι η β-HCG, η οποία αποτελείται από 145 AA, συμπεριλαμβανομένου του τελικού καρβοξυλικού άκρου που αποτελείται από 24 AA και έχει την μεγαλύτερη υδατανθρακική ρίζα. Ο χρόνος ημιζωής της α- HCG, είναι 6-8 λεπτά, ενώ ολόκληρου του μορίου της HCG που παράγεται από τον πλακούντα περίπου 12 ώρες.

Η FSH αποτελείται από μια α-υποομάδα που έχει 92 AA και μια β-υποομάδα που έχει 110 AA. Έχει 4 υδατανθρακικές αλυσίδες, δύο σε κάθε υποομάδα.



Η β-υποομάδα της LH αποτελείται από 121 ΑΑ, έχει 3 υδατανθρακικές αλυσίδες με μια γλυκοσιλιωμένη πλευρά.

Τα υπεύθυνα γονίδια των τροφικών ορμονών έχουν ταυτοποιηθεί. Το γονίδιο για την α-υποομάδα που μοιράζονται οι FSH, LH, TSH και HCG βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6q21.1-23. Το γονίδιο για την β-υποομάδα της FSH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11. Τα γονίδια της β-υποομάδας των LH, TSH και HCG βρίσκονται στο χρωμόσωμα 19q13.3.

Υπάρχουν 6 γονίδια υπεύθυνα για την β-υποομάδα της HCG και μόνο ένα για την LH. Η αλληλουχία του DNA των γονιδίων της β- HCG και της β- LH είναι ίδια σε ποσοστό 96%.

Το υπεύθυνο γονίδιο για την α-υποομάδα των γοναδοτροπινών εκφράζεται, τόσο στην υπόφυση όσο και στο πλακούντα. Η β-υποομάδα της HCG εκφράζεται στο πλακούντα αλλά όχι στην υπόφυση, ενώ η β-LH-υποομάδα, εκφράζεται στην υπόφυση αλλά όχι στο πλακούντα. Το γονίδιο για την ανθρώπινη β-FSH-υποομάδα έχει ταυτοποιηθεί<sup>(31)</sup>.

### 1.10.2 ΣΥΝΘΕΣΗ - ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

Τόσο η FSH όσο και η LH εκκρίνονται από την ίδια ομάδα κυττάρων, τα γοναδοτρόπα κύτταρα, που βρίσκονται στα πλάγια τοιχώματα της υπόφυσης και απαντούν στην κατά ώσεις έκκριση της GnRH. Η GnRH απελευθερώνεται με μηχανισμό εξαρτώμενο από τα ιόντα ασβεστίου. Οι υποδοχείς της GnRH ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες,

συμπεριλαμβάνοντας την ίδια την GnRH, την activin, την inhibin και τα ωοθηκικά στεροειδή.

Οι μη γλυκοσιλιωμένες πρόδρομες υποομάδες των γλυκοπρωτεϊνών, συνθέτονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), όπου θα γλυκοσιλιωθούν. Οι γλυκοσιλιωμένες υποομάδες ενώνονται και μεταφέρονται στην συσκευή Golgi όπου αποθηκεύονται σε εκκριτικά κοκκία, έως ότου απελευθερωθούν στην αιματική κυκλοφορία, μετά από αλλαγή στη διαβατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, σαν απάντηση στην έκλυση της GnRH.

Η πρωτεϊνική ρίζα του μορίου της γλυκοπρωτεΐνης συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στα κύτταρα στόχους, ενώ η υδατανανθρακική ρίζα, παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του συμπλέγματος ορμόνης - υποδοχέα με το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης.

Πρέπει να αναφερθεί ότι το επίπεδο των οιστρογόνων παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των γοναδοτροπινών. Περιβάλλον χαμηλό σε οιστρογόνα, δηλαδή αιματική κυκλοφορία με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων, θα προκαλέσει τη παραγωγή "μεγάλων" γοναδοτροπινών από την υπόφυση δηλαδή, γοναδοτροπινών με αυξημένο υδατανθρακικό συστατικό, αλλά με βιολογικά χαμηλή δραστηριότητα.

Οι γλυκοπεπτιδικές ορμόνες που βρίσκονται στην υπόφυση, απαντούν σε διαφορετικές χημικές μορφές, οι οποίες περιέχουν και διαφορετικούς υδατάνθρακες. Αφαίρεση των υδατανθράκων από το μόριο της FSH, θα παράγει μια μορφή FSH με ανταγωνιστικές ιδιότητες. Έτσι η υπόφυση μπορεί να εκκρίνει γλυκοπεπτίδια που μπορούν να δράσουν ως αντι-ορμόνες.

## 1.11 ΩΟΘΗΚΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

### 1.11.1 ΑΡΧΕΓΟΝΟ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ - ΣΤΑΔΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Οι γεννητικοί αδένες αποτελούν το πρώτο τμήμα του γεννητικού συστήματος που αναπτύσσεται στο έμβρυο.

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο προέρχεται από το ενδόδερμα του λεκιθικού σάκου. Μέχρι την πέμπτη εβδομάδα έχει μεταναστεύσει στην γεννητική πτυχή, όπου τελικά θα σχηματισθούν οι ωothήκες ή οι όρχεις.

Κατά την 6η με 8η εβδομάδα της κύησης εμφανίζεται ένας ταχύς μιτωτικός πολλαπλασιασμός των γεννητικών κυττάρων και μέχρι την 16η έως 20η εβδομάδα έχει επιτευχθεί ο μέγιστος αριθμός των ωοκυττάρων, συνολικά 6-7 εκατομμύρια και στις δύο ωοθήκες.

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο αποτελείται, από ένα ωοκύτταρο που σταμάτησε το στάδιο ανάπτυξής του, στην φάση της δικτυοταινίας (της πρώτης μειωτικής πρόφασης) και περικλείεται από ατρακτοειδή κοκκώδη κύτταρα. Από τον μέγιστο αριθμό της 16ης - 20ης εβδομάδας, ο αριθμός των ωοθυλακίων θα ελαττωθεί δραματικά, ενώ ο ρυθμός ελάττωσης εξαρτάται από το αρχικό συνολικό τους αριθμό. Η μεγαλύτερη ελάττωση εμφανίζεται πριν την γέννηση (2 εκατομ.), καθώς επίσης και κατά την εφηβεία (300.000). Από αυτή την μεγάλη αποθήκη μόνο 500 θα χρησιμοποιηθούν για την ωοθυλακιορρηξία κατά την αναπαραγωγική ηλικία της γυναίκας<sup>(32)</sup>.

Ο μηχανισμός που καθορίζει ποιο από τα ωοθυλάκια θα ωριμάσει είναι άγνωστος. Ο αριθμός των ωοθυλακίων που αρχίζουν να ωριμάζουν εξαρτάται



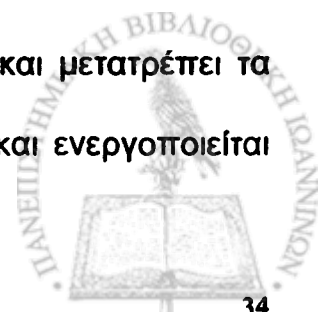
από το μέγεθος της υπολειπόμενης αποθήκης των ανενεργών αρχέγονων ωοθυλακίων<sup>(33)</sup>. Ελάττωση του μεγέθους της αποθήκης π.χ. μονόπλευρη ωοθηκεκτομή, προκαλεί ανακατανομή της διαθεσιμότητας χρονικά.

Το ωοθυλάκιο που προορίζεται για την ωοθυλακιορρηξία, επιλέγεται τις πρώτες μέρες του κύκλου. Τα πρώτα σημάδια της επιλογής διαφαίνονται όταν το ωοκύτταρο αυξάνει σε μέγεθος και τα κοκκώδη κύτταρα αλλάζουν σχήμα και γίνονται κυβοειδή. Αυτή τη χρονική στιγμή, σαν απάντηση στην έκκριση της FSH, αναπτύσσονται ειδικές οδοί επικοινωνίας μέσω συζεύξεων (gap junctions), μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και του ωοκυττάρου. Αυτές οι συζεύξεις λειτουργούν ως δίοδοι διατροφής και μεταβολικών ανταλλαγών.

Με τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων το αρχέγονο ωοκύτταρο μετατρέπεται σε πρωτογενές. Η κοκκώδης στιβάδα αποχωρίζεται από το στρώμα με μια βασική μεμβράνη. Τα κύτταρα του στρώματος θα διαφοροποιηθούν και θα σχηματίσουν την έσω θήκη (κοντά στη βασική μεμβράνη) και την έξω θήκη.

Στη συνέχεια το ωοκύτταρο θα αυξηθεί και θα περικλυσθεί από την διαφανή ζώνη. Στη φάση αυτή το ωοθυλάκιο βρίσκεται λίγο πριν το σχηματισμό του άντρου. Τα κοκκώδη κύτταρα αυτής της φάσης έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και τους τρεις τύπους των στεροειδών. Παρ' όλα, αυτά όμως, παράγονται σαφώς περισσότερα οιστρογόνα απ' ό,τι ανδρογόνα ή προγενεστοειδή.

Ένα ενζυματικό σύστημα αρωματοποίησης επιδρά και μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Η αρωματοποίηση προάγεται και ενεργοποιείται



με την αύξηση των συγκεντρώσεων της FSH. Έτσι η FSH, ευθύνεται τόσο για την έναρξη της στεροειδογένεσης, παραγωγή οιστρογόνων από τα κοκκώδη κύτταρα, όσο και για την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων. Η παραγωγή οιστρογόνων εξαρτάται από τον αριθμό των FSH υποδοχέων. Η χορήγηση FSH θα ελαττώσει τη συγκέντρωση των υποδοχέων στα κοκκώδη κύτταρα (μέσω του μηχανισμού της αρνητικής και θετικής ρύθμισης ή up & down regulation) τόσο in vivo, όσο και in vitro<sup>(34)</sup>. Αυτή η δράση της FSH ρυθμίζεται από τους αυξητικούς παράγοντες (growth factors). Οι FSH υποδοχείς εμφανίζονται στη μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων αμέσως μετά την έναρξη της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και γρήγορα φτάνουν τον αριθμό των 1500 υποδοχέων ανά κύτταρο<sup>(35)</sup>.

Η FSH δρα μέσω του συστήματος των G-πρωτεϊνών, της αδενυλικής κυκλάσης (το οποίο περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο) και συμβάλει στην αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων (down regulation). Αν και η στεροειδογένεση στο ωοθυλάκιο ρυθμίζεται κυρίως από τις γοναδοτροπίνες, υπάρχουν πολλοί άλλοι μηχανισμοί που ευθύνονται για την τελική έκκριση. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι κοινοί και απαντούν σε πολλαπλούς παράγοντες (όχι μόνο των γοναδοτροπινών), συμπεριλαμβανομένων των growth factors, των προσταγλανδινών και των πεπτιδίων, όπως η GnRH, η αγγειοτενσίνη II και το V.I.P.(vasoactive intestinal peptide).

Η ένωση της LH με τους υποδοχείς της στην ωοθήκη, θα προκαλέσει ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης - κυκλικού AMP, στο μηχανισμό των G-πρωτεϊνών. Συνεχής έκθεση των υποδοχέων στις γοναδοτροπίνες έχει σαν αποτέλεσμα στην ελάττωση (down regulation) των υποδοχέων, είτε μέσω



απώλειας τους, είτε μέσω απευαισθητοποίησής τους, φαινόμενα που περιγράφηκαν παραπάνω. Η FSH δρα συνεργικά με τα οιστρογόνα προκαλώντας τόσο το πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων όσο και την αύξηση του αριθμού των FSH υποδοχέων.

Ο ρόλος των ανδρογόνων στην αρχική ωοθυλακική ανάπτυξη είναι πολύπλοκος. Ειδικοί υποδοχείς ανδρογόνων έχουν απομονωθεί στα κοκκώδη κύτταρα<sup>(36)</sup>. Τα ανδρογόνα δεν χρησιμεύουν μόνο ως υπόστρωμα για την αρωματοποίηση η οποία προάγεται από την FSH, αλλά σε μικρές συγκεντρώσεις αυξάνουν την δραστηριότητα της αρωμάτισης (ενζύμου που προάγει την διαδικασία της αρωματοποίησης). Όταν τα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου εκτεθούν σε περιβάλλον πλούσιο σε ανδρογόνα, ευνοείται η μετατροπή των ανδρογόνων αυτών, σε πιο ισχυρά ανδρογόνα (5α-αναχθέντα) απ' ότι σε οιστρογόνα<sup>(37)</sup>. Αυτά τα 5α-αναχθέντα ανδρογόνα όχι μόνο δεν μπορούν να μετατραπούν σε οιστρογόνα αλλά και αναστέλλουν την δράση της αρωμάτισης<sup>(30)</sup>. Επίσης αναστέλλουν την επαγωγική δράση της FSH, στο σχηματισμό των LH υποδοχέων, στάδιο πολύ σημαντικό για την ωοθυλακική ανάπτυξη<sup>(33)</sup>.

Τα ανδρογόνα επάγουν την αρωματοποίησή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις και συμμετέχουν στο σχηματισμό των οιστρογόνων. Ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις επέρχεται κορεσμός της αρωματοποίησης, το ωοθυλάκιο γίνεται ανδρογενετικό και κατ' επέκταση άτρητο<sup>(34)</sup>. Τα ωοθυλάκια που θα αναδυθούν όταν το επίπεδο της FSH είναι αυξημένο και της LH χαμηλό, είναι αυτά που τελικά θα ωριμάσουν. Αυτά τα ωοθυλάκια αναδύονται κατά το τέλος της ωχρινικής φάσης ή κατά την αρχή του επόμενου κύκλου,

ενώ η ανάδυσή τους ευνοείται όταν η αρωματοποιητική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων είναι ισχυρή. *Η επιτυχία ενός ωοθυλακίου (που θα αναδυθεί) να ωριμάσει, θα εξαρτηθεί από την ικανότητά του να μετατρέψει ένα μικροπεριβάλλον πλούσιο σε ανδρογόνα, σε ένα μικροπεριβάλλον πλούσιο σε οιστρογόνα<sup>(38)</sup>.*

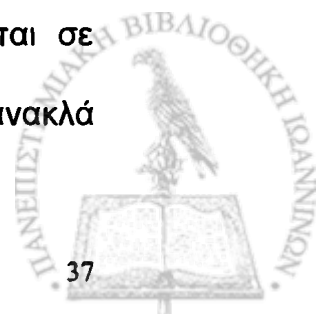
Κάτω από την επίδραση των οιστρογόνων και της FSH, το ωοθυλακικό υγρό το οποίο συγκεντρώνεται στα μεσοκυττάρια διαστήματα των κοκκωδών κυττάρων θα αυξηθεί, σχηματίζοντας έτσι σταδιακά μια κοιλότητα, το άντρο.

Η συγκέντρωση του υγρού εξασφαλίζει ένα ειδικό ενδοκρινικό περιβάλλον τόσο για το ωκύτταρο όσο και για τα κοκκώδη κύτταρα.

Η παρουσία της FSH καθιστά τα οιστρογόνα ως κυρίαρχες ουσίες στο ωοθυλακικό υγρό. Αντίστοιχα σε απουσία της FSH, τα ανδρογόνα κυριαρχούν<sup>(39,40)</sup>. Η LH δεν παρουσιάζεται στο ωοθυλακικό υγρό, παρά μόνο μεσοκύκλια. Εάν η LH αυξηθεί πρόωρα στο πλάσμα και στο υγρό του άντρου, ελαττώνεται η μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων και αποδομικές αλλαγές ξεκινούν, ενώ τα επίπεδα των ανδρογόνων ενδο-ωοθυλακικά αυξάνονται. Έτσι λοιπόν, η κυριαρχία των οιστρογόνων και της FSH είναι απαραίτητη για την παραμονή της δραστηριότητας των κοκκωδών κυττάρων και την ωοθυλακική ανάπτυξη.

### 1.11.2 ΘΕΩΡΙΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ - ΔΥΟ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ

Η παρουσία των στεροειδών στο ωοθυλακικό υγρό κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με αυτά του πλάσματος, γεγονός που αντανάκλα



την λειτουργική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων και των στιβάδων της θήκης. Η σύνθεση των στεροειδών ορμονών είναι λειτουργικά διαμερισματοποιημένη μέσα στο ωοθυλάκιο, στο σύστημα των δύο κυττάρων. Τα δύο διαμερίσματα περιλαμβάνουν τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης αντίστοιχα. Παρ' όλο που και τα δύο διαμερίσματα διατηρούν την ικανότητα να παράγουν προγεστερινοειδή, ανδρογόνα και οιστρογόνα, η δραστηριότητα της αρωματοποίησης των κοκκωδών κυττάρων είναι σαφώς ισχυρότερη από αυτή που έχει παρατηρηθεί στα κύτταρα της θήκης.

Στο ανθρώπινο ωοθυλάκιο υπάρχουν οι υποδοχείς της LH μόνο στα κύτταρα της θήκης, ενώ οι υποδοχείς της FSH μόνο στα κοκκώδη κύτταρα<sup>(41,42)</sup>. Τα κύτταρα της θήκης που αποτελούν την έσω θήκη, έχουν περίπου 20.000 LH υποδοχείς στη κυτταρική τους μεμβράνη. Ως απάντηση στην LH, η θήκη παράγει ανδρογόνα τα οποία αργότερα αρωματοποιούνται, με την επίδραση της FSH, σε οιστρογόνα στα κοκκώδη κύτταρα. Η αλληλεπίδραση των δυο διαμερισμάτων η οποία θα καταλήξει στην αυξημένη παραγωγή των οιστρογόνων, θα εμφανιστεί στη πλήρη μορφή της μόνο μετά τον σχηματισμό του άντρου στο ωοθυλάκιο.

Τα κοκκώδη κύτταρα των μικρών ωοθυλακίων επιδεικνύουν μια ιδιαίτερη δυνατότητα *in vitro*, να μετατρέπουν σημαντικές συγκεντρώσεις ανδρογόνων σε πιο ισχυρά ανδρογόνα (5α - αναχθέντα). Σε αντίθεση, τα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων, μεταβολίζουν απευθείας τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα. Η μετατροπή του ανδρογονικού μικροπεριβάλλοντος σε οιστρογονικό (στάδιο ιδιαίτερης σημασίας στην ωρίμανση του ωοθυλακίου), εξαρτάται από την απάντηση του ωοθυλακίου





στην FSH, από τα επίπεδα της FSH καθώς και από την επίδραση των οιστρογόνων.

Καθώς το ωοθυλάκιο αναπτύσσεται, τα κύτταρα της θήκης αρχίζουν να εκφράζουν εκείνα τα γονίδια που ευθύνονται για την δημιουργία των LH-υποδοχέων, τα P450<sub>scc</sub> και 3β-υδροξυστεροειδική δευδρογενάση<sup>(43)</sup>. Ο ομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-I (Insulin-like growth factor-I), δρα συνεργικά με την LH, αυξάνοντας την γονιδιακή ενζυματική μεταγραφή, αλλά δεν αυξάνει την στεροειδογένεση. Η είσοδος της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια που ρυθμίζεται από την LH είναι απαραίτητη για την στεροειδογένεση. *Κατ' επέκταση η ωοθηκική στεροειδογένεση είναι πάντα εξαρτώμενη από την LH.*

Τα κοκκώδη κύτταρα στερούνται της ύπαρξης των παραπάνω γονιδίων και ιδιαίτερα του υπεύθυνου ενζύμου για τη μετατροπή του 21-ανθρακικού υποστρώματος στο μόριο των ανδρογόνων. Έτσι, η παραγωγή των οιστρογόνων στα κοκκώδη κύτταρα εξαρτάται άμεσα από τα παραγόμενα ανδρογόνα της θήκης.

### 1.11.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

Η μετατροπή του ωοθυλακίου, σε οιστρογονικά κυρίαρχο ωοθυλάκιο, σηματοδοτεί την επιλογή του για αύξηση μέχρι το προωορρηκτικό στάδιο.

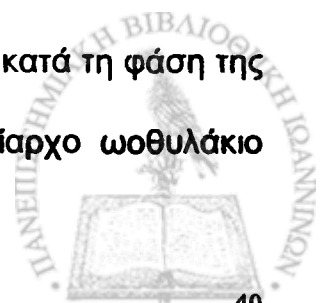
Η διαδικασία της επιλογής είναι σε σημαντικό βαθμό αποτέλεσμα των επιδράσεων των οιστρογόνων σε δυο επίπεδα: 1) η τοπική αλληλεπίδραση μεταξύ οιστρογόνων και FSH μέσα στο ωοθυλάκιο και 2) η επίδραση των οιστρογόνων και πιθανώς της inhibin B στην υποφυσιακή έκκριση της FSH.

Ενώ τα οιστρογόνα ασκούν θετική επίδραση στην δράση της FSH στο ωριμάζον ωοθυλάκιο, παράλληλα στην αρχή του κύκλου ασκούν αρνητική δράση στην έκκριση της FSH σε υποθαλαμο-υποφυσιακό επίπεδο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον τερματισμό της διακυκλικής αύξησης της FSH και την στέρηση της γοναδοτροπικής υποστήριξης στα υπόλοιπα ωοθυλάκια.

Η πτώση της στάθμης της FSH στο αίμα, οδηγεί στην ελάττωση της αρωματοποίησης, ελαττώνοντας παράλληλα τη παραγωγή των οιστρογόνων στα λιγότερο ώριμα ωοθυλάκια. Ταυτόχρονα προκαλείται αναστολή του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων, δημιουργία μικροπεριβάλλοντος πλούσιο σε ανδρογόνα και κατ' επέκταση έναρξη του φαινομένου της ατρησίας. Το πρώτο βήμα στη διαδικασία της ατρησίας είναι η ελάττωση των υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα.

Η απώλεια των ωοκυττάρων με την διαδικασία της ατρησίας αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο ιδιαίτερης σημασίας που συνδυάζει την απόσυρση της γοναδοτροπικής υποστήριξης, την επίδραση τόσο των ωοθηκικών στεροειδών όσο και των μη στεροειδικών ορμονών όπως οι inhibins και οι activins, καθώς και την επίδραση των αυτοκρινικών και παρακρινικών φαινομένων.

Η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση των οιστρογόνων στην FSH, εξυπηρετεί την αναστολή της ανάπτυξης όλων των ωοθυλακίων, εκτός του κυρίαρχου. Το επιλεγμένο ωοθυλάκιο παραμένει εξαρτώμενο από την FSH, αλλά πρέπει να ολοκληρώσει την ανάπτυξή του στο προωορρηκτικό στάδιο, κατά τη φάση της ελάττωσης της FSH στο πλάσμα. Κατ' επέκταση το κυρίαρχο ωοθυλάκιο



πρέπει να διαφύγει των συνεπειών που προέρχονται από την καταστολή της FSH. Αξίζει να αναφερθεί ό,τι το κυρίαρχο ωοθυλάκιο έχει δύο βασικά προτερήματα. Το πρώτο είναι ό,τι έχει μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων για την FSH λόγω του αυξημένου πολλαπλασιασμού των κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας και το δεύτερο ό,τι, η ενδο-ωοθυλακική συγκέντρωση των οιστρογόνων είναι αυξημένη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρατείνει το ερέθισμα για την αρωματοποίηση, ενώ την ίδια στιγμή αρχίζει το φαινόμενο της ατρησίας για τα λιγότερο αναπτυγμένα ωοθυλάκια.

Η αύξηση του αριθμού των κοκκωδών κυττάρων συνοδεύεται από ταυτόχρονη ανάπτυξη των κυττάρων της θήκης. Μέχρι την ένατη ημέρα η αγγείωση στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο είναι διπλάσια απ' ό,τι στα υπόλοιπα ωοθυλάκια<sup>(44)</sup>. Η ωοθήκη τόσο στα ζώα π.χ. στους πιθήκους, όσο και στον άνθρωπο, περιέχει έναν παράγοντα τον επονομαζόμενο αυξητικό παράγοντα των ενδοθηλίων των αγγείων (vascular endothelial growth factor), ο οποίος προάγει την αγγειογένεση. Η έκφρασή του έχει παρατηρηθεί και στα δύο στάδια εξέλιξης του πολλαπλασιασμού των τριχοειδών, τόσο στη φάση του κυρίαρχου ωοθυλακίου όσο και στη φάση του ωχρού σωματίου<sup>(45)</sup>.

Για την μετατροπή του κυρίαρχου ωοθυλακίου επιτυχώς σε ωχρό σωματίο, είναι απαραίτητη η απόκτηση των LH υποδοχέων. Η FSH προάγει την απόκτηση των LH υποδοχέων στα κοκκώδη κύτταρα των μεγάλων ωοθυλακίων. Σε πειράματα σε επίμυες βρέθηκε ότι η LH προάγει την ανάπτυξη των δικών της υποδοχέων, αλλά ταυτόχρονα χρειάζεται την επίδραση της FSH και των οιστρογόνων<sup>(46,47)</sup>. Ο ρόλος των οιστρογόνων

θεωρείται αναγκαίος. Αναστολή της σύνθεσης των οιστρογόνων εμποδίζει την αύξηση των LH υποδοχέων διαμέσου της αναστολής της FSH<sup>(48)</sup>.

### **1.12 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣ ΑΛΛΗΛΟΡΥΘΜΙΣΗΣ (FEEDBACK MECHANISMS)**

Υποθέτουμε ότι το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ελέγχει την ύπαρξή του μέσω των δικών του πεπτιδίων και οιστρογόνων. Αλλάζοντας την γοναδοτροπική έκκριση μέσω παλίνδρομων μηχανισμών αλληλορύθμισης, βελτιώνει το περιβάλλον του σε βάρος των υπολοίπων ωοθυλακίων. Σε προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκε ότι η GnRH παίζει αναγκαίο ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροπινών.

Όμως, ο τρόπος της γοναδοτροπικής έκκρισης που παρατηρείται στον εμμηνορυσιακό κύκλο, είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας του μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης των στεροειδών και άλλων πεπτιδίων, προερχόμενα από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο και δρώντας απ' ευθείας στον υποθάλαμο και στη πρόσθια υπόφυση<sup>(26)</sup>.

Από πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι ο θετικός παλίνδρομος μηχανισμός των οιστρογόνων (feedback), εμπλέκει την αύξηση των GnRH υποδοχέων<sup>(31)</sup>. Η αιχμή της GnRH συνοδεύει την αιχμή της LH, ένδειξη ότι ο θετικός παλίνδρομος μηχανισμός των οιστρογόνων, δρα τόσο στο επίπεδο της υπόφυσης, όσο και στο επίπεδο του υποθαλάμου<sup>(49)</sup>. Το αρνητικό feedback στην υπόφυση επιτελείται μέσω διαφορετικών και αδιευκρίνιστων μηχανισμών. Τα οιστρογόνα ασκούν την ανασταλτική τους δράση στον

υποθάλαμο και στη πρόσθια υπόφυση, ελαττώνοντας έτσι τόσο την κατά ώσεις έκκριση της GnRH, όσο και την απάντηση σ' αυτή<sup>(50)</sup>.

Η προγεστερόνη, όπως και τα οιστρογόνα, επιδρά επίσης σε δυο επίπεδα. Στον υποθάλαμο και κατ' ευθείαν στην υπόφυση<sup>(51)</sup>

Η έκκριση της FSH είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις ανασταλτικές επιδράσεις των οιστρογόνων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση, η έκκριση της LH διαφέρει και εξαρτάται από την συγκέντρωση και την διάρκεια της έκθεσής της στα οιστρογόνα. Σε χαμηλά επίπεδα τα οιστρογόνα, ασκούν αρνητικό feedback στην LH και στην FSH. Σε υψηλά επίπεδα όμως, είναι ικανά να προάγουν θετικό εκλυτικό μηχανισμό στην έκκριση της LH και της FSH.

Η μετάβαση από την ανασταλτική στην εκκριτική αιχμή της LH στην κυκλοφορία, εμφανίζεται καθώς η οιστραδιόλη αυξάνει κατά τη διάρκεια της προωρρηκτικής φάσης. Υπάρχουν δυο σημαντικά σημεία σ' αυτό το μηχανισμό: 1) η συγκέντρωση της οιστραδιόλης και 2) η διάρκεια του χρόνου κατά τον οποίο επιτελέσθηκε η αύξηση της οιστραδιόλης. Στις γυναίκες, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης που είναι ικανή να προκαλέσει θετικό feedback, είναι πάνω από 200pg/ml (730pmol/l) και πρέπει να επιτευχθεί σε διάρκεια περίπου 50 ωρών<sup>(52)</sup>.

Κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου, οι γοναδοτροπίνες εκκρίνονται κατά ώσεις με συγκεκριμένη συχνότητα και εύρος, που διαφέρει στις διάφορες φάσεις του κύκλου. Η κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροπινών, συσχετίζεται άμεσα με την κατά ώσεις έκκριση της GnRH, αλλά το εύρος και η συχνότητα ρυθμίζεται μέσω των στεροειδικών

παλίνδρομων μηχανισμών, τόσο στον υποθάλαμο όσο και στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης<sup>(53,54,55)</sup>.

Η κατά ώσεις έκκριση είναι πιο συχνή αλλά είναι μικρού εύρους κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, σε σύγκριση με την ωχρινική, με μια μικρή αύξηση της συχνότητας κατά την ωοθυλακιορρηξία.

Ο τρόπος έκκρισης της FSH (κατά ώσεις) δεν είναι εύκολα διακριτός λόγω του παρατεταμένου χρόνου ημιζωής της σε σύγκριση με της LH, αλλά πειραματικά δεδομένα δείχνουν ό,τι, η FSH και η LH εκκρίνονται ταυτόχρονα και ότι η GnRH προκαλεί την έκκριση και των δύο. Μόνο 36-48 ώρες πριν από την εμμηνορρυσία, η γοναδοτροπική έκκριση χαρακτηρίζεται από ώσεις χωρίς συγκεκριμένη συχνότητα και χαμηλά επίπεδα FSH τυπικά για το τέλος της ωχρινικής φάσης<sup>(54)</sup>. Κατά τη μετάβαση από τη προηγούμενη ωχρινική στην επόμενη ωοθυλακική φάση, η GnRH και οι γοναδοτροπίνες, απελευθερώνονται από τις ανασταλτικές επιδράσεις των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και της inhibin A. Μια προοδευτική και σχετικά ταχεία αύξηση των ώσεων της GnRH, είναι συνδυασμένη κατά προτίμηση με αύξηση της FSH παρά της LH. Η συχνότητα των ώσεων της GnRH αυξάνει 4.5 φορές κατά τη περίοδο αυτή, συνοδευόμενη από 3.5 φορές αύξηση της FSH και 2 φορές αύξηση της LH<sup>(56)</sup>. Αυτό οδηγεί στην λεγόμενη διακυκλική αύξηση της FSH<sup>(57,58)</sup>, η οποία είναι υπεύθυνη για την επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου.

Η συχνότητα και το εύρος της έκκρισης της GnRH κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης αλλάζει, συσχετιζόμενη με την έκθεσή της στην προγεστερόνη<sup>(53)</sup>. Τόσο η οιστραδιόλη όσο και η προγεστερόνη, είναι



απαραίτητες για να επιτύχουν την ελάττωση και αναστολή στην έκκριση της GnRH κατά την ωχρινική φάση<sup>(59)</sup>. Οι μελέτες αποδεικνύουν ότι, τα στεροειδή επιδρούν στην υποθαλαμική έκκριση και στη υπόφυση, προκαλώντας μεταβολές που αφορούν την συχνότητα και το εύρος των ώσεων της GnRH. Η ανασταλτική δράση των στεροειδών στην ωχρινική φάση εμφανίζεται να οφείλεται στην αύξηση των υποθαλαμικών ενδογενών οπιοειδών. Τόσο η οιστραδιόλη όσο και η προγεστερόνη μπορούν να αυξήσουν τα ενδογενή οπιοειδή και η ταυτόχρονη χορήγηση κλομιφένης (ενός ανταγωνιστή των οιστρογόνων) κατά την ωχρινική φάση αυξάνει την συχνότητα των ώσεων της LH, χωρίς όμως να επιδρά στο εύρος<sup>(60)</sup>.

Τα επίπεδα των ενδορφινών στο πλάσμα αρχίζουν να αυξάνονται δυο μέρες πριν από την αιχμή της LH ενώ οι μέγιστες τιμές τους θα ανιχνευθούν χρονικά κατά την διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας<sup>(61)</sup>. Στη συνέχεια τα επίπεδα σταδιακά θα ελαττωθούν έως ότου φτάσουν το χαμηλότερο επίπεδο, κατά την διάρκεια της εμμηνορρυσίας και την έναρξη της επόμενης αρχικής ωοθυλακικής φάσης. Πειράματα σε πιθήκους μετρώντας τις συγκεντρώσεις των ενδορφινών στην πυλαία κυκλοφορία, δείχνουν ότι οι τιμές είναι μέγιστες κατά την μεσοκύκλια φάση<sup>(62)</sup>. Έτσι προτείνεται ότι για την φυσιολογική κυκλικότητα απαιτούνται περίοδοι υψηλής δραστηριότητας των υποθαλαμικών οπιοειδών κατά την διάρκεια της μεσοκύκλιας και ωχρινικής φάσης, εναλλασσόμενες από περιόδους χαμηλής δραστηριότητας κατά την διάρκεια της εμμηνορρυσίας.

Υπάρχει ένας ημερήσιος ρυθμός στην έκκριση της FSH και της LH<sup>(83)</sup>. Σε αντίθεση, με την νυκτερινή αύξηση της έκκρισης της ACTH, της TSH, της αυξητικής ορμόνης (GH) και της προλακτίνης, η έκκριση της FSH και της LH εμφανίζεται ελαττωμένη κατά τη διάρκεια της νύχτας, πιθανά οφειλόμενη στις αλλαγές των ενδογενών οπιοειδών.



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Ο ΡΟΛΟΣ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟ

### ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΥΚΛΟ

---

#### 2. 1 INHIBIN - ACTIVIN - FOLLISTATIN

Τα κοκκώδη κύτταρα συνθέτουν μια οικογένεια πεπτιδίων (transforming growth factor- $\beta$  superfamily), με δομικές ομοιότητες αλλά διαφορετικές λειτουργίες<sup>(64,65)</sup>, που εκκρίνονται στο ωοθυλακικό υγρό και στο ωοθηκική φλεβώδη κυκλοφορία, ως απάντηση στην FSH<sup>(66,67)</sup>. Η έκφραση αυτών των πεπτιδίων δεν περιορίζεται μόνο στην ωοθήκη, αλλά τα πεπτίδια ανιχνεύονται και σε άλλους ιστούς, παίζοντας τον ρόλο ρυθμιστών των αυτοκρινικών και παρακρινικών φαινομένων. Η inhibin αποτελεί ένα σημαντικό αναστολέα της FSH. Η activin διεγείρει την έκκριση της FSH από την υπόφυση και αυξάνει την δράση της FSH στην ωοθήκη. Η follistatin καταστέλλει την δράση της FSH πιθανά δεσμεύοντας την activin. Οι παραπάνω δράσεις έχουν δειχθεί in vitro αλλά είναι ακόμη άγνωστο κατά πόσο συμβαίνουν και in vivo.

#### 2.1.1 INHIBIN

Αποτελείται από δύο ανόμοια πεπτίδια γνωστά ως  $\alpha$  και  $\beta$  υποομάδες, τα οποία ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς και έχει μοριακό βάρος



περίπου 31-32 kDa. Δύο τύποι της inhibin έχουν ταυτοποιηθεί η inhibin-A και η inhibin-B. Καθεμιά περιέχει την ίδια α υποομάδα αλλά διαφορετική β υποομάδα. Έτσι υπάρχουν τρεις υποομάδες για την inhibin οι: α, β-A και β-B. Κάθε υποομάδα είναι προϊόν διαφορετικού mRNA (messenger Ribonucleic Acid).

Οι δύο τύποι της inhibin οι οποίοι όπως αναφέρθηκε, έχουν ταυτοποιηθεί είναι, η inhibin-A, που αποτελείται από α και β-A υποομάδες και η inhibin-B που αποτελείται από α και β-B υποομάδες.

Η FSH προκαλεί τη έκκριση της inhibin από τα κοκκώδη κύτταρα αλλά δεν είναι γνωστό εάν στην συνέχεια η έκκρισή της καταστέλλεται από την inhibin<sup>(68,69)</sup> με την μορφή παλίνδρομης αλληλορύθμισης. Η έκκριση της inhibin επηρεάζεται επίσης και από αυτοκρινικά / παρακρινικά φαινόμενα. Οι GnRH και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor) ελαττώνουν την απάντηση της FSH στην inhibin. Τα ανασταλτικά φαινόμενα που ασκούν οι GnRH και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας εξηγούνται, λόγω της χαρακτηριστική τους ιδιότητας, να ελαττώνουν τόσο την παραγωγή των οιστρογόνων όσο και τον αριθμό των LH υποδοχέων.

Στην ωοθυλακική φάση του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου και οι δυο ωοθήκες εκκρίνουν παρόμοιες ποσότητες inhibin, ενώ κατά την ωχρινική φάση, το μέγιστο της inhibin εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο<sup>(70)</sup>.

Η inhibin παραμένει αμετάβλητη κατά την ωοθυλακική φάση έως ότου φτάσει στην μεσοκύκλια αιχμή των γοναδοτροπινών<sup>(68,69)</sup> οπότε παρατηρείται αύξηση της inhibin με την μορφή αιχμής. Με την μετάβαση του ωοθυλακίου σε ωχρό σωματίο, η inhibin υπόκειται στον έλεγχο της LH. Τα επίπεδα της



inhibin στην κυκλοφορία πέφτουν μετά την μεσοκύκλια αιχμή, στην συνέχεια σταδιακά αυξάνονται, έως ότου φτάσουν την μεσοωχρινική φάση, όπου είναι διπλάσια από αυτά της μεσοκυκλικής φάσης<sup>(71)</sup>. Μετά την σύλληψη τα επίπεδα της inhibin είναι ακόμη μεγαλύτερα. Τα παραπάνω αφορούν τις μετρήσεις με ανοσοενζυμικές μεθόδους.

Ο Groome<sup>(72)</sup> και οι συνεργάτες του το 1996, μέτρησαν για πρώτη φορά τα επίπεδα της inhibin B κατά την διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου στις γυναίκες, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Οι τιμές των συγκεντρώσεων της inhibin A παρέμειναν χαμηλές (<10 pg/mL) κατά την διάρκεια της αρχικής ωοθυλακικής φάσης για να αυξηθούν μόνο κατά το τέλος της ωοθυλακικής φάσης και να φτάσουν στα επίπεδα της τάξης των 32 pg/mL την ημέρα της αιχμής της LH. Μετά την αιχμή της LH τα επίπεδα πέφτουν για λίγο πριν αυξηθούν σημαντικά και φτάσουν τα μέγιστα κατά την μεσοωχρινική φάση. Οι αλλαγές των συγκεντρώσεων του πλάσματος της inhibin B που παρατηρήθηκαν, είναι τελείως διαφορετικές. Οι τιμές των συγκεντρώσεων της inhibin B είναι υψηλές κατά την αρχική ωοθυλακική φάση, ενώ στην συνέχεια ελαττώνονται κατά το τέλος της ωοθυλακικής φάσης και της ωορρηξίας. Δεν παρατηρήθηκε καμιά αύξηση της inhibin B κατά την μεσοκύκλια αιχμή της LH. Όμως δύο μέρες αργότερα, παρατηρήθηκε μια σύντομη αύξηση της συγκέντρωσης του πλάσματος που ακολουθήθηκε από πτώση κατά την μεσοωχρινική φάση. Οι συγκεντρώσεις του πλάσματος παρέμειναν χαμηλές κατά την υπόλοιπη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου.

Η inhibin έχει εστρικό και πολλαπλή δράση στην έκκριση των γοναδοτροπινών *in vitro*<sup>(73)</sup>. Μπορεί να μπλοκάρει την σύνθεση και την



έκκριση της FSH, να αποτρέψει το φαινόμενο της θετικής ρύθμισης ή up regulation των GnRH υποδοχέων από την GnRH, να ελαττώσει τον αριθμό των υπάρχοντων GnRH υποδοχέων και σε υψηλές συγκεντρώσεις να προάγει την ενδοκυττάρια αποδόμηση των γοναδοτροπινών.

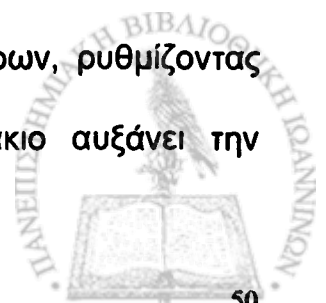
### 2.1.2 ACTIVIN

Η activin είναι ένα πεπτιδίο που συγγενεύει με την inhibin αλλά έχει αντίθετη δράση στην έκκριση της FSH<sup>(74,75)</sup>. Αποτελείται από δυο υποομάδες οι οποίες είναι πανομοιότυπες με τις β υποομάδες της inhibin-A και inhibin-B. Έτσι, όταν μια από τις β υποομάδες της inhibin συνδυάζεται με μια α υποομάδα, το τελικό μόριο που σχηματίζεται όπως αναφέρθηκε θα είναι, είτε inhibin-A, είτε inhibin-B οι οποίες αναστέλλουν την απελευθέρωση της FSH. Εάν οι β υποομάδες ενωθούν μεταξύ τους, το τελικό μόριο που σχηματίζεται είναι η activin η οποία διεγείρει την απελευθέρωση της FSH.

Οι τρεις τύποι της activin είναι οι ακόλουθοι:

- **Activin-A** : β-A & β-A
- **Activin-B** : β-B & β-B -
- **Activin-AB** : β-A & β-B

Η activin είναι παρούσα σε πολλούς τύπους κυττάρων, ρυθμίζοντας την αύξηση και την διαφοροποίησή τους. Στο ωοθυλάκιο αυξάνει την



δέσμευση της FSH από τα κοκκώδη κύτταρα (μέσω της ρύθμισης του αριθμού των υποδοχέων της) ενώ παράλληλα, αυξάνει τον ρυθμό της αρωματοποίησης και την παραγωγή της inhibin, φαινόμενα που σχετίζονται με την αύξηση της συγκέντρωσης της FSH<sup>(76)</sup>.

Ενδείξεις προκύπτουν από μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα, οι οποίες υποδεικνύουν ό,τι, η inhibin και η activin δρουν απευθείας στα κύτταρα της θήκης ρυθμίζοντας την σύνθεση των ανδρογόνων. Η inhibin επαυξάνει την διεγερτική δράση της LH, ενώ η activin την καταστέλλει<sup>(77,78)</sup>. Η inhibin σε αυξημένες δόσεις ξεπερνά την ανασταλτική δράση της activin. Πριν από την ωοθυλακιορρηξία η activin καταστέλλει την παραγωγή της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα και ίσως έτσι προφυλάσσει το ωοθυλάκιο από την πρόωρη ωχρινοποίηση<sup>(79)</sup>.

Η πρόσθια υπόφυση εκκρίνει τις inhibin / activin υποομάδες ενώ η activin-B παράγεται τοπικά και η οποία αυξάνει την έκκριση της FSH. Η activin-A έχει αποδειχθεί ό,τι δρα διεγερτικά στην σύνθεση των GnRH υποδοχέων στα κύτταρα της υπόφυσης<sup>(75)</sup>.

Οι υποομάδες α και β εκφράζονται επίσης και στον πλακούντα, όπου η activin διεγείρει την έκκριση της προγεστερόνης, δράση η οποία μπλοκάρεται από την inhibin. Ο πλακούντας συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση της inhibin κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο Illingworth<sup>(80)</sup> και οι συνεργάτες του το 1995 μέτρησαν τα επίπεδα της inhibin A και B, κατά τα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης και βρήκαν ότι, οι συγκεντρώσεις της inhibin A παρουσιάζουν αιχμή κατά την 8η εβδομάδα περίπου, ακολουθούμενη στη συνέχεια από ελάττωση που σχηματίζει χαρακτηριστικό πλατό κατά την 14η

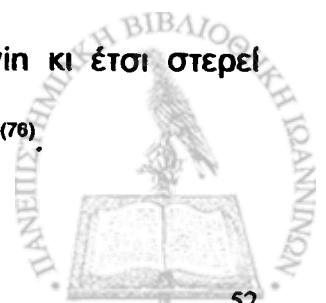
με 25η εβδομάδα περίπου. Σε αντίθεση οι συγκεντρώσεις της inhibin B παρουσιάζονται να είναι πολύ χαμηλές.

Ο Petraglia<sup>(81)</sup> και οι συνεργάτες του το 1997 μέτρησαν τις συγκεντρώσεις της inhibin B σε υγιείς φυσιολογικές γυναίκες καθ' όλη την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Βρήκαν ότι η inhibin B αυξάνεται σημαντικά κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, (περίπου τέσσερις φορές από τα επίπεδα της ωχρινικής φάσης).

Η activin-A έχει επίσης απομονωθεί στο πλακούντα, καθώς και στο πλάσμα, με επίπεδα τα οποία σταδιακά αυξάνουν κατά την διάρκεια της κύησης, ενώ θα ελαττωθούν μετά τον τοκετό<sup>(82,83,84)</sup>. Η activin-B δεν είναι παρούσα στο πλάσμα αλλά βρίσκεται στο αμνιακό υγρό και στον ομφάλιο λώρο, ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι προέρχεται είτε από το έμβρυο, είτε από τις εμβρυϊκές μεμβράνες, παρά από τον πλακούντα<sup>(85)</sup>.

### 2.1.3 FOLLISTATIN

Η follistatin αποτελείται από μια αλυσίδα, γλυκοσυλιωμένου πολυπεπτιδίου που αρχικά απομονώθηκε από τα προωρρηκτικά ωθυλάκια αλλά παράγεται και από την υπόφυση. Διαφέρει δομικά από τις inhibin / activin, ενώ δείχνει να είναι ομόλογη με τον epidermal growth factor. In vitro εμφανίζει κατασταλτική δράση στην έκκριση της FSH όπως και η inhibin. Διαφοροποιεί την δράση της FSH, δεσμεύοντας την activin κι έτσι στερεί αυτόν τον αυξητικό παράγοντα από την κυτταρική διαδικασία<sup>(76)</sup>.



Παρουσιάζεται να δρα τοπικά στο ωοθυλάκιο και στην υπόφυση, όπως και οι inhibin και activin. Τα επίπεδά της στο πλάσμα δεν μεταβάλλονται σημαντικά στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου<sup>(86)</sup>. Εάν η υποφυσιακή έκκριση της FSH in vivo ρυθμίζεται σημαντικά από τις ισορροπίες της inhibin και activin με την follistatin δεν έχει διευκρινιστεί. Η follistatin παίζει το ρόλο κυρίως δεσμευτικής πρωτεΐνης των inhibins και activins στην ωοθήκη, όπου έτσι ρυθμίζει τις παρακρινικές και αυτοκρινικές δράσεις των ουσιών αυτών, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη του ωοθυλακίου<sup>(87)</sup>.

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΚΥΚΛΙΟΥ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΚΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ (Gonadotrophin surge Attenuating Factor, GnSAF).

---

#### 3.1 Εισαγωγή

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός παράγοντα που αναστέλλει το μεσοκύκλιο γοναδοτροφικό κύμα σε πειραματόζωα, εμφανίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '80. Έτσι παρατηρήθηκε σε πιθήκους ό,τι, κατά την χορήγηση FSH ή ανθρώπινης human menopausal gonadotrophin (hMG) για την πρόκληση πολυωοθυλακιορρηξίας, τα ζώα αυτά αποτύγχαναν να παρουσιάσουν το κύμα αιχμής της LH, παρόλο που τα επίπεδα των οιστρογόνων διατηρούνταν σε τιμές φυσιολογικές ή αυξημένες<sup>(88,89)</sup>.

Παρόμοιες παρατηρήσεις επαναλήφθηκαν και σε γυναίκες όταν χορηγήθηκε είτε μόνο hMG<sup>(90)</sup>, είτε μόνο FSH<sup>(91)</sup>. Εντούτοις, οι Messinis και συν.<sup>(91)</sup> παρατήρησαν, ότι η διαδοχική χορήγηση σε φυσιολογικές γυναίκες ανταγωνιστών των οιστρογόνων, όπως η κλομιφένη και η κατά ώσεις hMG ή FSH, δεν αναστείλει την αιχμή της LH, αλλά προκαλούσε μια σημαντική άμβλυνσή της, σε σχέση με τους φυσιολογικούς κύκλους.

Έτσι, η θεωρία ό,τι οι πολυωορρηκτικές ωθήκες παράγουν μια ουσία η οποία μπορεί να επιδρά μέσω παλίνδρομου μηχανισμού στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα και να προκαλεί άμβλυνση ή πλήρη αναστολή του





προωορρηκτικού κύματος της LH, άρχισε να οικοδομείται. Από τις μελέτες στους πιθήκους, ο Hodgen και οι συνεργάτες του υιοθέτησαν τον όρο Gonadotrophin surge Inhibiting Factor (GnSIF), για να ονομάσουν τον άγνωστο παράγοντα και να καταδείξουν την πλήρη αναστολή του γοναδοτροπικού κύματος, ενώ ο Messinis και οι συνεργάτες του από τις μελέτες τους σε γυναίκες, υιοθέτησαν τον όρο Gonadotrophin surge Attenuating Factor (GnSAF), για να περιγράψουν τον παράγοντα που προκαλεί άμβλυνση του γοναδοτροπικού κύματος, χωρίς να είναι ακόμη γνωστό εάν GnSAF και GnSIF είναι ένας και μόνο παράγοντας. Στοιχεία που παρέχονται από in vivo και in vitro μελέτες για την ύπαρξη του GnSAF παραθέτονται στις σελίδες που ακολουθούν.

### **3.2 IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ GnSAF**

#### **3.2.1 ΜΕΣΟΚΥΚΛΙΑ ΑΙΧΜΗ ΤΗΣ LH**

Οι πρώτες ενδείξεις ό,τι ένας μη στεροειδικός παράγοντας εμπλέκεται στον έλεγχο της μεσοκύκλιας γοναδοτροπικής έκκρισης, οφείλονταν σε πειράματα που έγιναν σε πιθήκους, όπου για την επαγωγή ωορρηξίας χρησιμοποιήθηκε hMG ή FSH. Κατά την διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε αναστολή του θετικού feedback της οιστραδιόλης και ταυτόχρονα αναστολή της ενδογενούς αιχμής της LH<sup>(92,88)</sup>.

Η ίδια αναστολή της αιχμής της LH, παρατηρήθηκε και σε μελέτες σε γυναίκες, όπου κατά την χορήγηση hMG σε προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης (I.V.F.)<sup>(90)</sup>, αναπαρήχθησαν τα ίδια αποτελέσματα. Άλλες

μελέτες έδειξαν ό,τι, η αιχμή της LH υπάρχει, αλλά εξαρτάται από το σχήμα που χορηγείται για την πρόκληση της ωθηλακιωρίμανσης και ωθυλακιωρρηξίας. Η ενδογενής αιχμή της LH παρατηρείται σε κύκλους όταν χρησιμοποιείται κλομιφένη ως μέθοδος για την πρόκληση της πολυωθυλακιωρρηξίας, ενώ όταν χρησιμοποιούνται μόνο γοναδοτροπίνες, το κύμα της LH παρατηρείται μόνο σε μερικές γυναίκες<sup>(93,91)</sup>.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι η κλομιφένη διευκολύνει την αιχμής της LH στις πολυωρρηκτικές γυναίκες, αναστέλλοντας τόσο το αρνητικό όσο και το θετικό feedback της οιστραδιόλης στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα, για συγκεκριμένη χρονική περίοδο<sup>(94)</sup> πριν την αιχμή και αποτρέποντας έτσι την πρόωρη εμφάνισή της. Με τον τρόπο αυτό η κλομιφένη προκαλεί την εκδήλωση της αιχμής της LH, την απαραίτητη χρονική στιγμή σε σχέση με το μέγεθος του προωρρηκτικού ωθυλακίου. Στις γυναίκες που χρησιμοποιούνται μόνο γοναδοτροπίνες, η ενδογενής αιχμή της LH μπορεί να είναι πρόωρη, σε σχέση με το μέγεθος του ωθυλακίου<sup>(91,95)</sup>.

Ένας ακόμη παράγοντας ιδιαίτερα σημαντικός ο οποίος ρυθμίζει την ενδογενή αιχμή της LH στις γυναίκες που χρησιμοποιήθηκε FSH για την πρόκληση ωθηλακιωρρηξίας είναι ο αριθμός των μικρών (12-15mm), αναπτυσσόμενων ωθυλακίων στις ωθήκες. Όσο περισσότερα ωθυλάκια αναπτύσσονται τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα, η αιχμή της LH να ανασταλεί ή να μετατοπιστεί. Η αιχμή της LH θα είναι πρόωρη κατά την παρουσία μερικών ή λίγων μόνο ωθυλακίων στις ωθήκες<sup>(91,96)</sup>.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πρώτον ό,τι, η εμφάνιση της αιχμής της LH σε γυναίκες που χρησιμοποιήθηκε FSH για την πρόκληση

πολυωοθυλακιορρηξίας, είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της οιστραδιόλης και απροσδιόριστων ωοθηκικών παραγόντων, οι οποίοι εκκρίνονται από τα μικρά πολυάριθμα ωοθυλάκια.

Δεύτερον ότι στις γυναίκες εκείνες που η αιχμή της LH τελικά εμφανίζεται, είναι αμβλυμμένη τόσο σε εύρος όσο και σε διάρκεια, ανεξάρτητα από το σχήμα που χορηγήθηκε<sup>(93,91)</sup>.

Αρνητικές σχέσεις βρέθηκαν μεταξύ του εύρους της αιχμής της LH και του ολικού όγκου του ωοθυλακικού υγρού, που αναρροφήθηκε κατά την διάρκεια λαπαροσκόπησης σε γυναίκες μετά από πρόκληση πολυωοθυλακιορρηξίας. Από τις μελέτες αυτές προτείνεται ότι ο υποτιθέμενος παράγοντας που ευθύνεται για την άμβλυνση της αιχμής της LH, εκκρίνεται από τις ωοθήκες, όταν αυτές βρίσκονται σε συνθήκες υπερλειτουργίας δηλαδή πολυωορρηξίας<sup>(97)</sup>. Σε άλλες πειραματικές μελέτες σε γυναίκες, κατά την διάρκεια φυσιολογικών εμμηνορυσιακών κύκλων, στις οποίες προκλήθηκαν συνθήκες υπεροιστρογοναιμίας χορηγώντας εξωγενώς οιστραδιόλη, δεν παρατηρήθηκε άμβλυνση της μεσοκύκλιας αιχμής της LH<sup>(98)</sup>. Αυτό δείχνει ότι ο GnSAF είναι μη στεροειδής ωοθηκική ουσία. Όσο αναφορά την προγεστερόνη, παρατηρήθηκε ότι, οι υψηλές συγκεντρώσεις της προγεστερόνης μπορούν να ελαττώσουν την διάρκεια της αιχμής της LH σε γυναίκες κατά την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης<sup>(99)</sup>.

### 3.2.2 ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ ΣΤΗΝ GnRH

Κατά την διάρκεια πειραματικών μελετών (in vivo) σε ζώα και σε ανθρώπους, παρατηρήθηκε ότι σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν στην έκκριση



των γοναδοτροπινών, όταν χορηγείται εξωγενώς GnRH για τη διέγερση της υπόφυσης.

Στους επίμυες η χορήγηση FSH οδήγησε σε μια αμβλυμμένη απάντηση της LH στην GnRH<sup>(100)</sup>. Κατά τη χορήγηση FSH ή hMG σε πιθήκους παρατηρήθηκε, κατάργηση της απάντησης της LH και της FSH στην GnRH<sup>(88)</sup>. Η υπόθεση που προτάθηκε από τον Hodgen και τους συνεργάτες του ήταν ό,τι ο GnSIF, δρα πιθανώς μέσω αναστολής της γοναδοτροπικής απάντησης στην GnRH<sup>(101)</sup>.

Στις γυναίκες η πρόκληση πολυωοθυλακιορρηξίας με κλομιφένη ή FSH, προκαλεί μια σημαντική άμβλυνση της γοναδοτροπικής απάντησης στις χορηγούμενες δόσεις της GnRH και αυτό θεωρήθηκε σαν πιθανός μηχανισμός δράσης του GnSAF στην μεσοκύκλια εκκριτική αιχμή της LH<sup>(102)</sup>. Συγκρίνοντας τους κύκλους των γυναικών αυτών με τους φυσιολογικούς κύκλους, όπου η έλλειψη οιστρογονικής επίδρασης κατά την χορήγηση της κλομιφένης και οι αμετάβλητες συγκεντρώσεις στα επίπεδα της τεστοστερόνης και προγεστερόνης στις πολυωορρηκτικές γυναίκες, παρέχουν περισσότερες ενδείξεις ότι ο παράγοντας αυτός (GnSAF), είναι μια ουσία μη στεροειδικής φύσης<sup>(102)</sup>.

Δεν είναι σίγουρο, εάν ο GnSAF και ο GnSIF αποτελούν ταυτόσημους παράγοντες. Φυσικά υπάρχουν διαφορές, που οφείλονται στη διαφορετικότητα του είδους των ζώων που χρησιμοποιούνται στις πειραματικές μελέτες. Αλλά ακόμη και εάν θεωρηθεί ό,τι, οι δυο αυτοί παράγοντες είναι παρόμοιοι, αξίζει να αναρωτηθεί κανείς εάν η δράση τους

ασκείται στην εμφάνιση της μεσοκύκλιας αιχμής της LH ή στον έλεγχο του εύρους της αιχμής.

Προκαταρκτικές μελέτες στις γυναίκες ερεύνησαν την βιοδραστικότητα του GnSAF (in vivo) και τον πιθανό μηχανισμό δράσης του στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα. Χρησιμοποιώντας την απάντηση της υπόφυσης στην GnRH ως μέσο εκτίμησης της δραστηριότητας του GnSAF, στις in vivo μελέτες παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητά του υπάρχει σε όλη τη διάρκεια, της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου κατά την πρόκληση πολυωοθυλακιορρηξίας. Προτείνεται έτσι, ό,τι ο GnSAF παράγεται τουλάχιστον από μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια<sup>(103)</sup>.

Η πιθανότητα, ότι στις γυναίκες η ελαττωμένη απάντηση της υπόφυσης στην GnRH σχετίζεται με την ελάττωση στην έκκριση της GnRH αυτής καθαυτής δεν φαίνεται να ισχύει, όπως προκύπτει από μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε, η GnRH εξωγενώς (κατά ώσεις), σε συνδυασμό με την FSH<sup>(104)</sup>. Παρατηρήθηκε επίσης, στην ίδια μελέτη ότι κατά την χορήγηση συνδυασμένης θεραπείας, προκαλείται μεγαλύτερη ανάπτυξη ωοθυλακίων και μεγαλύτερος βαθμός αμβλύνσεως της αιχμής της LH. Προτάθηκε έτσι, ότι ο GnSAF ασκεί τη δράση του τουλάχιστον σε υποφυσιακό επίπεδο και ό,τι η δραστηριότητά του αυξάνεται ανάλογα με τον βαθμό υπερλειτουργίας των ωοθηκών.

Η επίδραση του GnSAF ασκείται και στις δυο αποθήκες της LH και στο αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH. Δεδομένα έδειξαν, ό,τι ο GnSAF αμβλύνει την αρχική έκκριση της LH η οποία εκκρίνεται ως απάντηση στην GnRH και την αυτοεπαγωγική επίδραση της GnRH στην ίδια την υπόφυση<sup>(105)</sup>.

### 3.3 IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ GnSAF

Πολλές μελέτες που αφορούσαν στην έκκριση των γοναδοτροπινών από υποφυσιακά κύτταρα (in vitro), παρουσία ελεύθερου στεροειδών ωοθυλακικού υγρού, πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα είδη ζώων. Οι μελέτες αυτές κατέληξαν σε αντιφατικά συμπεράσματα<sup>(106,107,108)</sup>. Αυτό υπογραμμίζει την σημασία των διαφορετικών χαρακτηριστικών στα διάφορα είδη ζώων, παρόλο ότι οι διαφορετικές πειραματικές συνθήκες έπαιξαν επίσης σημαντικό ρόλο.

Σε μια από αυτές τις έρευνες χρησιμοποιήθηκε ωοθυλακικό υγρό χοίρου. Το υγρό αυτό επέδρασε σε καλλιεργημένα κύτταρα υπόφυσης επίμυος, όπου παρατηρήθηκε η ελάττωση της εκκρινόμενης LH ως απάντηση στην GnRH<sup>(108)</sup>. Ο μη στεροειδικός παράγοντας στο χοίρειο ωοθυλακικό υγρό, που προκάλεσε αναστολή της γοναδοτροπικής έκκρισης, θεωρήθηκε ότι ήταν ο GnSIF παράγοντας που αρχικά η ύπαρξή του προτάθηκε στους πιθήκους.

Σε άλλη μελέτη in vitro χρησιμοποιήθηκαν υποφυσιακά κύτταρα προβάτου, σε καλλιέργεια που αναπτύχθηκε για την μέτρηση της inhibin<sup>(109)</sup>, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η βιοδραστικότητα του GnSAF στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό<sup>(110)</sup>. Βρέθηκε ότι το ελεύθερο στεροειδών ωοθυλακικό υγρό, ήταν ικανό να αναστείλει τη βασική έκκριση της FSH αλλά όχι της LH. Στη συνέχεια μετά από επίδραση της GnRH στο ωοθυλακικό υγρό, παρατηρήθηκε ότι προκλήθηκε ελάττωση στην έκκριση της LH και της FSH.

Αρχικά θεωρήθηκε η inhibin υπεύθυνη για τις επιδράσεις στην έκκριση της FSH, αλλά αδυνατούσε να εξηγήσει τις επιδράσεις στην LH. Παρ' όλα αυτά κάποιου βαθμού καταστολή της LH, μετά από επίδραση της GnRH σε



κύτταρα επίμυος, αναφέρθηκε μετά από επώαση αρκετών ημερών με καθαρή inhibin βοός<sup>(111)</sup>. Στη συνέχεια, οι Busbridge<sup>(112)</sup> και συν., (1990) απέδειξαν ό,τι, η καθαρή inhibin προερχόμενη από τα βοοειδή, δεν επηρεάζει την έκκριση της LH, αλλά προκαλεί ελάττωση στην βασική έκκριση της FSH και ως απάντηση στην GnRH.

Ο Fowler<sup>(113)</sup> και συν., (1990) μετά από αφαίρεση από το ωοθυλακικό υγρό γυναικών της inhibin με στήλη ηπαρίνης / sepharose<sup>(108)</sup>, απέδειξαν ό,τι, το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό ήταν ικανό να αμβλύνει την έκκριση της LH και της FSH, μετά από επίδραση της GnRH, χωρίς όμως να επιδρά στη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο GnSAF υπάρχει στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό και είναι μια ουσία διαφορετική από την inhibin.

Σε άλλη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, το 1990, αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα του GnSAF στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, είναι μεγαλύτερη στα μικρά ωοθυλάκια των υπερωορρηκτικών γυναικών, συγκρινόμενα με τα μεγάλα<sup>(113)</sup>. Δεν είναι όμως ξεκάθαρο εάν η μεγαλύτερη δραστηριότητα οφείλεται στην ταχεία παραγωγή του GnSAF από τα μικρότερα ωοθυλάκια.

Το κατασταλτικό αποτέλεσμα του GnSAF στο ελεύθερο στεροειδών ωοθυλακικό υγρό, των υπερωορρηκτικών γυναικών, αποτελεί μια αναμφισβήτητη πραγματικότητα. Επίσης, η δραστηριότητα του GnSAF αποδείχθηκε με *in vitro* μελέτες στο ωοθυλακικό υγρό βοοειδών<sup>(114)</sup>, στο εκχύλισμα ωοθηκών επίμυων<sup>(114)</sup>, στο χοίρειο ωοθυλακικό υγρό<sup>(108)</sup> και στα ορχικά εκχυλίσματα<sup>(115)</sup>, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες υποφύσεων επίμυων

ως πειραματικά μέσα. Επίσης, ελεύθερο στεροειδών ωοθυλακικό υγρό ελάττωσε την έκκριση της LH (ως απάντηση στην GnRH), από κύτταρα προερχόμενα από τις υποφύσεις αμνών<sup>(113,116)</sup>.

Άλλες in vitro μελέτες έδειξαν, ότι ο GnSAF μπορεί να καταστείλει και τις δυο αποθήκες της LH (η οποία εκκρίνεται ως απάντηση στην GnRH) στις καλλιέργειες υποφύσεων επίμυων<sup>(117,118,112)</sup>, καθώς και στις καλλιέργειες υποφύσεων αμνών<sup>(119)</sup>. Επίσης, ο GnSAF βρέθηκε να ελαττώνει την αυτοεπαγωγική δράση της GnRH, των υποφυσιακών κυττάρων των αμνών<sup>(120)</sup> και των επίμυων μετά από χορήγηση ώσεων GnRH<sup>(121,122)</sup>.

Ο GnSAF/GnSIF βρέθηκε ό,τι, είναι ανθεκτικός στις υψηλές θερμοκρασίες (60 C για 60 λεπτά), ενώ ο Fowler και συν., στις αρχές της δεκαετίας του 1990, έδειξαν ό,τι η βιοδραστικότητά του GnSAF/GnSIF στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, ανιχνεύεται σε περιοχές μοριακού βάρους της τάξης των 10 έως 30 kDa. Οι Danforth & Cheng, εκτίμησαν ό,τι το μοριακό βάρος του GnSAF/GnSIF είναι της τάξης των 28 - 44 kDa στο ωοθυλακικό υγρό των βοοειδών, ενώ στο ωοθυλακικό υγρό χοίρων είναι περίπου 69 kDa. Προς το παρόν δύσκολα θα μπορούσε να εξηγήσει κανείς εάν οι διαφορές των μοριακών βαρών οφείλονται στη διαφορετικότητα των ζώων, που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικά μοντέλα, ή στη διαφορετικότητα του μεγέθους ή της φύσης του μορίου του GnSAF/GnSIF.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΕΙΔΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να δώσει μια δυναμική εκτίμηση της σχέσης μεταξύ του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα και των ωοθηκών, όσον αφορά τον πιθανό μηχανισμό δράσης του GnSAF και στις πιθανές αλληλεπιδράσεις του με άλλες ορμόνες.

Ο μηχανισμός αυτός όπως αναμένεται είναι πολύπλοκος. Κάποιες πτυχές του θα διασαφηνισθούν στις σελίδες που ακολουθούν. Τα ερωτήματα που θα απαντηθούν είναι:

- α) ποια η επίδραση της FSH στον GnSAF στον ανθρώπινο εμμηνορυσιακό κύκλο;
- β) ποιες οι σχέσεις οιστραδιόλης, inhibin και GnSAF;
- γ) πως επιδρά η FSH στην υπόφυση στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες; Παρουσιάζει η FSH παρόμοια δραστηριότητα με τον GnSAF ή όχι;
- δ) ποιος ο πιθανός ρόλος του GnSAF στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο;

#### 4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Συνολικά στη πειραματική μελέτη έλαβαν μέρος 34 γυναίκες, από τις οποίες 24 ήταν προεμμηνοπαυσιακές και οι υπόλοιπες 10



μετεμνηνοπαυσιακές. Πρέπει να αναφερθεί ότι η συμμετοχή των γυναικών ήταν εθελούσια και έγινε μετά από έγκρισή τους.

Οι 24 προεμνηνοπαυσιακές γυναίκες διαιρέθηκαν σε τρεις ομάδες. Τα χαρακτηριστικά τους θα αναλυθούν ξεχωριστά για κάθε ομάδα. Η πρώτη αποτελούνταν από 6, η δεύτερη από 12 και η τρίτη από 6 γυναίκες. Οι μετρήσεις έλαβαν μέρος κατά την διάρκεια 60 εμμηνορυσιακών κύκλων, από τους οποίους 24 ανήκαν στην πρώτη ομάδα, 24 στη δεύτερη και 12 στη τρίτη. Όλες οι γυναίκες χρησίμευσαν ως μάρτυρες (control) του εαυτού τους.

Η πρώτη ομάδα των 6 γυναικών παρουσίαζε ανεξήγητη παρατεταμένη στείρωση με φυσιολογικούς ωοθυλακιωορρηκτικούς κύκλους. Η ωοθυλακιωορρηξία ελέγχονταν τόσο ορμονικά (μέτρηση της προγεστερόνης), όσο και υπερηχογραφικά (απεικόνιση των δυο ωοθηκών), πριν τη συμμετοχή τους στη πειραματική εργασία. Κάθε γυναίκα εκτιμήθηκε σε 4 διαφορετικούς κύκλους στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης. Στον πρώτο κύκλο χορηγήθηκε εικονικό φάρμακο (placebo 0,9% φυσιολογικού ορού), 2 ml ενδομυϊκώς (κύκλος P). Στο δεύτερο κύκλο, χορηγήθηκε 1 αμπούλα (75 IU) FSH ενδομυϊκώς, (Metrodin, της Serono, Faran) (κύκλος 1). Στο τρίτον κύκλο, χορηγήθηκαν 3 αμπούλες (225 IU) FSH ενδομυϊκώς (κύκλος 3). Στον τέταρτο κύκλο χορηγήθηκαν 6 αμπούλες 75 IU FSH ενδομυϊκώς (κύκλος 6). Κάθε χορήγηση λάμβανε μέρος την δεύτερη μέρα του κύκλου στις 09:00 το πρωί, μετά από την έναρξη φυσιολογικής εμμηνορρυσίας. Στη συνέχεια η χορήγηση της GnRH (ποσότητα 10 µg ενδοφλεβίως), λάμβανε μέρος 4, 8, 12 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση του placebo ή της FSH. Δείγματα αίματος λήφθηκαν, σε σχέση με τον χρόνο ενδοφλέβιας χορήγησης GnRH (χρόνος 0), 15 λεπτά

πριν από την χορήγηση (χρόνος -15) στο χρόνο 0 και 30 λεπτά μετά από τη χορήγηση της GnRH (χρόνος 30). Το χρονικό σημείο των 30 λεπτών μετά την χορήγηση της GnRH, επιλέχθηκε επειδή τότε παρατηρείται συνήθως η μέγιστη απάντηση της LH στη δόση των 10 μg της GnRH, τόσο κατά τη διάρκεια φυσιολογικών κύκλων, όσο και κατά τη διάρκεια κύκλων στους οποίους χορηγείται FSH<sup>(123,124)</sup>. Σε όλα τα δείγματα αίματος, που λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια χορήγησης της GnRH, μετρήθηκε η LH. Επίσης μετρήθηκαν οι βασικές τιμές της οιστραδιόλης και της FSH, που αντιστοιχούσαν στη μέση τιμή των δειγμάτων των χρόνων -15 και 0. Επιπλέον δείγματα αίματος λαμβάνονταν αμέσως πριν και 2 ώρες μετά την χορήγηση του placebo ή της χορήγησης της FSH, για τις μετρήσεις των LH, FSH και οιστραδιόλης.

Μετά τα πειράματα με GnRH, οι γυναίκες παρακολουθούνταν στον υπόλοιπο κύκλο υπερηχογραφικά. Όταν το μεγαλύτερο ωοθυλάκιο έφτανε το μέγεθος των 18-20 mm χορηγούνταν, 5.000 IU hCG (Pregnyl, Organon) ενδομυϊκώς εφάπαξ. Ενδομητριάκη σπερματέγχυση με το σπέρμα του συζύγου ακολουθούσε 24 ώρες μετά από την χορήγηση της hCG. Πέντε από τις γυναίκες κατά τη διάρκεια του τέταρτου κύκλου, ανέπτυξαν πολλαπλά ωοθυλάκια (2 - 3 ωοθυλάκια διαμέτρου 14 mm) την ημέρα της χορήγησης της hCG. Μια τρίδυμη κύηση επιτεύχθηκε σε μία γυναίκα κατά τη διάρκεια του τέταρτου κύκλου, ενώ άλλη μία συνέλαβε φυσιολογικά, μετά το τέλος της πειραματικής μελέτης και σε τυχαίο χρόνο.

Η δεύτερη ομάδα περιέλαβε 12 γυναίκες οι οποίες παρουσίαζαν επίσης ανεξήγητη παρατεταμένη στέρωση με φυσιολογικούς ωοθυλακιόρρηκτικούς κύκλους. Η ωοθυλακιόρρηξια είχε επιβεβαιωθεί, τόσο ορμονικά, όσο και



υπερηχογραφικά. Η ομάδα αυτή διαιρέθηκε σε δυο υποομάδες των 6 γυναικών. Στην πρώτη υποομάδα οι γυναίκες μελετήθηκαν στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση, ενώ στη δεύτερη στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου. Κάθε γυναίκα μελετήθηκε κατά τη διάρκεια δυο συνεχόμενων εμμηνορρυσιακών κύκλων. Στον πρώτο κύκλο της πρώτης υποομάδας (κύκλος μάρτυρα) χορηγήθηκε εφάπαξ placebo (0,9% φυσιολογικού ορού), 2 ml ενδομυϊκώς και στο δεύτερο κύκλο FSH (6 αμπούλες των 75 IU FSH, ενδομυϊκώς, δηλαδή 450 IU συνολικά, Metrodin, Serono, Faran). Κάθε χορήγηση λάμβανε μέρος την δεύτερη μέρα του κύκλου, μετά από την έναρξη φυσιολογικής εμμηνορρυσίας, στις 09:00 το πρωί. Στον πρώτο κύκλο της δεύτερης υποομάδας (κύκλος μάρτυρα), χορηγήθηκε επίσης εφάπαξ placebo (2 ml ενδομυϊκώς 0,9% φυσιολογικού ορού) και στο δεύτερο κύκλο χορηγήθηκε FSH, 3 αμπούλες των 75 IU FSH, δηλαδή συνολικά 225 IU FSH, ενδομυϊκώς, την ημέρα που το κυρίαρχο ωοθυλάκιο είχε μέση διάμετρο, ίση με 14-15 mm, μέτρηση που εκτιμήθηκε υπερηχογραφικά.

Και στις δύο υποομάδες των γυναικών ακολούθησε ένας αριθμός πειραμάτων που αφορούσαν στην εκτίμηση της απάντησης της LH στη χορήγηση 10 µg GnRH ενδοφλεβίως και στους δυο κύκλους. Στην πρώτη υποομάδα το πρώτο πείραμα λάμβανε μέρος 12 ώρες μετά την ένεση του placebo ή της FSH, ενώ στη συνέχεια τα πειράματα γίνονταν μια φορά την ημέρα ξεκινώντας την τρίτη ημέρα του κύκλου, μέχρι την ημέρα της μεσοκύκλιας εκκριτικής αιχμής της LH.

Στη δεύτερη υποομάδα η GnRH χορηγήθηκε σε κάθε κύκλο 4, 8, 12 και 24 ώρες μετά την ένεση του placebo ή της FSH. Και στις δύο υποομάδες δείγματα αίματος σε σχέση με την χορήγηση της GnRH (χρόνος 0),

λαμβάνονταν, 15 λεπτά πριν (χρόνος -15) στο χρόνο 0 και 30 λεπτά μετά τη χορήγηση, όπως διευκρινίζεται στην πρώτη ομάδα. Σε όλα τα δείγματα αίματος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χορήγησης της GnRH, μετρήθηκε η LH. Επίσης μετρήθηκαν οι βασικές τιμές (χρόνος 0 και 15 λεπτά πριν την χορήγηση του placebo ή της FSH) των συγκεντρώσεων της FSH και της οιστραδιόλης και στις δυο υποομάδες, ενώ στη δεύτερη υποομάδα μετρήθηκε και η inhibin.

Η τρίτη ομάδα περιέλαβε 6 γυναίκες οι οποίες παρουσίαζαν παρατεταμένη ανεξήγητη στέρωση και στις οποίες η ωοθυλακιορρηξία είχε επιβεβαιωθεί πριν από την συμμετοχή τους στη μελέτη, τόσο ορμονικά με τη μέτρηση προγεστερόνης, όσο και υπερηχογραφικά με την απεικόνιση των ωοθηκών. Οι γυναίκες μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια δυο συνεχόμενων εμμηνορυσιακών κύκλων. Ο πρώτος κύκλος ήταν ο φυσιολογικός, ενώ στο δεύτερο χορηγήθηκε εξωγενώς FSH ενδομυϊκώς, στη σταθερή δόση των 225 IU (3 αμπούλες των 75 IU FSH, Metrodin, Serono, Fagan) ημερησίως αρχίζοντας τη δεύτερη ημέρα του κύκλου. Σε όλες τις γυναίκες χορηγήθηκε GnRH, κατά ώσεις σε πέντε διαδοχικές ενδοφλέβιες δόσεις, των 10 μg η κάθε μια, στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης και στους δυο κύκλους. Τα πειράματα χορήγησης της GnRH λάμβαναν μέρος την ημέρα που το μέγιστο ωοθυλάκιο έφτανε τη διάμετρο των 15 mm, όπως εκτιμούνταν με την χρήση των υπερήχων. Η πρώτη ώση της GnRH δίνονταν μεταξύ 08:30 και 09:00 το πρωί, ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις ανά διαστήματα 2 ωρών. Δείγματα αίματος λαμβάνονταν στα 15 και 0 λεπτά πριν από τη χορήγηση της GnRH και κατόπιν στα 30, 60 και 120 λεπτά μετά από κάθε χορήγηση. Από τη στιγμή που η GnRH δίνονταν ανά 2 ώρες, το δείγμα αίματος των 120 λεπτών,



αντιστοιχούσε χρονικά με τη λήψη του δείγματος πριν από τη χορήγηση της επόμενης ώσης της GnRH. Στον κύκλο που δόθηκε FSH, η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας γίνονταν με την χορήγηση HCG, όταν το μέγιστο ωοθυλάκιο είχε μέγεθος 18-20 mm. Εάν τρία ή περισσότερα ωοθυλάκια ήταν μεγαλύτερα των 16 mm, όπως συνέβη σε δυο γυναίκες, αντί της HCG δίνονταν ένας αγωνιστής της GnRH, ώστε να αποφευχθεί το κλινικό σύνδρομο της υπερδιέγερσης των ωοθηκών.

Κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών κύκλων, δεν χορηγήθηκε HCG επειδή όλες οι γυναίκες είχαν φυσιολογική ωοθυλακιορρηξία η οποία εκτιμούνταν υπερηχογραφικά. Ενδομητριάκη σπερματέγχυση με το σπέρμα του συζύγου της αντίστοιχης γυναίκας λάμβανε μέρος σε όλους τους κύκλους. Καμιά από τις γυναίκες δεν έμεινε έγκυος. Σε όλα τα δείγματα που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της GnRH, μετρήθηκαν οι εξής ορμόνες: LH, οιστραδιόλη και inhibin.

Η τέταρτη ομάδα περιελάμβανε 10 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, 52 έως 64 ετών. Καμιά φαρμακευτική αγωγή για οποιοδήποτε λόγο, συμπεριλαμβανομένων και ορμονικών σκευασμάτων, δεν είχε ληφθεί από τις γυναίκες κατά τους τελευταίους 6 μήνες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Σε όλες τις γυναίκες χορηγήθηκαν δυο συνεχόμενες φαρμακευτικές αγωγές, διάρκειας 10 ημερών, που περιελάμβαναν 5 ημέρες χορήγησης φυσιολογικού ορού και 5 ημέρες FSH. Η επιλογή της πρώτης αγωγής ήταν τυχαία και η χορήγησή της εναλλακτική, έτσι ώστε 5 γυναίκες ξεκίνησαν με φυσιολογικό ορό (1η υποομάδα) και 5 με FSH (2η υποομάδα). Τόσο ο φυσιολογικός ορός όσο και η FSH δίνονταν ενδομυϊκώς. Η δόση του φυσιολογικού ορού ήταν 2

ml και της FSH 225 IU (3 αμπούλες των 75 IU FSH, Metrodin, Serono, Faran), καθημερινώς. Σε κάθε γυναίκα μελετήθηκε η απάντηση της υπόφυσης στη GnRH, πέντε φορές κατά την συνολική διάρκεια του πειράματος, δηλαδή δυο φορές τη 1η μέρα και από μία φορά την 2η, 5η και 10η ημέρα.

Την πρώτη ημέρα η χορήγηση της GnRH λάμβανε μέρος πριν από την έναρξη της αγωγής της FSH ή του φυσιολογικού ορού, στις 09:00 το πρωί και 12 ώρες μετά την έναρξη, ενώ κατά τη 2η, 5η και 10η ημέρα, η GnRH δίνονταν μετά από την χορήγηση της FSH ή του φυσιολογικού ορού (στις 09:00). Κάθε δόση της GnRH δίνονταν ενδοφλεβίως και στη ποσότητα των 10 µg. Δείγματα αίματος σε σχέση με τον χρόνο χορήγησης της GnRH (χρόνος 0), λαμβάνονταν, 15 λεπτά πριν από τη χορήγηση (χρόνος -15) στο χρόνο 0 και 30 λεπτά μετά από τη χορήγηση (χρόνος 30). Η LH μετρήθηκε σε όλα τα δείγματα αίματος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με GnRH. Επίσης μετρήθηκαν οι βασικές τιμές (χρόνος -15 και 0) της οιστραδιόλης και της FSH. Επιπλέον δείγματα αίματος για την εκτίμηση των βασικών τιμών των ορμονών λήφθηκαν κατά την 3η και 8η ημέρα του πειράματος.

#### **4.3 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ**

Οι μετρήσεις των ορμονών της FSH και της LH βασίστηκαν σε ανοσομετρικές τεχνικές χρησιμοποιώντας το φαινόμενο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced luminescence), της Amersham International, U.K.

Η μέθοδος για τις μετρήσεις της FSH χρησιμοποιούσε αντισώματα προβάτου, anti-FSH τα οποία επικάλυπταν τις θέσεις υποδοχείς του ορού και



μονοκλωνικά αντισώματα, anti-FSH επίμυος, τα οποία ήταν σημασμένα με ραφανιβική υπερ-οξειδάση (horseradish peroxidase). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε IU/l σύμφωνα με τους κανονισμούς του W.H.O. (Παγκόσμιος Οργανισμός υγείας, 2η I.P.R. της ανθρώπινης FSH 78/549).

Η μέθοδος για τις μετρήσεις της LH χρησιμοποιούσε μονοκλωνικά αντισώματα επίμυος, anti-LH, (ολόκληρου του μορίου), επικαλυμμένα στους υποδοχείς του ορού και μονοκλωνικά επίμυος anti-β-υποομάδας της LH, σημασμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε IU/l σύμφωνα με τους κανονισμούς του W.H.O. (1η I.P.R. της ανθρώπινης LH, 68/40).

Η οιστραδιόλη μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μια φθορισμομετρική μέθοδο στερεάς φάσης βασιζόμενη, στον ανταγωνισμό της σημασμένης οιστραδιόλης με ευρώπιο και δείγματος οιστραδιόλης για πολυκλωνικά αντισώματα, anti-οιστραδιόλης (DELFLIA Estadiol kit). Τα αντιδραστήρια κατασκευάζονταν από την Pharmacia, Wallac Oy, Turkey, Finland και περιείχαν αντιορό οιστραδιόλης κουνελιού και anti-IgG κουνελιού επιστρωμένα στη στερεά φάση ως δεύτερο αντίσωμα.

Η inhibin μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ανοσοενζυμική τεχνική στερεάς φάσης (INHIBIN - ELISA). Τα αντιδραστήρια παρασκεύασε η Medgenix Diagnostics SA, Fleurus, Belgium και περιέχουν πολυκλωνικά αντισώματα αιγός επιστρωμένα στις θέσεις υποδοχείς του ορού και μονοκλωνικά αντισώματα επίμυος συζευγμένα με υπεροξειδάση. Και τα δυο αντισώματα αναγνωρίζουν δύο διαφορετικούς επιτόπους στην α-υποομάδα της ανθρώπινης inhibin. Δεν υπάρχει διασταυρωμένη αντίδραση με αυξητικούς παράγοντες LH, FSH και





activin σε συγκεντρώσεις πάνω από των 100 ng/ml. Οι τιμές εκφράστηκαν σε IU/ml.

Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της FSH, της LH, της οιστραδιόλης και της inhibin, ήταν 0,5 IU/l, 0,12 IU/l, 50 pmol/l και 0,1 IU/ml, ενώ τα διαστήματα εμπιστοσύνης κυμαίνονταν μεταξύ 7,5% και 6,0%, 9,0% και 6,8%, 9,4% και 8,5% και τέλος 8,8% και 2,9% αντίστοιχα.

#### **4.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

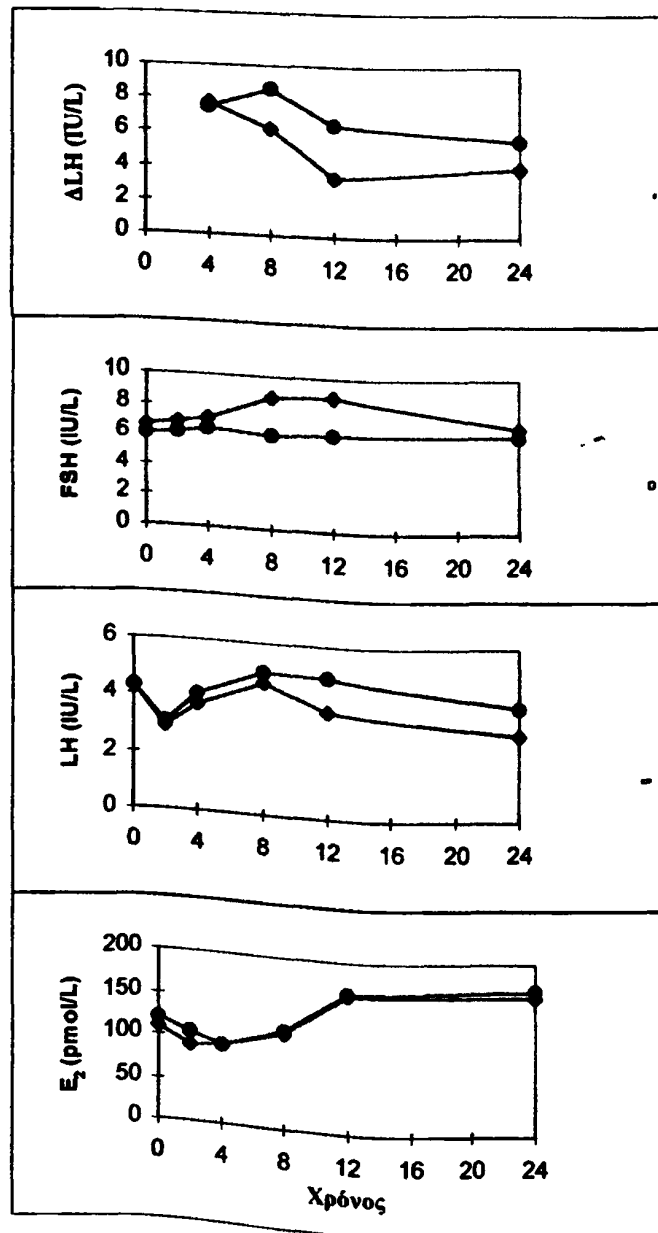
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας την Ανάλυση της Διακύμανσης κατά ένα παράγοντα. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών στις τιμές των συγκεντρώσεων των ορμονών, στην ίδια ομάδα, εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το Student's t-τεστ (κατά ζεύγη). Οι αριθμητικές μέσες τιμές ( $\pm$  τυπικό σφάλμα) των συγκεντρώσεων των ορμονών αναφέρονται στα αποτελέσματα. Όμως στη στατιστική ανάλυση, τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας τη λογαριθμική συνάρτηση. Ο μετασχηματισμός αυτός θεωρήθηκε αναγκαίος για να ικανοποιηθεί η βασική προϋπόθεση του στατιστικού τεστ, ό,τι τα δεδομένα κατά προσέγγιση προέρχονται από την κανονική (Gaussian) κατανομή.

#### **4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Τα αποτελέσματα αναλύονται στις παραγράφους που ακολουθούν ανά ομάδα γυναικών.

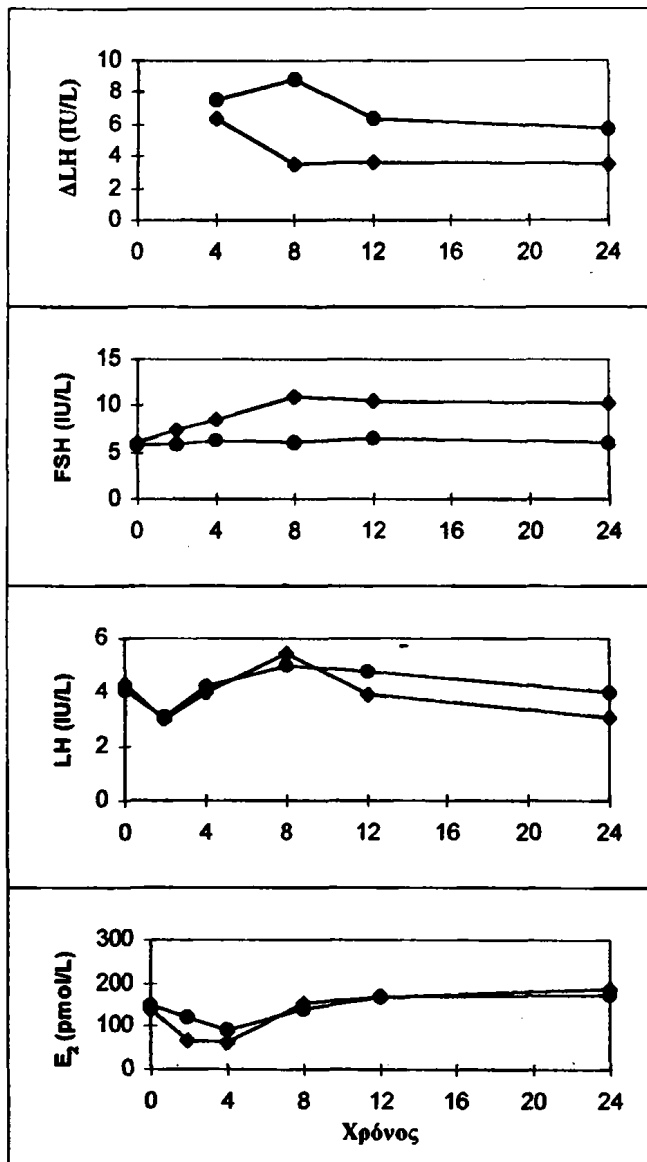
#### 4.5.1 Αποτελέσματα της πρώτης ομάδας

Η χορήγηση της FSH στις γυναίκες είχε ως αποτέλεσμα μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση της στάθμης της FSH στον ορό. Οι βασικές τιμές της FSH πριν από τη χορήγηση του placebo ή της FSH, δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κύκλων P και των υπόλοιπων κύκλων. Στον κύκλο P οι βασικές τιμές της FSH, δεν άλλαξαν σημαντικά από το χρονικό σημείο 0 ( $5,6 \pm 0,4$  IU/l) μέχρι τις 24 ώρες ( $6,0 \pm 0,5$  IU/l).



**Σχήμα 1:** Η απάντηση της ΔLH (30 λεπτά) μετά από την χορήγηση 10 μgr GnRH καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της FSH, LH και E<sub>2</sub> μετά την ένεση των 2 ml φυσιολογικού ορού 0,9% (◆) ή μιας αμπούλας FSH (□) 75 iu την δεύτερη ημέρα (09:00) του εμμηνορυσιακού κύκλου σε γυναίκες με φυσιολογικούς θυλακιοωορρηκτικούς κύκλους.

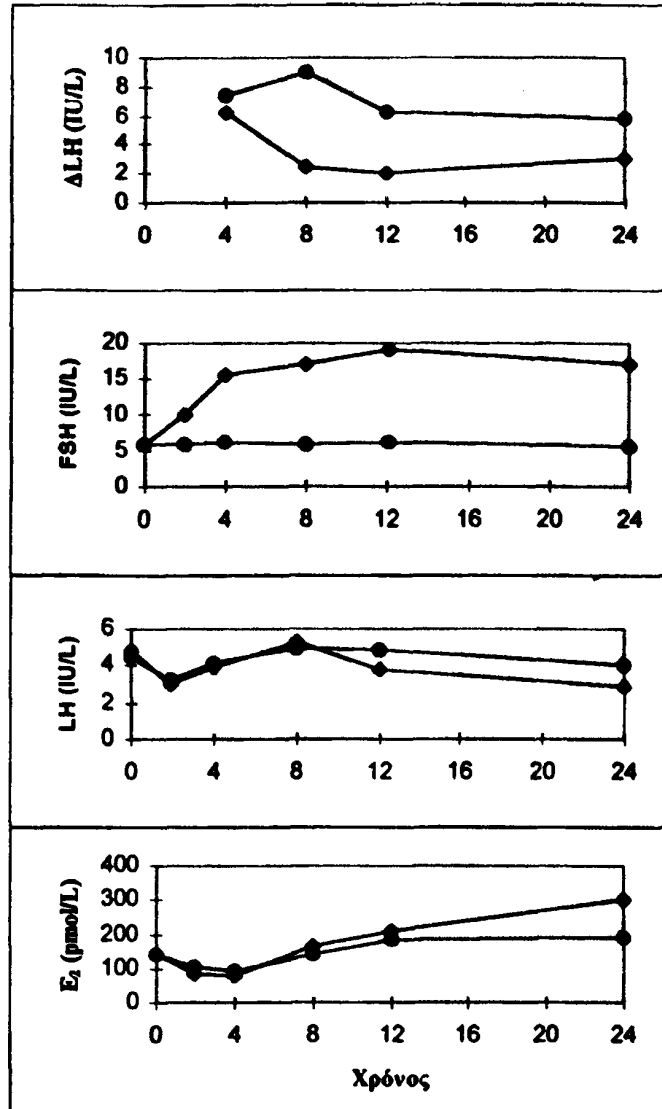
Συγκρίνοντας τον κύκλο P με τον κύκλο 1 (1 αμπούλα των 75 IU FSH), οι τιμές της FSH στον ορό αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά την 8η ώρα ( $9,4 \pm 0,8$  IU/l,  $P < 0,01$ ) και την 12η ώρα ( $10,1 \pm 0,7$  IU/l,  $P < 0,001$ , βλέπε σχήμα 1), ενώ μετά την χορήγηση των 3 φιαλιδίων (225 IU FSH κύκλος 3, βλέπε σχήμα 2) και 6 φιαλιδίων (450 IU FSH κύκλος 6, βλέπε σχήμα 3), η FSH στον ορό αυξήθηκε σημαντικά κατά τις πρώτες 2 ώρες από την στιγμή της χορήγησης ( $P < 0,01$ ) και παρέμεινε υψηλή 24 ώρες μετά την χορήγηση ( $P < 0,001$ ). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της FSH σημειώθηκαν με την χορήγηση 6 φιαλιδίων ( $18,9 \pm 1,7$  IU/l, στις 12 ώρες, βλέπε σχήμα 3).



**Σχήμα 2:** Η απάντηση της ΔLH (30 λεπτά) μετά από την χορήγηση 10 μgr GnRH καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της FSH, LH και E<sub>2</sub> μετά από ένεση 2 ml φυσιολογικού ορού 0,9% (◆) ή 3 αμπουλών FSH (□) 225 iu την 2<sup>η</sup> ημέρα (09:00) του εμμηνορυσιακού κύκλου σε γυναίκες με φυσιολογικούς θυλακιοωορρηκτικούς κύκλους.

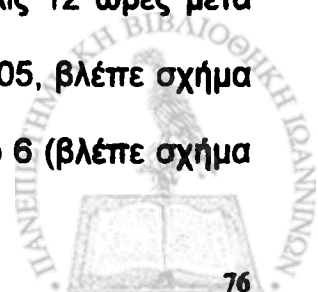


Η απάντηση της LH στην GnRH υπολογίσθηκε ως η αύξηση της LH ( $\Delta LH$ ) πάνω από το βασικό επίπεδο (μηδενικό). Η  $\Delta LH$  ήταν στατιστικώς σημαντικά αμβλυμένη σε όλους τους κύκλους στους οποίους χορηγήθηκε FSH σε σχέση με τους κύκλο P.



Σχήμα 3: Η απάντηση της  $\Delta LH$  (30 λεπτά) μετά από την χορήγηση 10  $\mu g$  GnRH καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της FSH, LH και  $E_2$  μετά την ένεση των 2 ml φυσιολογικού ορού 0,9% (◆) ή 6 αμπουλών FSH (□) 450 iu την δεύτερη ημέρα (09:00) του εμμηνορυσιακού κύκλου σε γυναίκες με φυσιολογικούς θυλακιοωορρηκτικούς κύκλους.

Παρ' όλα αυτά στον κύκλο 1, η άμβλυση εμφανίσθηκε μόλις 12 ώρες μετά από την ένεση της FSH ( $3,3 \pm 1,0$  έναντι  $6,4 \pm 0,9$  IU/l,  $P < 0,05$ , βλέπε σχήμα 1), ενώ στον κύκλο 3 (βλέπε σχήμα 2) καθώς και στον κύκλο 6 (βλέπε σχήμα



3) η άμβλυωση ήταν έκδηλη στις πρώτες 8 ώρες ( $3,3 \pm 1,2$  και  $2,8 \pm 0,9$  IU/l, αντίστοιχα, έναντι  $9,1 \pm 1,3$  IU/l,  $P < 0,01$ ), στις 12 ώρες ( $3,3 \pm 0,5$  και  $2,0 \pm 0,5$  IU/l, αντίστοιχα, έναντι  $6,4 \pm 0,8$ ,  $P < 0,01$ ) και στις 24 ώρες ( $3,4 \pm 0,7$  και  $3,1 \pm 0,7$  IU/l, αντίστοιχα έναντι  $5,7 \pm 0,6$ ,  $P < 0,05$ ). Χαρακτηριστικά υπήρχε μια τάση για μεγαλύτερη άμβλυωση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της FSH.

Οι βασικές τιμές της LH και της οιστραδιόλης πριν από τη χορήγηση του placebo ή της FSH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κύκλων που χορηγήθηκε placebo και των κύκλων που χορηγήθηκε FSH. Οι βασικές τιμές της LH όμως παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές από το χρονικό σημείο 0 στις 24 ώρες. Η γραφική παράσταση αυτών των μεταβολών ήταν παρόμοια σε όλους τους κύκλους. Ειδικότερα, οι τιμές της LH ελαττώθηκαν ελαφρά τις πρώτες δύο ώρες και στη συνέχεια αυξήθηκαν σημαντικά στις 8 ώρες, ( $P < 0,05$ , η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το κατά ζεύγη t-τεστ) ακολουθούμενες από σταδιακή ελάττωση. Αυτές οι μεταβολές των βασικών τιμών της LH δεν συσχετίζονται με τη χορήγηση της FSH, γιατί οι τιμές δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων κύκλων, σε όλες τις χρονικές στιγμές μέτρησης, εκτός αυτών των 24 ωρών στον κύκλο 6, όπου οι συγκεντρώσεις της LH ήταν σημαντικά χαμηλότερες απ' ό,τι στον κύκλο P ( $2,8 \pm 0,2$  έναντι  $4,0 \pm 0,6$  IU/l,  $P < 0,05$ , βλέπε σχήμα 3).

Οι τιμές της οιστραδιόλης στον κύκλο P ήταν παρόμοιες τόσο στο χρονικό σημείο 0 όσο και στις 24 ώρες. Όμως η οιστραδιόλη έδειξε παροδική αλλά σημαντική ελάττωση από το 0 ( $142 \pm 15$  pmol/l), στις 4 ώρες ( $88 \pm 9$  pmol/l) και κατόπιν μη σημαντική μεταβολή από τις 12 στις 24 ώρες. Ένας παρόμοιος τύπος στατιστικά σημαντικών μεταβολών στις συγκεντρώσεις της



οιστραδιόλης παρατηρήθηκε στους κύκλους 1 (βλέπε σχήμα 1), 3 (βλέπε σχήμα 2) και 6 (βλέπε σχήμα 3) ενώ οι τιμές δεν διέφεραν σημαντικά από αυτές του κύκλου P, εκτός από αυτές στο κύκλο 6. Σ' αυτόν τον κύκλο, οι τιμές της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά από τις 12 ώρες ( $197 \pm 28$  pmol/l), στις 24 ώρες ( $313 \pm 51$  pmol/l,  $P < 0,001$ ) και σ' αυτό το σημείο ήταν σημαντικά υψηλότερες από ό,τι στον κύκλο P ( $184 \pm 27$  pmol/l,  $P < 0,05$ ).

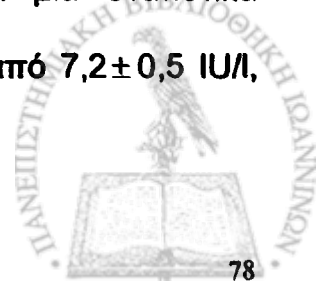
Σε όλους τους κύκλους αρκετά μικρά ωοθυλάκια (διαμέτρου  $< 8$  mm) ανιχνεύθηκαν υπερηχογραφικά την 3η ημέρα του κύκλου και το μέγεθος του μεγαλύτερου ωοθυλακίου, δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των κύκλων P και των FSH κύκλων.

#### 4.5.2 Αποτελέσματα της δεύτερης ομάδας

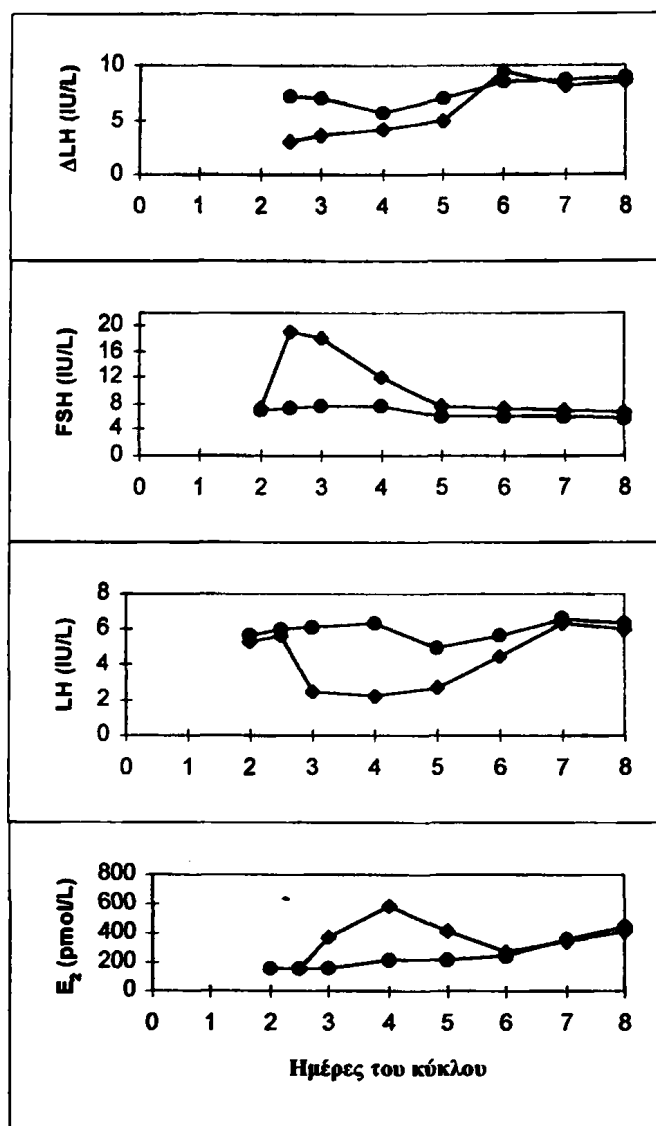
Η δεύτερη ομάδα όπως αναφέρθηκε διαιρέθηκε σε δυο υποομάδες. Και στις δυο υποομάδες η απάντηση της LH στην GnRH, υπολογίσθηκε ως η αύξηση της συγκέντρωσης της LH ( $\Delta LH$ ) πάνω από το βασικό επίπεδο (μηδενικό).

##### Αποτελέσματα 1ης υποομάδας

Οι βασικές τιμές των FSH, LH και οιστραδιόλης τη 2η ημέρα του κύκλου δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κύκλων που χορηγήθηκε placebo και των κύκλων στους οποίους χορηγήθηκε FSH (βλέπε σχήμα 4). Η χορήγηση της FSH στις γυναίκες είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH στον ορό, από  $7,2 \pm 0,5$  IU/l,



πριν από την ένεση της FSH, σε  $18,8 \pm 1,7$  IU/l και  $18,4 \pm 1,6$  IU/l στις 12 ώρες και 24 ώρες μετά την ένεση αντίστοιχα, ( $P < 0,001$ ).



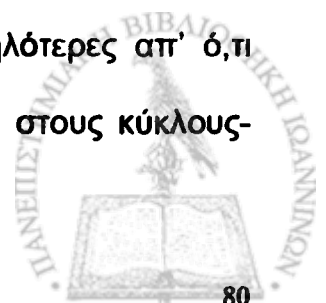
**Σχήμα 4:** Η αύξηση της συγκέντρωσης της LH (ΔLH) μετά από την χορήγηση 10 μgr GnRH στα πρώτα 30 λεπτά καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της FSH, LH και E<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης των κύκλων μαρτύρων (◆) και των κύκλων με FSH (□) μετά την έναρξη φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου. Η χορήγηση του placebo (2 ml 0,9% φυσιολογικού ορού) ή της FSH (450 iu) πραγματοποιείται ενδομυϊκά κατά τη 2η ημέρα του κύκλου.

Η συγκέντρωση της FSH παρέμεινε υψηλή την 4η ημέρα ( $12,3 \pm 0,8$  IU/l,  $P < 0,001$ ). Κατά την 2η (12 ώρες), 3η και 4η ημέρα, οι συγκεντρώσεις της FSH, ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τους κύκλους-μάρτυρες, χωρίς

όμως σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο κύκλων από την 5η μέρα και μετά. Στους κύκλους-μάρτυρες η μεγαλύτερη τιμή της FSH, παρατηρήθηκε κατά την 3η ημέρα ( $7,8 \pm 0,5$  IU/l) και ελαττώθηκε σταδιακά την 6η ημέρα ( $P < 0,05$ ).

Η απάντηση της ΔLH στην GnRH ήταν σημαντικά αμβλυμένη στους κύκλους που χορηγήθηκε FSH, συγκρίνοντάς τους με τους κύκλους-μάρτυρες, 12 ώρες μετά από τη χορήγηση της FSH ( $P < 0,001$ ) καθώς και τις ημέρες 3 ( $P < 0,01$ ), 4 ( $P < 0,05$ ) και 5 ( $P < 0,05$ ), χωρίς όμως σημαντική διαφορά, μεταξύ των δυο κύκλων από την 6η μέρα και μετά (βλέπε σχήμα 4). Η χαμηλότερη ΔLH τιμή (μέγιστη άμβλυση) εμφανίσθηκε 12 ώρες μετά από την χορήγηση της FSH ( $3,0 \pm 0,6$  IU/l) και αυτό αντιστοιχεί χρονικά στην υψηλότερη συγκέντρωση της FSH. Καθώς οι συγκεντρώσεις της FSH στη συνέχεια ελαττώθηκαν, η ΔLH αυξήθηκε σταδιακά μέχρι την 6η ημέρα ( $P < 0,001$ ). Στους κύκλους μάρτυρες η ΔLH μετά από μια παροδική ελάττωση την 4η ημέρα ( $5,8 \pm 0,7$  IU/l,  $P < 0,05$ ), αυξήθηκε μέχρι την 6η ημέρα ( $8,6 \pm 0,9$  IU/l,  $P < 0,05$ ). Και στους δυο κύκλους η ΔLH δεν διέφερε σημαντικά από την 6η έως την 8η ημέρα. Σ' αυτή την πειραματική μελέτη, η απάντηση της FSH στην GnRH δεν εκτιμήθηκε, επειδή υπήρχε εξωγενής χορήγηση της FSH.

Οι βασικές συγκεντρώσεις της LH και της οιστραδιόλης δεν διέφεραν σημαντικά 12 ώρες μετά την ένεση του placebo ή της FSH (βλέπε σχήμα 4). Κατόπιν η συγκέντρωση της LH παρέμεινε σταθερή στους κύκλους-μάρτυρες, αλλά ελαττώθηκε σημαντικά στους FSH κύκλους την 3η ημέρα ( $2,6 \pm 0,5$  IU/l) την 4η ( $2,3 \pm 0,7$  IU/l,  $P < 0,01$ ) και την 5η ημέρα ( $2,8 \pm 0,7$  IU/l,  $P < 0,01$ ). Αυτές τις ημέρες οι συγκεντρώσεις της LH ήταν σημαντικά χαμηλότερες απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $P < 0,01$ ). Η οιστραδιόλη του ορού στους κύκλους-



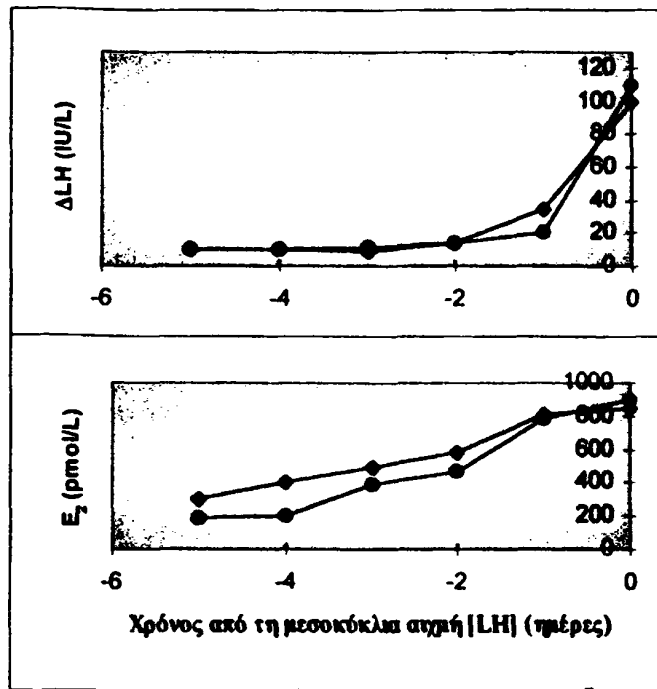


μάρτυρες αυξήθηκε σταδιακά από την 2η μέχρι την 8η ημέρα ( $P < 0,05$ ), ενώ στους FSH κύκλους αυξήθηκε ταχέως την 3η ημέρα ( $343 \pm 50$  pmol/l), φτάνοντας σε αιχμή κατά την 4η ημέρα ( $587 \pm 121$  pmol/l) και παρέμεινε υψηλή, αν και σταδιακά ελαττωνόταν κατά την 5η ημέρα ( $412 \pm 107$  pmol/l,  $P < 0,05$ ). Σ' αυτές τις χρονικές στιγμές οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στους FSH κύκλους, ήταν σημαντικά υψηλότερες απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $P < 0,05$ , βλέπε σχήμα 4). Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δυο κύκλων, αλλά αυξήθηκαν σημαντικά από την 6η μέχρι την 8η ημέρα ( $P < 0,05$ ).

Η ΔLH πριν και κατά την μεσοκυκλική αιχμή της LH ήταν παρόμοια τόσο στους κύκλους-μάρτυρες, όσο και στους FSH κύκλους (βλέπε σχήμα 5). Και στους δυο κύκλους η ΔLH δεν διέφερε σημαντικά από τις ημέρες -5 μέχρι -3, αλλά σχεδόν διπλασιάστηκε μεταξύ ημέρας -3 (κύκλοι-μάρτυρες  $9,0 \pm 0,7$ , FSH κύκλοι  $7,4 \pm 1,6$  IU/l) και -2 (κύκλοι-μάρτυρες  $13,8 \pm 2,1$ , FSH κύκλοι  $14,7 \pm 4,8$  IU/l,  $P < 0,05$ ), καθώς και μεταξύ των ημερών -2 και -1 (κύκλοι-μάρτυρες την ημέρα -1  $24,6 \pm 4,2$ , FSH κύκλοι την ημέρα -1  $35,6 \pm 8,9$  IU/l,  $P < 0,05$ ). Κατά την στιγμή που η LH παρουσίαζε την αιχμή της παρατηρήθηκε μια απότομη αύξηση στην ΔLH (κύκλοι-μάρτυρες  $113 \pm 17,5$ , FSH κύκλοι  $104 \pm 15,5$  IU/l).

Οι τιμές της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σταδιακά κατά τις τέσσερις μέρες πριν από την εκκριτική αιχμή της LH, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο κύκλων. Η αύξηση των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης ήταν επίσης σημαντική από την ημέρα -5 έως την ημέρα -3 και

στους δυο κύκλους ( $P < 0,05$ ). Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης παρουσίασε αιχμή την ίδια ημέρα με την αιχμή της LH.



**Σχήμα 5:** Η αύξηση της συγκέντρωσης της LH ( $\Delta LH$ ) κατά την πάροδο των πρώτων 30 λεπτών από τη χορήγηση της GnRH (εφάπαξ δόση) καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων του πλάσματος της E<sub>2</sub> κατά το δεύτερο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης των κύκλων μαρτύρων (♦) και των κύκλων με FSH (□) μετά την έναρξη φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου. Τα αποτελέσματα ακολουθούν κανονική κατανομή μέχρι την ημέρα αιχμής της LH (ημέρα 0). Το placebo (2 ml 0,9% φυσιολογικού ορού) ή η FSH (450 iu) χορηγήθηκαν ενδομυϊκά κατά τη 2<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου.

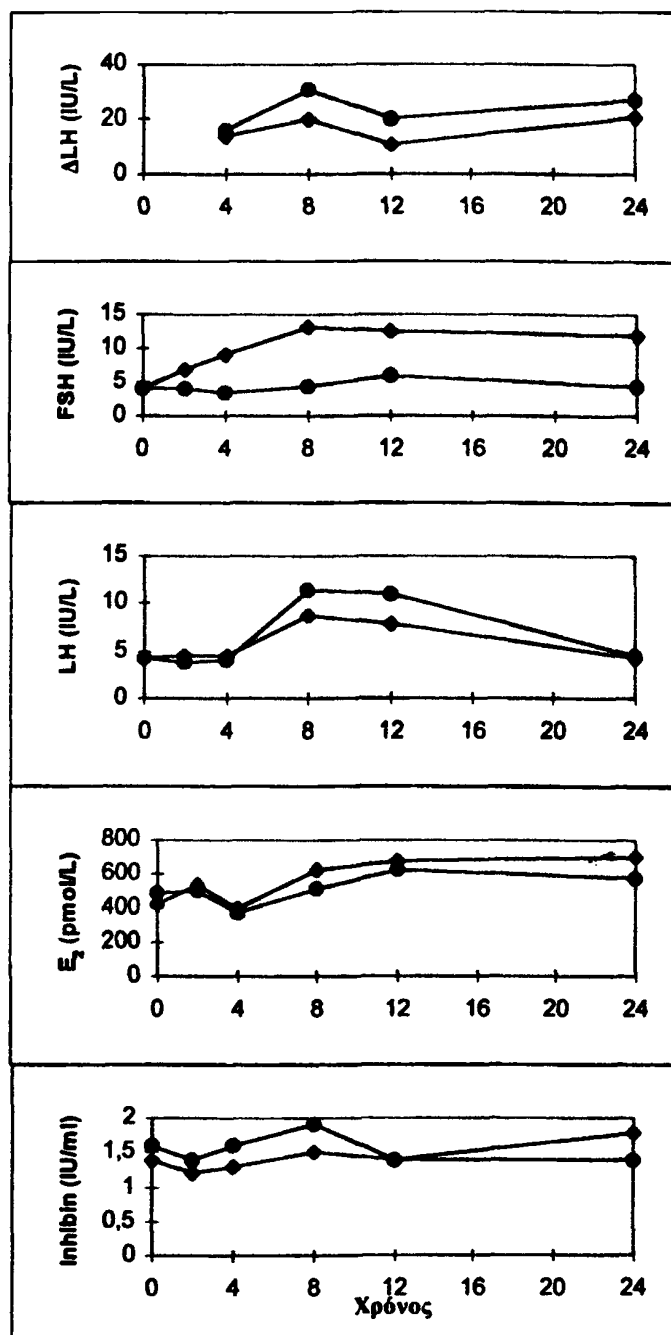
Και στους δυο κύκλους μόνο ένα ωοθυλάκιο  $>13$  mm σε διάμετρο ανιχνεύθηκε υπερηχογραφικά την ημέρα της μεσοκύκλιας εκκριτικής αιχμής της LH. Η ωοθυλακιορρηξία επιβεβαιώθηκε υπερηχογραφικά. Καμιά γυναίκα δεν έμεινε έγκυος κατά την διάρκεια της παρούσης πειραματικής διεργασίας. Παρ' όλα αυτά, μια γυναίκα συνέλαβε αυτόματα σε επόμενο κύκλο μετά το τέλος της μελέτης, χωρίς την χορήγηση καμιάς φαρμακευτικής αγωγής.

### Αποτελέσματα δεύτερης υποομάδας

Η χορήγηση του placebo ή της FSH έγινε την ίδια περίπου ημέρα κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, στους κύκλους-μάρτυρες ( $10,5 \pm 0,9$  ημέρες) και στους FSH κύκλους ( $10,6 \pm 0,8$  ημέρες). Το μέγεθος του επικρατούντος ωοθυλακίου εκείνη την ημέρα ήταν παρόμοιο και στους δυο κύκλους ( $14,4 \pm 0,1$ mm και  $14,5 \pm 0,2$  mm) αντίστοιχα.

Οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της FSH πριν από την έναρξη του πειράματος δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δύο κύκλων (βλέπε σχήμα 6). Οι τιμές της FSH αυξήθηκαν σημαντικά κατά την 2η, 4η, 8η, 12η και 24η ώρα από την χορήγηση της FSH και ήταν σημαντικά υψηλότερες από αυτές στους κύκλους-μάρτυρες.

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της FSH παρουσιάστηκαν μετά 8 ώρες ( $12,9 \pm 0,4$  IU/l). Μια σημαντική αύξηση της FSH παρατηρήθηκε και στους κύκλους-μάρτυρες μεταξύ 4ης ( $3,6 \pm 0,2$  IU/l) και 12ης ώρας ( $6,1 \pm 1,0$  IU/l,  $P < 0,05$ ), από τη χορήγηση του placebo η οποία ελαττώθηκε στη συνέχεια. Τέσσερις ώρες μετά την χορήγηση placebo ή FSH, η ΔLH ήταν παρόμοια και στους δυο κύκλους ( $14,6 \pm 1,2$  IU/l, κύκλοι-μάρτυρες,  $13,5 \pm 2,1$  IU/l, κύκλοι FSH). Στη συνέχεια η ΔLH παρουσίασε σημαντική αύξηση μεταξύ 4ης και 8ης ώρας και ελαττώθηκε μεταξύ 8ης και 12ης ώρας, για να αυξηθεί και πάλι σημαντικά, την 24η ώρα μετά την έναρξη του πειράματος ( $P < 0,05$ ).



**Σχήμα 6:** Η αύξηση της συγκέντρωσης της LH (ΔLH) κατά την πάροδο των πρώτων 30 λεπτών μετά τη χορήγηση 10 μgr GnRH καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων του πλάσματος (πριν τη χορήγηση της GnRH) FSH, LH, E<sub>2</sub> και inhibin μετά τη χορήγηση placebo (□) ή FSH 225 iu (◆) προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης σε δύο διαφορετικούς εμμηνορυσιακούς κύκλους των αντιστοίχων γυναικών.

Παρ' όλα αυτά όμως, η αύξηση της ΔLH στους FSH κύκλους ήταν σημαντικώς αμβλυμένη συγκρίνοντας μ' αυτή στους κύκλους-μάρτυρες την 8η ώρα (19,5±2,6, έναντι 30,6±3,2 IU/l, P<0,01), τη 12η ώρα (10,5±1,1 IU/l, έναντι

19,2 ± 1,8 IU/l, P<0,05) και την 24η ώρα (20,1 ± 2,8, έναντι 28,0 ± 4,4 IU/l, P<0,05), από την χορήγηση της FSH.

Οι βασικές τιμές της LH και της οιστραδιόλης πριν από την έναρξη του πειράματος ήταν παρόμοιες και στους δυο κύκλους. Κατά τη στιγμή μέτρησης της απάντησης της LH στην GnRH, οι βασικές συγκεντρώσεις της LH αυξήθηκαν σημαντικά και στους δύο κύκλους μεταξύ 4ης και 8ης ώρας (P<0,01), ενώ στη συνέχεια σταδιακά ελαττώθηκαν. Η αύξηση αυτή ήταν μικρότερη στους FSH κύκλους κατά την 8η και 12η ώρα (P<0,01). Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης δεν άλλαξαν σημαντικά κατά την διάρκεια της δοκιμασίας GnRH και στους δυο κύκλους. Οι συγκεντρώσεις της inhibin στον ορό, ήταν παρόμοιες και στους δυο κύκλους πριν και μετά τη χορήγηση της GnRH, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές από την έναρξη μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου (βλέπε σχήμα 6).

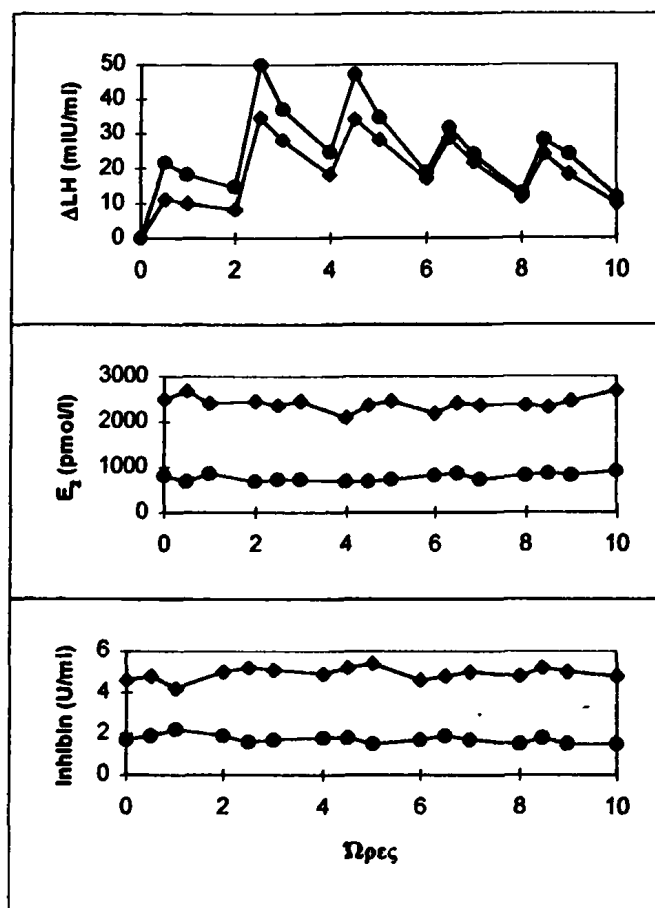
Όλες οι παραπάνω γυναίκες παρουσίασαν μεσοκύκλια εκκρινική αιχμή της LH και στους δυο κύκλους μέσα σε 2. έως 3 ημέρες από την ένεση του placebo ή της FSH. Μόνο ένα ωοθυλάκιο > 13 mm σε διάμετρο ανιχνεύτηκε υπερηχογραφικά την ημέρα της αιχμής της LH. Η ωοθυλακιορρηξία επιβεβαιώθηκε υπερηχογραφικά. Καμία γυναίκα της υποομάδας αυτής δεν έμεινε έγκυος κατά την διάρκεια της μελέτης.

#### 4.5.3 Αποτελέσματα της τρίτης ομάδας

Το μέγεθος του μεγαλύτερου ωοθυλακίου την ημέρα της χορήγησης της GnRH, δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των κύκλων-μαρτύρων (15,2 ± 0,1

mm) και των FSH κύκλων ( $15,0 \pm 0,1$  mm). Παρ' όλα αυτά όμως, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης πριν από τη χορήγηση της 1ης GnRH δόσης ήταν σημαντικά αυξημένες στους FSH κύκλους ( $2465 \pm 440$  pmol/l), απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $597 \pm 123$  pmol/l,  $P < 0,01$ ). Η χορήγηση της FSH είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων σε όλες τις γυναίκες. Την ημέρα της χορήγησης της GnRH, ο μέσος αριθμός των ωοθυλακίων  $> 12$  mm σε διάμετρο ήταν στους FSH κύκλους  $3,8 \pm 0,5$ . Οι βασικές τιμές της LH (μέση τιμή των -15 και 0 λεπτών) ήταν σημαντικά χαμηλότερες στους FSH κύκλους ( $2,2 \pm 0,5$  mIU/ml) απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $5,8 \pm 0,7$  mIU/ml,  $P < 0,001$ ).

Το σχήμα 7 δείχνει τις συγκεντρώσεις των LH, οιστραδιόλης και inhibin σε σχέση με κάθε ώση χορήγησης της GnRH. Η απάντηση της LH υπολογίστηκε ως η αύξηση της LH ( $\Delta LH$ ) πάνω από το βασικό επίπεδο (μηδενικό). Η απάντηση της FSH στην GnRH δεν εκτιμήθηκε στην παρούσα μελέτη λόγω της εξωγενούς χορηγήσεως της FSH. Η μέγιστη τιμή της LH εμφανίστηκε 30 λεπτά μετά από κάθε ώση της GnRH. Η αύξηση της LH ήταν στατιστικώς σημαντική 30 και 60 λεπτά μετά από κάθε ώση, τόσο στους κύκλους-μάρτυρες ( $P < 0,01$ ), όσο και στους FSH κύκλους ( $P < 0,05$ ). Η απάντηση στη 2η δόση της GnRH, ήταν επαυξημένη, σε σχέση με την 1η δόση (αυτοεπαγωγικό φαινόμενο) και στους δυο κύκλους.



**Σχήμα 7:** Η αύξηση των τιμών της LH ( $\Delta$ LH) της E<sub>2</sub> και της inhibin μετά τη χορήγηση 5 διαδοχικών ενδοφλέβιων ώσεων GnRH (10  $\mu$ g) στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης φυσιολογικών κύκλων ( $\square$ ) καθώς και κύκλων χορήγησης FSH ( $\blacklozenge$ ) έξι γυναικών με φυσιολογικούς θυλακιοωορρηκτικούς κύκλους.

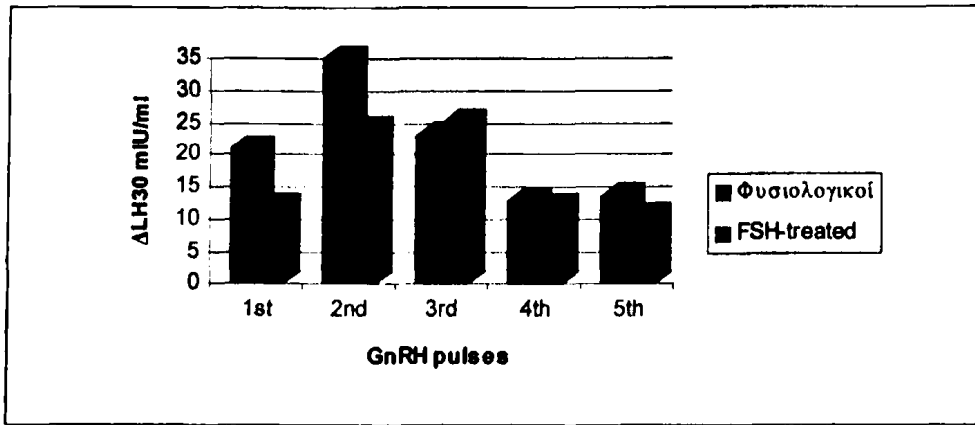
Στους FSH κύκλους, η απάντηση της  $\Delta$ LH στις πρώτες τρεις δόσεις της GnRH ήταν σημαντικά αμβλυμένη σε σχέση με τους κύκλους-μάρτυρες, μέχρι τη στιγμή των πρώτων 5 ωρών ( $P < 0,05$ ). Παρ' όλα αυτά, η απάντηση της  $\Delta$ LH στην 4η και 5η δόση της GnRH ήταν παρόμοια και στους δύο κύκλους. Η απάντηση στην 1η δόση της GnRH στα πρώτα 30 λεπτά (αρχική έκλυση), καθώς και η περιοχή που βρίσκεται κάτω από την καμπύλη της  $\Delta$ LH (στη γραφική παράσταση, συνολική έκλυση), που αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα, την πρώτη και την δεύτερη αποθήκη των γοναδοτροπινών<sup>(123)</sup>, ήταν σημαντικά αμβλυμμένες στους FSH κύκλους ( $12,7 \pm 3,2$  mIU/ml και  $4179 \pm 830$

mlU/ml/6ώρες αντίστοιχα), σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς κύκλους ( $21,0 \pm 3,7$  mlU/ml,  $P < 0,01$  και  $6013 \pm 980$  mlU/ml/6ώρες,  $P < 0,001$ , αντίστοιχα).

Οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης δεν άλλαξαν σημαντικά κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της GnRH (βλέπε σχήμα 7). Όμως, στους FSH κύκλους οι τιμές της οιστραδιόλης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $P < 0,01$ ). Οι τιμές του ορού της ανοσοενεργοποιημένης inhibin ήταν πριν από την 1η χορήγηση της GnRH σημαντικά υψηλότερες στους FSH κύκλους ( $4,6 \pm 1,0$  U/ml) απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες ( $1,5 \pm 0,2$  U/ml,  $P < 0,05$ , βλέπε σχήμα 7). Οι τιμές της inhibin παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της GnRH και στους δυο κύκλους, ενώ ήταν σημαντικά αυξημένες στους FSH κύκλους απ' ό,τι στους κύκλους-μάρτυρες. Μετά από κάθε χορήγηση της GnRH, οι τιμές της οιστραδιόλης και της inhibin έδειξαν μια τάση μικρής αλλά μη σημαντικής αύξησης, στα 30 και 60 λεπτά.

Το σχήμα 8 δείχνει τη μέγιστη απάντηση της LH στα 30 λεπτά μετά από κάθε ώση της GnRH, η οποία υπολογίσθηκε ως η αύξηση, πάνω από το επίπεδο του προηγούμενου δείγματος ( $\Delta LH-30$ ). Και στους δυο κύκλους, η αύξηση της LH μετά την 2η ώση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη απ' ό,τι μετά την πρώτη ώση ( $P < 0,05$ ). Κατόπιν η  $\Delta LH-30$  στους κύκλους-μάρτυρες ελαττώθηκε σταδιακά μέχρι την 4η ώση και παρέμεινε σταθερή από την 4η έως την 5η ώση, ενώ στους FSH κύκλους ελαττώθηκε σημαντικά μόνο από την 2η στην 3η ώση ( $P < 0,05$ ) και δεν άλλαξε σημαντικά από την 3η στην 5η ώση.





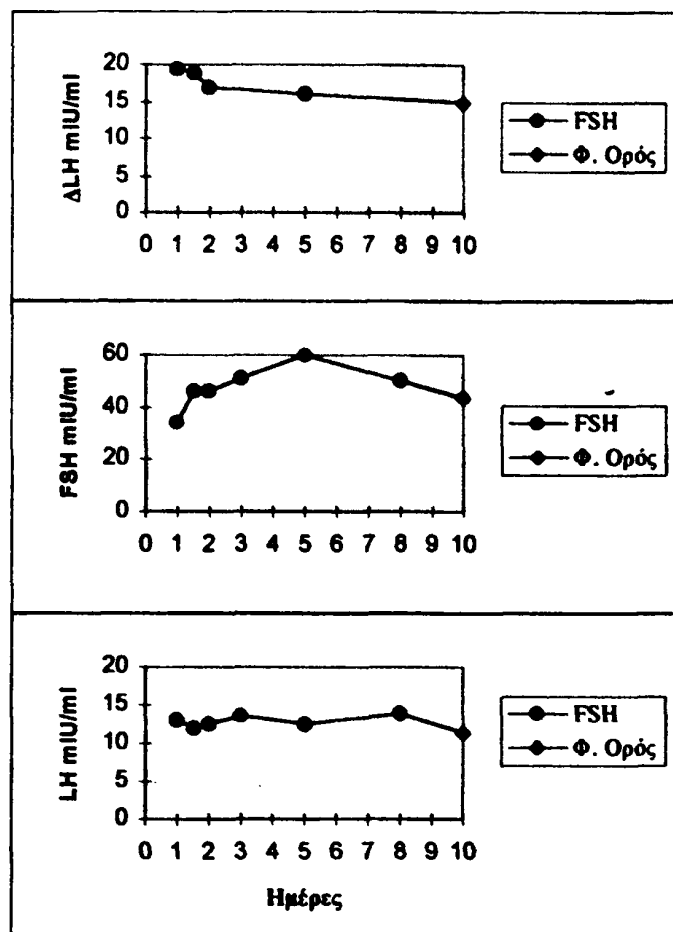
**Σχήμα 8:** Η μέγιστη αύξηση της LH (ΔLH) στα πρώτα 30 λεπτά (ΔLH 30) μετά από την χορήγηση 5 διαδοχικών ενδοφλέβιων ώσεων GnRH (10 μgr) προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης σε φυσιολογικούς κύκλους (□) καθώς και σε κύκλους που χορηγήθηκε FSH (◆) σε έξι γυναίκες με φυσιολογικούς θυλακιοωορρηκτικούς κύκλους.

Παρ' όλα αυτά στους FSH κύκλους, η ΔLH-30 μετά από κάθε μία από τις πρώτες ώσεις ήταν σημαντικά αμβλυμένη, σε σχέση με τους κύκλους-μάρτυρες ( $P < 0,05$ ), ενώ, μετά την 4η και 5η ώση ήταν παρόμοια με αυτή των κύκλων-μαρτύρων (βλέπε σχήμα 8).

#### 4.5.4 Αποτελέσματα της τέταρτης ομάδας

Όπως και στις προηγούμενες ομάδες, οι βασικές τιμές των ορμονών υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή στα -15 και 0 λεπτά. Οι βασικές τιμές για την FSH και την LH πριν την έναρξη της αγωγής την 1<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος ήταν παρόμοιες στις 5 γυναίκες οι οποίες ξεκίνησαν με FSH ( $34,1 \pm 6,8$  και  $13,1 \pm 3,7$  mIU/ml αντίστοιχα) και στις 5 γυναίκες οι οποίες ξεκίνησαν με φυσιολογικό ορό ( $41,4 \pm 8,2$  και  $13,9 \pm 1,8$  mIU/ml αντίστοιχα). Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στον ορό πριν από την έναρξη της αγωγής ήταν χαμηλή σε όλες τις γυναίκες ( $< 50$  pmol/l) και παρέμεινε χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

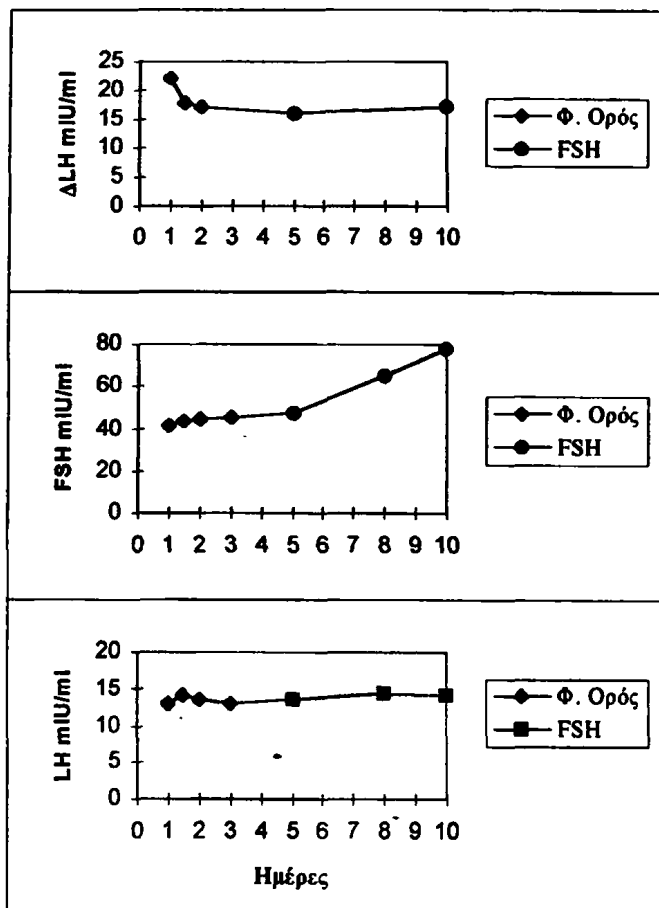
Η απάντηση της LH στην GnRH καθώς και οι βασικές τιμές της FSH και της LH κατά τη διάρκεια της μελέτης στις 5 γυναίκες που ξεκίνησαν με φυσιολογικό ορό (1<sup>η</sup> υποομάδα) και στις 5 γυναίκες που ξεκίνησαν με FSH (2<sup>η</sup> υποομάδα) παρουσιάζονται στα σχήματα 9 και 10 αντίστοιχα. Η απάντηση της LH στην GnRH υπολογίστηκε ως η αύξηση της LH ( $\Delta LH$ ) πάνω από τη βασική τιμή (μηδενικό επίπεδο), ενώ η απάντηση της FSH στη GnRH δεν εκτιμήθηκε λόγω της εξωγενούς χορήγησης της ορμόνης αυτής στις γυναίκες.



**Σχήμα 9:** Η απάντηση της  $\Delta LH$  στην GnRH και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων του πλάσματος των FSH και LH, σε 5 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά τη διάρκεια διαδοχικών χορηγήσεων FSH και φυσιολογικού ορού.

Στις γυναίκες της πρώτης υποομάδας (βλέπε σχήμα 9) οι βασικές τιμές της FSH δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική μεταβολή από την 1<sup>η</sup> ημέρα  $41,4 \pm 8,2$  mIU/ml στην 5<sup>η</sup> ημέρα ( $46,4 \pm 9,5$  mIU/ml). Παρ' όλα αυτά όμως, οι μέσες τιμές

της FSH αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά την 8<sup>η</sup> ημέρα ( $66,9 \pm 14,9$  mIU/ml,  $P < 0,05$ ) και την 10<sup>η</sup> ημέρα ( $81,8 \pm 12,0$  mIU/ml,  $P < 0,01$ , χρησιμοποιώντας τη μέθοδο t-test της σύγκρισης μέσων τιμών κατά ζεύγη) συγκρινόμενες με την 5<sup>η</sup> ημέρα.



**Σχήμα 10:** Η τάση αύξησης της LH ( $\Delta LH 30$ ) πάνω από τα επίπεδα των βασικών τιμών σε απάντηση στην χορήγηση GnRH καθώς και οι βασικές τιμές των συγκεντρώσεων των FSH και LH σε 5 μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες κατά τη διάρκεια διαδοχικών χορηγήσεων φυσιολογικού ορού και FSH.

Στις γυναίκες της 2<sup>ης</sup> υποομάδας (βλέπε σχήμα 10) οι βασικές τιμές της FSH, αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά τις πρώτες 12 ώρες από την έναρξη χορήγησης της FSH ( $47,1 \pm 9,0$  mIU/ml,  $P < 0,05$ ) και περισσότερο την 3<sup>η</sup> ημέρα ( $50,9 \pm 10,9$  mIU/ml,  $P < 0,05$ ) και την 5<sup>η</sup> ημέρα ( $60,0 \pm 9,7$  mIU/ml,

ζεύγη). Στη συνέχεια, οι βασικές τιμές της FSH ελαττώθηκαν στατιστικώς σημαντικά από την 5η στη 10η ημέρα ( $43,5 \pm 12,4$  mIU/ml,  $P < 0,05$ ). Οι τιμές της ΔLH πριν από την έναρξη των ενέσεων κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των γυναικών της πρώτης υποομάδας ( $21,1 \pm 6,4$  mIU/ml, βλέπε σχήμα 9) και των γυναικών της 2ης υποομάδας ( $19,4 \pm 3,3$  mIU/ml, βλέπε σχήμα 10). Και στις δύο υποομάδες, οι ΔLH τιμές έδειξαν μια μικρή ελάττωση (όμως όχι στατιστικά σημαντική) κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών του πειράματος. Στη συνέχεια, οι τιμές της ΔLH δεν άλλαξαν σημαντικά μέχρι το τέλος της μελέτης, παρουσιάζοντας στατιστικώς μη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υποομάδων των γυναικών.

Επίσης, οι βασικές τιμές της LH δεν άλλαξαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της μελέτης και δεν διέφεραν μεταξύ των δύο υποομάδων.

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την πρώτη πειραματική μελέτη, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη προηγούμενων δεδομένων ότι κατά τη διάρκεια χορήγησης FSH, η απάντηση της LH στην GnRH είναι ελαττωμένη, φαινόμενο που οφείλεται στην αύξηση της δραστηριότητας του GnSAF<sup>(125)</sup>.

Στην πρώτη πειραματική μελέτη, χορηγήθηκαν σε φυσιολογικές γυναίκες, διαφορετικές δόσεις FSH, κατά την διάρκεια διαφορετικών εμμηνορρυσιακών κύκλων, με σκοπό την πρόκληση ποικίλλων συγκεντρώσεων FSH στο πλάσμα. Μια φαρμακοδυναμική προσέγγιση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις της FSH στο πλάσμα αυξήθηκαν από κύκλο σε κύκλο, σε σχέση με τη δόση χορήγησης, δηλαδή η απάντηση ήταν δόσοεξαρτώμενη. Παρ' όλο που οι μέγιστες τιμές (peak values) επιτεύχθηκαν σε όλα τα χορηγούμενα σχήματα FSH κατά την 8η και 12η ώρα μετά την χορήγηση της ενέσιμης δόσης, η αύξηση των τιμών της FSH στο πλάσμα που προκλήθηκε κατά την χορήγηση της υψηλότερης δόσης της FSH παρατηρήθηκε νωρίτερα και παρέμεινε υψηλή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν, ότι κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου, η χρονική διάρκεια της παραγωγής του GnSAF μετά από την χορήγηση της FSH είναι δόσοεξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, κατά την χορήγηση μικρών δόσεων FSH (75IU) ανιχνεύτηκε μια σημαντική αύξηση της



δραστικότητας του GnSAF 12 ώρες μετά, δηλ. 4 ώρες μετά την σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH στο πλάσμα. Κατά τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων FSH (225 IU), η αύξηση της συγκέντρωσης της FSH στο πλάσμα παρατηρήθηκε νωρίτερα και η σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του GnSAF ανιχνεύθηκε 8 ώρες από την χορήγηση. Στην συνέχεια παρά την επιπλέον αύξηση της δόσης χορήγησης FSH σε 450 IU, δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση της δραστηριότητας του GnSAF, εκτός από αυτή των 8 ωρών.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει ένα επίπεδο-ουδός (threshold) της FSH, που απαιτεί χρονική περίοδο τουλάχιστον 4 ωρών, έτσι ώστε να προκαλέσει μια σημαντική παραγωγή του GnSAF από τα μικρά κοιλοτικά ωοθυλάκια. Με τη χορήγηση χαμηλών δόσεων FSH, οι συγκεντρώσεις της FSH στο πλάσμα παρέμειναν υψηλές μόνο για μικρή χρονική περίοδο και η απάντηση της LH στην GnRH μετά τις 24 ώρες ήταν παρόμοια με αυτή στους φυσιολογικούς κύκλους. Αντιθέτως κατά τη χορήγηση υψηλών δόσεων FSH, παρατηρήθηκε ό,τι οι συγκεντρώσεις της FSH στο πλάσμα παρέμειναν υψηλές καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, ενώ μια αξιοσημείωτη ελάττωση της απάντησης της LH ήταν ακόμη παρούσα στις 24 ώρες.

Φαίνεται λοιπόν από τα ευρήματα αυτά, ότι το επίπεδο-ουδός της FSH δεν είναι μόνο απαραίτητο για την έναρξη, αλλά και για την συνέχιση της παραγωγής του GnSAF κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση του ανθρώπινου εμμηνορυσιακού κύκλου.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη μια σημαντική αύξηση της οιστραδιόλης του πλάσματος, παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά από τη χορήγηση



υψηλής δόσης FSH (450 IU), ενώ η ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH, εμφανίσθηκε νωρίτερα δηλ. 8 ώρες μετά την ένεση της FSH. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν επιπλέον οι ενδείξεις ότι ο GnSAF είναι μια μη στεροειδική ουσία διαφορετική από την οιστραδιόλη, ενώ η FSH προάγει την παραγωγή και των δυο αυτών ουσιών στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση μέσω διαφορετικών μηχανισμών<sup>(126)</sup>. Είναι φανερό, ότι απαιτούνται υψηλότερα επίπεδα της FSH και πιο παρατεταμένη έκθεση των ωοθηκών σε αυτά, για να προκληθεί αύξηση της οιστραδιόλης παρά για την παραγωγή του GnSAF.

Η παρούσα μελέτη φαίνεται να αποκλείει την πιθανότητα η ελάττωση της μετά χορήγηση GnRH εκλυόμενης LH να σχετίζεται με άμεση κατασταλτική επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης FSH στην υπόφυση, από την στιγμή που οι βασικές τιμές της LH δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των κύκλων-μαρτύρων και των κύκλων FSH. Η πιθανότητα ό,τι η inhibin συμμετέχει στην ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH είναι δύσκολο να αποκλειστεί από in-vivo δεδομένα μόνο.

Από in-vitro μελέτες έχει δειχθεί, ότι η δραστικότητα του GnSAF είναι κατασταλτική στην έκκριση των γοναδοτροπινών και επιπλέον είναι διαφορετική από την inhibin<sup>(112,113)</sup>. Είναι πιθανό η inhibin και ο GnSAF να δρουν συνεργικά στην υπόφυση, αλλά αυτή η υπόθεση χρειάζεται να ερευνηθεί περισσότερο.

Προηγούμενη μελέτη σε γυναίκες, έδειξε μια σημαντική ελάττωση στη βασική συγκέντρωση της LH, μέσα σε δυο ώρες από τη χορήγηση μίας μόνο δόσης FSH<sup>(127)</sup>. Αυτή η μελέτη όμως, δεν περιελάμβανε κύκλους με χορήγηση



placebo για σύγκριση, αλλά η σύγκριση έγινε με γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε hMG.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ελάττωση της βασικής έκκρισης της LH (παρ' όλο που δεν ήταν σημαντική), 2 ώρες μετά τη ένεση της FSH. Όμως, αυτή η ελάττωση δεν συσχετίστηκε με την χορήγηση της FSH από την στιγμή που παρατηρήθηκε και στους κύκλους που χορηγήθηκε placebo. Σημαντική ελάττωση στη συγκέντρωση της LH παρατηρήθηκε όταν οι τιμές της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά (π.χ. στον κύκλο 6). Αυτή η διαπίστωση, ότι δηλαδή η οιστραδιόλη είναι ο κύριος ρυθμιστής της βασικής έκκρισης της LH κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, επιβεβαιώνεται και από προηγούμενες μελέτες<sup>(102)</sup>. Η μικρή ελάττωση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης που παρατηρήθηκε στο πλάσμα, μετά από την έναρξη των πειραμάτων, αντιπροσωπεύει την επίδραση του placebo. Επίσης μπορεί να σχετίζεται με την συνοδευόμενη ελάττωση των τιμών της LH και συνεπώς με την ελάττωση των διαθέσιμων ανδρογόνων.

Η δεύτερη πειραματική μελέτη επιβεβαιώνει ό,τι η σημαντική ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH εμφανίζεται μέσα σε 12 ώρες μετά την εφάπαξ χορήγηση υψηλής δόσης FSH κατά την 2η ημέρα του εμμηνορυσιακού κύκλου. Αυτή η ελάττωση είναι σύμφωνη με τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης και επιβεβαιώνει τον ρόλο της FSH στην παραγωγή του GnSAF. Όπως και στην προηγούμενη μελέτη, η πιθανότητα ό,τι η ελάττωση μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση της οιστραδιόλης, φαίνεται να αποκλείεται, από το γεγονός ό,τι η αύξηση της οιστραδιόλης στο αίμα παρατηρήθηκε μετά από την αύξηση της δραστηριότητας του GnSAF.





Το γεγονός ό,τι η δραστηκότητα του GnSAF μετά την χορήγηση 450 IU FSH, αυξήθηκε για όσο χρόνο αυξήθηκε η στάθμη της FSH στο αίμα δείχνει, ότι υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες η παραγωγή του GnSAF εξαρτάται αποκλειστικά από την FSH. Σε αντίθεση με την απάντηση της LH στη χορήγηση GnRH, οι αλλαγές στις βασικές τιμές των συγκεντρώσεων της LH παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση με τις αλλαγές των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης.

Έτσι, επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της προηγούμενης αλλά και άλλων μελετών, ότι η βασική έκκριση της LH κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση βρίσκεται κάτω από το αρνητικό έλεγχο της οιστραδιόλης<sup>(102)</sup>. Επιπλέον, το γεγονός ότι η βασική έκκριση της LH ελαττώνεται τη στιγμή που η ΔLH αυξάνεται δείχνει, ότι η οιστραδιόλη μπορεί να καταστέλλει τη βασική έκκριση της LH, μέσω μηχανισμού ο οποίος δεν συμπεριλαμβάνει την υποθαλαμική GnRH.

Σημαντική αύξηση της δραστηκότητας του GnSAF επίσης παρατηρήθηκε, όταν η FSH χορηγήθηκε κατά την προχωρημένη ωοθυλακική φάση, δηλαδή μετά την επίδραση των οιστρογόνων στην υπόφυση για περίοδο περίπου 10 ημερών. Η οιστραδιόλη είναι γνωστό, ότι παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH (self priming effect) στην υπόφυση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αναπαραχθεί πειραματικά κατά τη διάρκεια χορήγησης πολλαπλών δόσεων GnRH κατά ώσεις, ενώ αυξημένη απάντηση των γοναδοτροπινών επιτυγχάνεται στην 2η ώση της GnRH, η οποία χορηγείται 2 ώρες μετά την πρώτη ώση<sup>(128,123)</sup>. Το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο ήταν παρόν στην παρούσα μελέτη, αν και η χορήγηση της GnRH



γινόταν κάθε 4 ώρες. Στους κύκλους με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση, κατά τους οποίους η FSH χορηγείται σε ημερήσια βάση, ο GnSAF ελαττώνει την αυτοεπαγωγική δράση της GnRH στην υπόφυση. Η παρούσα μελέτη δείχνει την σημαντική ελάττωση στην έκκριση της LH ως απάντησης στην GnRH, κατά την χορήγηση FSH, ακόμη και όταν έχει προηγηθεί η επίδραση των οιστρογόνων στην υπόφυση. Είναι πιθανό λοιπόν, ό,τι ο GnSAF ασκεί μια ισχυρή ανταγωνιστική επίδραση στην από την οιστραδιόλη αυξανόμενη ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH.

Η έκταση της επίδρασης διαφόρων ωοθηκικών μη στεροειδικών παραγόντων (όπως inhibins, follistatin και activins) στην έκκριση της LH σαν απάντηση στην GnRH, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί in-vivo. Πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις αυτών των ουσιών στη γοναδοτροπική έκκριση προέρχονται κυρίως από in-vitro μελέτες. Επομένως, η φυσιολογική τους σημασία είναι αδιευκρίνιστη<sup>(129)</sup>.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν, ότι η χορήγηση FSH κατά την προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου, προκαλεί ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH, ενώ την ίδια στιγμή η συγκέντρωση της ανοσοδραστικής inhibin δεν μεταβλήθηκε σημαντικά. Αυτό σημαίνει, ότι ο GnSAF είναι μια διαφορετική ουσία από την inhibin. Παρ' όλα αυτά θα πρέπει να σημειωθεί ότι από την συγκεκριμένη μέθοδο, μέτρησης της inhibin μετρούνται επίσης και οι ελεύθερες α-υποομάδες της inhibin. Μέχρι τώρα αρκετές in-vitro μελέτες έχουν δείξει, ότι η δραστηριότητα του GnSAF διαφέρει από αυτή της inhibin και ό,τι μπορεί να ανιχνευθεί στο ελεύθερο στεροειδών ωοθυλακικό υγρό<sup>(112,113,118)</sup>. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και αν ο GnSAF βρεθεί να

είναι παρόμοιος, ή να αποτελεί μέρος του μορίου, μιας από τις μη στεροειδικές ουσίες που παράγουν οι ωθήκες, τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης που αφορούν στην ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH, είναι σημαντικά διότι, παρέχουν ενδείξεις για μία μη στεροειδική “ωθητική δραστηριότητα” η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο στον έλεγχο της γοναδοτροπικής έκκρισης<sup>(130)</sup>.

Τα παραπάνω παρέχουν ισχυρές ενδείξεις, ότι η χορήγηση της FSH ελαττώνει την έκκριση της LH ως απάντηση στην GnRH, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τις ωθήκες. Αυτή η θεωρία υποστηρίζει την GnSAF υπόθεση.

Η παρούσα πειραματική μελέτη παρέχει μια δυναμική εκτίμηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στην GnRH, καθ' όλη τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου. Παρατηρείται, ότι εκτός από μια παροδική ελάττωση την τέταρτη ημέρα, η ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ αυξήθηκε σημαντικά μόνο κατά το μέσο του κύκλου, παρά την σταθερή αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης από την αρχή της ωοθυλακικής φάσης. Η απότομη αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στην GnRH κατά το μέσο του κύκλου έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, παρ' όλων ότι η απάντηση της LH στην GnRH έχει ερευνηθεί μόνο σποραδικά κατά την ωοθυλακική φάση<sup>(123,131)</sup>.

Η ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη. Έχει προταθεί ό,τι, κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου η οιστραδιόλη διατηρεί σε χαμηλά σχετικά επίπεδα την υποφυσιακή ευαισθησία στην GnRH<sup>(132)</sup>. Αυτό στηρίζεται σε πειραματικά δεδομένα, κατά τα οποία η εξωγενής χορήγηση οιστραδιόλης



σε υπογοναδικές γυναίκες προκάλεσε είτε ελάττωση, είτε καμία αλλαγή της υποφυσιακής ευαισθησίας στην GnRH και αύξηση των εφεδρειών των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης<sup>(128)</sup>. Παρ' όλα αυτά, όταν οι τιμές της οιστραδιόλης αυξήθηκαν σημαντικά κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου (μετά από εξωγενή χορήγηση) η ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH αυξήθηκε επίσης σημαντικά<sup>(128)</sup>.

Όμως στην παρούσα μελέτη, η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης της ενδογενούς οιστραδιόλης μετά από τη χορήγηση της FSH δεν συσχετίστηκε με ταυτόχρονες αλλαγές στην υποφυσιακή ευαισθησία. Τα αποτελέσματα αυτά τείνουν να δείξουν, ότι στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου η οιστραδιόλη δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας ρύθμισης της υποφυσιακής ευαισθησίας απέναντι στην GnRH. Είναι πιθανό, ότι ο GnSAF εμπλέκεται επίσης<sup>(133)</sup>.

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση, ότι κατά την αρχόμενη και μεσηωοθυλακική φάση του κύκλου, ο GnSAF διατηρεί την υπόφυση σε κατάσταση χαμηλής απαντητικότητας στην GnRH. Ενώ κατά την περίοδο πριν την ωοθυλακιόρρηξια μία ελάττωση στη δραστικότητα του GnSAF διευκολύνει την θετική επίδραση της οιστραδιόλης, που έχει ως αποτέλεσμα την μέγιστη γοναδοτροπική έκκριση.

Η τρίτη πειραματική μελέτη δείχνει, ότι ο τρόπος της απάντησης της LH στις πολλαπλές ώσεις της GnRH είναι διαφορετικός στους FSH κύκλους απ' ό,τι στους φυσιολογικούς κύκλους. Συγκεκριμένα, μετά από τις δύο πρώτες ώσεις της GnRH, ο τρόπος με τον οποίο η LH απάντησε στις υπόλοιπες ώσεις, έδειξε μία τάση ελάττωσης στους φυσιολογικούς κύκλους και μια

μάλλον σταθερή απάντηση στους FSH κύκλους. Συνεπώς οι αυξήσεις της LH μετά την τέταρτη και πέμπτη ώση ήταν παρόμοιες και στους δύο κύκλους. Η πιθανότητα αυτά τα αποτελέσματα να αντιπροσωπεύουν “εξάντληση” των αποθηκών των γοναδοτροπινών στους φυσιολογικούς κύκλους δεν φαίνεται να ισχύει, γιατί τότε θα περίμενε κανείς μια παρόμοιου βαθμού καταστολή να εμφανιστεί και στους FSH κύκλους. Παρ’ όλο που η ελαττωμένη απάντηση της LH στην GnRH μπορεί να σχετίζεται εν μέρει με κάποιο βαθμό απευαισθητοποίησης προκαλούμενης από την GnRH<sup>(134)</sup>, η αμετάβλητη μορφή της αύξησης της LH από την τέταρτη στην πέμπτη ώση και στους δύο κύκλους δείχνει, ότι η απευαισθητοποίηση δεν είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου τα παρόντα αποτελέσματα θα μπορούσαν να ερμηνευθούν. Είναι πιθανό επομένως, ότι τα αποτελέσματα αυτά αντιπροσωπεύουν αλλαγές στις σχέσεις μεταξύ των ωθηκών και του υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος που προκαλείται λόγω της πολλαπλής χορήγησης των ώσεων της GnRH υπό συνθήκες πολλαπλής ωθυλακικής ωρίμανσης. Μπορεί κανείς να υποθέσει, ότι οι διαδοχικές ώσεις GnRH είναι ικανές να υπερισχύσουν της κατασταλτικής δράσης του GnSAF, αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό γίνεται είναι ακόμη άγνωστος.

Η παρούσα έρευνα παρέχει κάποιες πληροφορίες σ’ αυτό το θέμα. Ούτε η οιστραδιόλη ούτε η inhibin φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό αυτό, από τη στιγμή που οι συγκεντρώσεις των δύο αυτών ουσιών δεν άλλαξαν σημαντικά καθ’ όλη τη διάρκεια της πειραματικής διεργασίας. Η πιθανότητα, ότι οι “υπερφυσιολογικές” συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης προκάλεσαν πιο γρήγορη ανάκαμψη της απάντησης της υπόφυσης στην

GnRH στους FSH κύκλους απ' ό,τι στους φυσιολογικούς είναι μικρή. Τέτοια επίδραση της οιστραδιόλης θα προκαλούσε αύξηση της ευαισθησίας της υπόφυσης στην GnRH μέσω της ανταγωνιστικής της σχέσης με τον GnSAF. Παρ' όλα αυτά, μία προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης δεν είναι ικανές να υπερνικήσουν το κατασταλτικό φαινόμενο κάποιων άγνωστων μέχρι τώρα ωοθηκικών ουσιών, οι οποίες ελέγχουν την εμφάνιση της αιχμής της LH στις γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση<sup>(135)</sup>.

Είναι λογικό λοιπόν, ότι η αλλαγή στη μορφή της απάντησης της LH στις πολλαπλές ώσεις χορήγησης της GnRH κατά τη διάρκεια χορήγησης της FSH, καθορίζεται κυρίως από την ίδια την GnRH παρά από τις ωοθήκες.

Η φυσιολογική σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν είναι ξεκάθαρη. Η δοσολογία της GnRH που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία έχει χαρακτηριστεί ως σχετικά υψηλή και επομένως ο βαθμός στον οποίο αντανακλά τη συγκέντρωση της φυσιολογικής έκκρισης της GnRH είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Αναφέρθηκε ήδη, η υπόθεση, ότι κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου ο GnSAF διατηρεί την υπόφυση σε μια φάση χαμηλής απαντητικότητας στην GnRH και ό,τι η δραστικότητα του GnSAF ελαττώνεται κατά την προ-ωορρηκτική φάση του κύκλου. Επί της βάσης των παρόντων αποτελεσμάτων, η υπόθεση αυτή μπορεί να επεκταθεί περισσότερο, έτσι ώστε να συμπεριλάβει την αντίληψη, ότι η κατασταλτική επίδραση του GnSAF στη μεσοκύκλια έκκριση της LH υπερνικάται από την από των οιστρογόνων προκαλούμενη αύξηση της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη γοναδοτροπική έκκριση<sup>(136)</sup>.



Τα παρόντα αποτελέσματα είναι διαφορετικά από αυτά που προέκυψαν από πειράματα σε ποντίκια χορηγώντας FSH, κατά τα οποία παρατηρήθηκε καθυστέρηση στο αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH (self priming effect) μετά την χορήγηση πολλαπλών δόσεων GnRH<sup>(115)</sup>. Η διαφορά στα αποτελέσματα των δυο μελετών είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αν και σαφώς υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πειραματικών μοντέλων. Η καθυστερημένη γοναδοτροπική απάντηση στην GnRH σε ποντίκια προτάθηκε ως πιθανός μηχανισμός ο οποίος εξηγεί την αναστολή της εκκριτικής αιχμής της LH, κατά την χορήγηση FSH<sup>(115)</sup>. Όμως από τα αποτελέσματα μας προκύπτει, ότι ο GnSAF δεν καθυστερεί την έναρξη αλλά ελαττώνει το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH. Αυτό το εύρημα δείχνει, ότι στις γυναίκες ο GnSAF δεν εμπλέκεται στο χρόνο έναρξης, αλλά στη ρύθμιση του εύρους της εκκριτικής αιχμής της LH κατά τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου.

Στην τέταρτη πειραματική μελέτη τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η εξωγενής χορήγηση FSH σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν επηρεάζει την απάντηση της LH στην GnRH. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα που προέρχονται από πειράματα σε ωθηκεκτομηθέντα ποντίκια και πιθήκους<sup>(115,88)</sup>, στα οποία η εκλούμενη από την GnRH γοναδοτροπική έκκριση δεν καταστέλλεται από την εξωγενή χορήγηση FSH, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά πειραματόζωα (χωρίς ωθηκεκτομή)<sup>(115)</sup>.

Η φαρμακοδυναμική εκτίμηση των αποτελεσμάτων μας δείχνει σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της FSH κατά τη φάση χορήγησής της και επιστροφή στα αρχικά επίπεδα μετά το τέλος του πειράματος. Αυτή η αλλαγή

στην στάθμη της FSH είναι παρόμοια με αυτή που εντοπίστηκε στις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκε FSH, παρ' όλον ότι, οι απόλυτες τιμές των συγκεντρώσεων σ' αυτές τις γυναίκες είναι χαμηλότερες.

Κατά την παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το χρονικό όριο των πέντε ημερών για τη χορήγηση της FSH. Θα μπορούσε να αναρωτηθεί κανείς αν αυτό το χρονικό διάστημα είναι αρκετό για να επιτευχθεί η καταστολή της υποφυσιακής γοναδοτροπικής έκκρισης. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό είναι θετική αφού στις προεμμηνόρρυσιακές γυναίκες η σημαντική ελάττωση της LH, ως απάντηση στην GnRH, εμφανίζεται ακόμη και μετά από εφάπαξ δόση της FSH στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου, όπως φάνηκε στις παραπάνω μελέτες μας. Είναι φανερό λοιπόν, ότι ο παράγοντας ο οποίος ευθύνεται για την ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH κατά τη χορήγηση της FSH παράγεται από τις ωοθήκες, ενώ η εξωγενής χορήγηση FSH αυτή καθ' αυτή δεν ασκεί κατασταλτική επίδραση στις υποφυσιακές γοναδοτροπίνες.

Προηγούμενες μελέτες σε ποντίκια έδειξαν, ότι εκτός από την ύπαρξη ενός μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης από τα ωοθηκικά στεροειδή, υπάρχει και άλλος μηχανισμός που επιδρά μέσα στην ίδια την υπόφυση για τη ρύθμιση της γοναδοτροπικής έκκρισης. Συγκεκριμένα, η ενδοφλέβια χορήγηση LH και FSH είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της έκκρισης των δύο αυτών ορμονών από επίδραση πάνω στην υπόφυση<sup>(137)</sup>. Ακόμη η εξωγενής χορήγηση της LH ανέστειλε την έκκριση της LH ως απάντηση στην GnRH αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην έκκριση της FSH<sup>(138)</sup>.





Στην παρούσα μελέτη, η εξωγενής χορήγηση FSH δεν μπόρεσε να καταστείλει, ούτε τη βασική έκκριση της LH, ούτε την εκλυόμενη από την GnRH, παρ' όλο που η επίδραση στην ίδια την FSH δεν εκτιμήθηκε. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να ερμηνευθούν ότι δείχνουν, πως ένας μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορύθμισης τοπικά μέσα στην υπόφυση δεν είναι σημαντικός για τον έλεγχο της γοναδοτροπικής έκκρισης στις γυναίκες. Παρ' όλα αυτά, η πιθανότητα ότι κάθε μια από τις δύο γοναδοτροπίνες να ρυθμίζει τη δική της έκκριση δεν μπορεί να αποκλειστεί. Εύλογα θα μπορούσε να θεωρήσει κανείς, ότι το παρόν πειραματικό μοντέλο το οποίο χρησιμοποιεί εξωγενή χορήγηση FSH, παρέχει μόνο υποθετικά στοιχεία για τον ρόλο των ενδογενών γοναδοτροπινών στο πλαίσιο ενός τοπικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορύθμισης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι:

- 1) Η χρονική διάρκεια της παραγωγής του GnSAF μετά από τη χορήγηση της FSH είναι δόσοεξαρτώμενη.
- 2) Ο συντομότερος χρόνος κατά τον οποίο παρατηρείται η αύξηση της δραστικότητας του GnSAF είναι 8 ώρες από την ένεση της FSH.
- 3) Το επίπεδο-ουδός της FSH δεν είναι μόνο απαραίτητο για την έναρξη, αλλά και για την συνέχιση της παραγωγής του GnSAF κατά την αρχόμενη ωοθυλακική φάση του ανθρώπινου εμμηνορυσιακού κύκλου.
- 4) Η ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH (αύξηση δραστικότητας GnSAF) εμφανίζεται μετά από την χορήγηση υψηλών δόσεων FSH τόσο κατά την αρχόμενη όσο και κατά την προχωρημένη ωοθυλακική φάση του κύκλου.
- 5) Η ελάττωση αυτή δεν σχετίζεται με τις αλλαγές στα επίπεδα της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης και της inhibin στο αίμα και εξακολουθεί να είναι παρούσα μετά από την επίδραση των οιστρογόνων στην υπόφυση.
- 6) Ο GnSAF είναι μια μη στεροειδική ουσία προερχόμενη από τις ωοθήκες, διαφορετική από την inhibin.
- 7) Ο GnSAF ασκεί ισχυρή ανταγωνιστική επίδραση στην από την οιστραδιόλη αυξανόμενη ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH.
- 8) Κατά τη χορήγηση πολλαπλών διαδοχικών δόσεων GnRH σε γυναίκες (μετά από πρόκληση πολυωοθυλακιόρρηξιας με FSH) η σχέση μεταξύ των



ωοθηκών και του υποθάλαμο-υποφυσιακού συστήματος ως προς την έκκριση της LH καθορίζεται από την GnRH μάλλον παρά από τις ωοθήκες.

9) Κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες η GnRH είναι ικανή να υπερिσχύσει της κατασταλτικής δράσης του GnSAF στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Αυτό μπορεί να αποτελεί μέρος του μηχανισμού που ελέγχει την δράση του GnSAF μεσοκυκλώς.

10) Η εξωγενής χορήγηση FSH σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν επηρεάζει ούτε την βασική έκκριση της LH ούτε την απάντηση της LH στην GnRH.

11) Η FSH δεν παρουσιάζει δραστηριότητα παρόμοια με αυτή του GnSAF, σε σχέση με την ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών.

12) Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας παρέχουν σοβαρές ενδείξεις για την παραγωγή του GnSAF από τις ανθρώπινες ωοθήκες ενός παράγοντα μη στεροειδικού και διαφορετικού από την inhibin, ο οποίος πιθανόν συμμετέχει στη ρύθμιση του εύρους του μεσοκύκλιου γοναδοτροπικού κύματος στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο.

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η διαδικασία με την οποία ο υποθάλαμος και η υπόφυση ρυθμίζουν τη λειτουργία των ωθηκών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και επιτηδευμένη, εμπλέκει πολλές χημικές ουσίες και παράγοντες.

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός παράγοντα που ρυθμίζει το μεσοκύκλιο γοναδοτροφικό κύμα τόσο σε πειραματόζωα, όσο και σε γυναίκες, εμφανίστηκαν στις αρχές του 1980<sup>(88,89,90,91)</sup>. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε Gonadotrophin Surge Attenuating Factor (GnSAF) από τους Messinis και συν. και Gonadotrophin Surge Inhibiting Factor (GnSIF) από τους Hodgen και συν. Μια σειρά *in vivo* και *in vitro* μελετών ερεύνησαν τόσο την βιοδραστικότητα του GnSAF και το πιθανό μηχανισμό δράσης του στον υποθάλαμο-υποφυσιακό σύστημα, όσο και την σύσταση και πιθανή μοριακή του δομή.

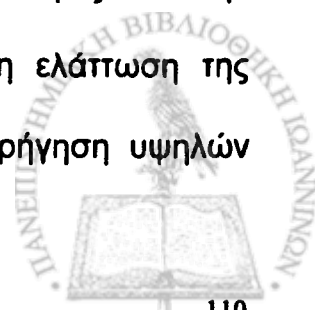
Η παρούσα μελέτη προσπαθεί να δώσει μια δυναμική εκτίμηση της σχέσης του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα και των ωθηκών, όσο αναφορά τον πιθανό μηχανισμό δράσης του GnSAF, καθώς και αλληλεπιδράσεις του με άλλες ορμόνες. Στη μελέτη συμμετείχαν 24 προεμμηνοπαυσιακές και 10 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι πρώτες διαιρέθηκαν σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από 6 γυναίκες οι οποίες μελετήθηκαν σε 4 διαφορετικούς κύκλους στην αρχή της ωθυλακικής φάσης. Στον πρώτο κύκλο χορηγήθηκε placebo (κύκλος P) και στους υπόλοιπους τρεις FSH. (1 αμπούλα, κύκλος 1, 3 αμπούλες, κύκλος 3 και 6 αμπούλες κύκλος). Η



δεύτερη ομάδα περιέλαβε 12 γυναίκες οι οποίες διαιρέθηκαν σε δυο υποομάδες και μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια δυο κύκλων. Στον πρώτο κύκλο χορηγήθηκε placebo, ενώ στο δεύτερο χορηγήθηκε FSH (6 αμπούλες στη πρώτη υποομάδα και 3 στη δεύτερη υποομάδα). Η πρώτη υποομάδα μελετήθηκε στην αρχόμενη ωοθυλακική φάση του κύκλου, ενώ η δεύτερη κατά τη μέση.

Η τρίτη ομάδα περιέλαβε 6 γυναίκες, οι οποίες μελετήθηκαν σε δυο συνεχόμενους κύκλους. Ο πρώτος ήταν ο φυσιολογικός ενώ στο δεύτερο χορηγήθηκε FSH (3 αμπούλες). Η χορήγηση της GnRH σε ποσότητα των 10 μg ενδοφλεβίως εφάπαξ στις δυο πρώτες ομάδες ήταν απαραίτητη για να αναπαραχθεί πειραματικά και να εκτιμηθεί η βιοδραστικότητα του GnSAF και το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH. Στη τρίτη ομάδα η GnRH χορηγήθηκε κατά ώσεις σε πέντε διαδοχικές ενδοφλέβιες δόσεις των 10 μg. Η τέταρτη ομάδα περιέλαβε 10 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Σε όλες χορηγήθηκε για 5 ημέρες φυσιολογικός ορός και 5 ημέρες FSH (3 αμπούλες). Δείγματα αίματος ελήφθησαν για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων της FSH, της LH, της οιστραδιόλης, και της inhibin, σε διάφορες φάσεις της μελέτης πριν και μετά τη χορήγηση της GnRH.

Τα αποτελέσματά μας από τη πρώτη ομάδα δείχνουν ότι η χρονική διάρκεια της παραγωγής του GnSAF μετά από χορήγηση FSH κατά την αρχική ωοθυλακική φάση, είναι δόσοεξαρτώμενη. Ο συντομότερος χρόνος αύξησης της δραστηριότητας του GnSAF παρατηρείται σε 8 ώρες από την ένεση της FSH. Από τη δεύτερη ομάδα προκύπτει ότι η ελάττωση της απάντησης της LH στην GnRH εμφανίζεται μετά από χορήγηση υψηλών



δόσεων FSH και δεν σχετίζεται με τις αλλαγές στα επίπεδα της οιστραδιόλης και της inhibin στο αίμα. Ο GnSAF είναι μια μη στεροειδική ουσία προερχόμενη από τις ωθήκες διαφορετική από την inhibin και ασκεί ανταγωνιστική επίδραση στην οιστρογονικά αυξανόμενη ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH. Κατά τη χορήγηση πολλαπλών διαδοχικών δόσεων GnRH στη τρίτη ομάδα η σχέση μεταξύ των ωθηκών και του υποθάλαμο-υποφυσιακού συστήματος ως προς την έκκριση της LH φαίνεται να καθορίζεται από την GnRH παρά από τις ωθήκες. Η GnRH είναι ικανή να υπερισχύσει της κατασταλτικής δράσης του GnSAF στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Η εξωγενής χορήγηση FSH σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν επηρεάζει ούτε την βασική έκκριση της LH ούτε την απάντησή της. Η FSH δεν παρουσιάζει παρόμοια δραστηριότητα με τον GnSAF, ως προς τη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών.

Συμπερασματικά τα δεδομένα της παρούσης εργασίας παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για την παραγωγή του GnSAF από τις ανθρώπινες ωθήκες. Ο GnSAF είναι ένας μη στεροειδικός παράγοντας διαφορετικός από την inhibin ο οποίος συμμετέχει (πιθανά) στη ρύθμιση του εύρους του μεσοκύκλιου γοναδοτροπικού κύματος του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου.

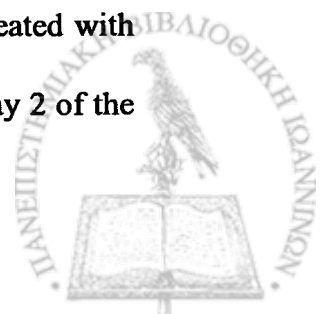
The following information was obtained from the records of the  
Department of the Interior, Bureau of Land Management, and  
the United States Geological Survey, and is being furnished  
to you for your information. It is to be understood that  
this information is being furnished to you for your  
information only and is not to be used for any other  
purpose without the express written consent of the  
Bureau of Land Management. The information is being  
furnished to you for your information only and is not  
to be used for any other purpose without the express  
written consent of the Bureau of Land Management.

## SUMMARY

The mechanism that is involved in regulation and function of the reproductive system is sophisticated and rather complicated. In the beginning of 1980 a new factor has been found to be involved with the regulation of gonadotrophin secretion and especially of LH. This factor was inhibiting the LH surge in animal studies<sup>(88,89)</sup>. Further studies in women after ovarian stimulation using hMG<sup>(90)</sup>, or FSH<sup>(91)</sup>, reproduced similar results. The difference was that instead of inhibition of LH surge a significant attenuation was noted. This factor named Gonadotrophin Surge Inhibiting Factor or GnSIF by Hodgen et al. (1982) and Gonadotrophin Surge Attenuating Factor or GnSAF by Messinis et al. (1990).

The present study confirms previous data that during treatment with FSH the response of LH to GnRH is markedly reduced thus suggesting an increase in activity of GnSAF. We have recruited a total of 34 women of whom 24 were pre-menopausal normally ovulating with long-standing unexplained infertility and 10 healthy post-menopausal women in the period from 1991 to 1994. The first 24 women were divided into 3 groups. The first group included 6 women and who were investigated in four cycles, i.e. a spontaneous cycle treated with placebo and three cycles treated with different FSH doses (1 ampoule, cycle 1, 3 ampoules, cycle 3 and 6 ampoules cycle 6).

The second group of 12 normally ovulating women was divided into two groups and investigated during two cycles. A cycle treated with placebo and a cycle treated with FSH. In group 1 (n=6) placebo or FSH (6 ampoules) was injected i.m. on day 2 of the





cycle. In group 2 (n=6) placebo or FSH (3 ampoules) was injected on the day on which the dominant follicle was 14-15mm in diameter. The response of LH to an i.v. injection of 10 µg GnRH (GnSAF bioactivity) was investigated 4, 8, 12 and 24 hours after the injection of placebo or FSH for the first and the second group.

The third group included 6 women investigated in two cycles, a spontaneous and a FSH treated cycle. The response of the pituitary to five consecutive pulses of GnRH was investigated in the late follicular phase of both cycles. GnRH pulses, 10 µg each, were injected i.v. every 2 hours and LH was measured in blood samples taken before and 30, 60 and 120 min after each pulse.

The fourth group included 10 healthy post-menopausal women which were treated with FSH (3 ampoules) for 5 days and normal saline for another 5 days. The two regimens were given consecutively in a 10 day experiment. The response of LH to an i.v. injection of 10 µg GnRH was investigated twice on day 1 and once on days 2, 5 and 10 of the experiment.

The results of the first group suggest that GnSAF bioactivity increases significantly as early as 8 hours from a single injection of FSH before any significant increase in serum estradiol values. We conclude that in women the effect of FSH on the production of GnSAF in early follicular phase is concentration dependent. The results of the second group suggest that GnSAF is a nonsteroidal ovarian substance, different from inhibin, the production of which is dependent on FSH and which exerts potent antagonistic effects on the estradiol-induced self-priming action of GnRH. However, the results of the third group demonstrate that multiple submaximal doses of GnRH can override the attenuating effect of GnSAF on LH secretion. From a physiological point of view, this is possibly part of the mechanism which controls the

action of GnSAF at mid-cycle. Finally, the results from the fourth group demonstrate that in post-menopausal women the response of LH to GnRH is not affected by exogenous FSH. It is suggested that exogenous FSH does not show activities on gonadotrophin secretion similar to those ascribed to a gonadotrophin surge attenuating factor.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

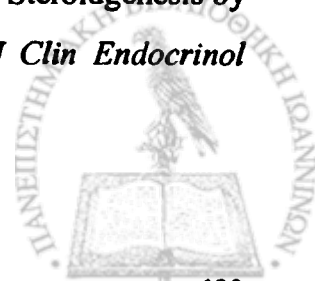
1. Kendrick KM, Dixson AF. Luteinizing hormone releasing hormone enhances proceptivity in a primate. *Neuroendocrinology* 1985; 41: 449.
2. Chard T. & Lilford R. *Basic Sciences for Obstetrics and Gynaecology*. (3rd edition) 1990 London: Springer.
3. De Swiet M & Chamberlain J. *Basic Sciences in Obstetrics and Gynaecology*. 1992 Endinburgh: Churchill Livingstone.
4. Hayflick JS, Adelman JP, Seeburg PH. The complete nucleotide sequence of the human gonadotrophin-releasing hormone gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6403.
5. Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe JR. Origins of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev* 1993; 14: 241.
6. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynaecology, Endocrinology and Infertility*. Baltimore: Williams & Wilbins, 1994.
7. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origins of Luteinizing hormone-releasing neurones. *Nature* 1989; 338:161.
8. Ronnekleiv OK, Resko JA. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurones in early fetal development of rhesus macaques. *Endocrinology* 1990; 126: 498.
9. Bick D, Franco B, Sherin RJ, Heye B, Pike L, Crawford J, Maddalena A, Incerti B, Pragliola A, Meitinger T, Ballabio A. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *New Engl J Med* 1992; 326: 1752.
10. Harelin J-P, Levilliers J, Young J, Pholsena M, Legovis R, Kirk J, Bouloux P, Petit C, Schaison G. Xp22.3 deletions in isolated familial Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 827.



11. Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E. On the sites of the negative and positive feedback actions of oestradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1978; **102**: 1008.
12. Knobil E. The neuroendocrine control of the control the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1980; **36**: 53.
13. Van Vugt DA, Diefenbach WP, Ferin M. Gonadotropin-releasing hormone pulses in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: correlation with luteinizing hormone pulses. *Endocrinology* 1985; **117**: 1550.
14. Pieper DR, Gala RR, Regiami SR, Marshall JC. Dependence of pituitary gonadotrophin releasing hormone (GnRH) receptors on GnRH secretion from the hypothalamus. *Endocrinology* 1982; **110**: 749.
15. Rabin, D and McNeil LW. Pituitary and gonadal desensitization after continuous luteinizing hormone-releasing hormone infusion in normal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **62**: 479.
16. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynaecology, Endocrinology and Infertility*. Baltimore: Williams & Wilbins, 1994.
17. Gilman AG. Guanine nucleotide-binding regulatory proteins and dual control of adenylate cyclose. *J Clin Invest* 1984; **73**: 1.
18. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS, Receptor-effector competing by G-proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr Rev* 1992; **13**: 536.
19. Anderson AN, Hagen C, Lange P, Boesgaard S, Djursing H, Eldrup E, Micic S. Dopaminergic regulation of gonadotrophin levels and pulsatiety in normal women. *Fertie Steril* 1987; **47**: 391.
20. Rasmussen DD, Lin JH, Wolf PL, Yen SSC. Gonadotrophin-releasing hormone neurosecretion in the human hypothalamus: in vitro regulation by dopamine. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **62**: 479.

21. Sahu A, Phelps CP, White JD, Crowley WR, Kalra SP, Kalra PS. Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology* 1992; **130**: 3331.
22. Kaye WH, Berretini W, Gwirtsman H, George DT. Altered cerebrospinal fluid neuropeptide-Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa, *Arch Gen Psychiatry* 1990; **47**: 548.
23. McShane TM, May T, Miner JL, Keisler DH, Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction, *Biol Reprod* 1992; **46**: 1151.
24. Rabinovici J, Rothman P, Monroe SE, Nerenberg C, Jaffe RB. Endocrine effects and pharmacokinetic characteristics of a potent new gonadotropin-releasing hormone antagonist (Ganirelix) with minimal histamine-releasing properties: studies in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**:1220.
25. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical Gynaecology, Endocrinology and Infertility, Baltimore: Williams & Wilbins, 1994.
26. Mais V, Kazer RR, Cetal NS, Rivier J, Vale W, Yen SSC. The dependency of folliculogenesis and corpus luteum function on pulsatile gonadotropin secretion in cycling women using a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a probe. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **62**: 1250.
27. Knobie E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1980; **36**: 53.
28. Ferin M, Rosenblatt H, Carmel PW, Antunes JL, Van de Wiele RL. Oestrogen-induced gonadotropin surges in female rhesus monkeys after pituitary stalk section. *Endocrinology* 1979; **104**: 50.
29. Yen SSC, Lein A. The apparent paradox of the negative and positive feedback control system on gonadotropin secretion. *Am J Obstet Gynecol* 1976; **126**: 942.
30. Beitins R, Padmanabhan V. Bioactive follicle-stimulating hormone. *Trends Endocrinol Metab* 1991; **2**: 145.

31. Adams TE, Norma RL, Spies HG. Gonadotrophin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in oestradiol-primed monkeys. *Science* 1981; 213: 1388.
32. Moore K. *Essentials of Human Embryology*. 1998 Toronto: BC Dencker Inc.
33. Peters H, Byskov AG, Himelstein-Graw R, Faber M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 1975; 45:559.
34. Lapolt PS, Tilly JL, Aihara T, Nishimori K, Hsueh AJ. Gonadotropin-induced-up and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chronic gonadotropin, and recombinant FSH, *Endocrinology* 1992; 130:1289.
35. Erickson GF. An analysis of follicle development of ovum maturation. *Seminars Reprod Endocrinol* 1989; 4: 223.
36. Rasmussen DD, Lin JH, Wolf PL, Yen SSC. Gonadotrophin-releasing hormone neurosecretion in the human hypothalamus: in vitro regulation by dopamine. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:479.
37. Jameson JL, Becker CB, Lindell CM, Habener JF. Human follicle-stimulating hormone  $\beta$ -subunit encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 806.
38. Chabab A, Hedon B, Arnal F, Diafouka F, Bressot N, Flandre O, Cristol P. Follicular steroids in relation to oocyte development and human ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod* 1986; 1: 449.
39. McNatty K P, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. The production of progesterone, androgens, and oestrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49: 687.
40. McNatty K P, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. Steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1286.



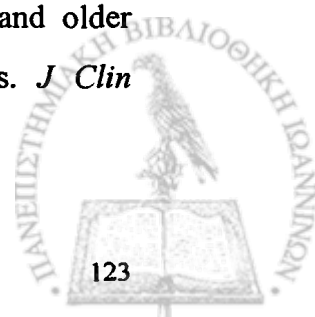
41. Kobayashi M, Nakano R, Ooshima A. Immunohistochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the two cells two gonadotrophins hypothesis of steroidogenesis in the human ovary. *J Endocrinol* 1990; **126**: 483.
42. Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovary follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res* 37 (Suppl 1) 1992; 5.
43. Magoffin DA. Regulation of differentiated functions in ovarian theca cells. *Seminars Reprod Endocrinol* 1991; **9**: 321.
44. Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE. Gonadotrophin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotrophin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; **109**: 356.
45. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992; **131**: 254.
46. Jia JL, Hsueh A J W. Homologous regulation of hormone receptors: luteinizing hormone increases its own receptors in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1984; **115**: 2433.
47. Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJW. Autocrine role of oestrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Boil Reprod* 1985; **32**: 1038.
48. Knecht M, Brodie AMH, Catt KJ. Aromatase inhibitors prevent granulosa cell differentiation: an obligatory role for oestrogens in luteinizing hormone receptor expression. *Endocrinology* 1985; **117**: 1156.
49. Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follostatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; **131**: 1009.
50. Chappel SC, Resko JA, Norman RL, Spies HG. Studies on Rhesus monkeys on the site where oestrogen inhibits gonadotrophins: delivery of 17-estradiol to the hypothalamus and pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **52**: 1.

51. Wildt L, Hutchinson JS, Marshall G, Pohl CR, Knobil E. On the site of action of progesterone in the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1981; **109**: 1293.
52. Young JR, Jaffe RB. Strength-duration characteristics of oestrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women: II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; **42**: 432.
53. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WFJr. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **62**: 1136.
54. Rossmanith WG, Laughlin GA, Mortola JF, Johnson ML, Veldhuis JD, Yen SSC. Pulsatile cosecretion of oestradiol and progesterone by the midluteal phase corpus luteum: temporal link to luteinizing hormone pulses. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **70**: 990.
55. Evans WS, Sollenberger MJ, Booth RAJr, Rogol AD, Urban RJ, Carlsen EC, Johnson ML, Veldhuis JD. Contemporary aspects of discrete peak-detection algorithms. II. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in women. *Endocr Rev* 1992; **13**: 81.
56. Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley UF. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **74**: 600.
57. Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG, Yen SSC. Dynamic changes in circulating inhibin in women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 1033.
58. Messinis IE, Lolis D, Papastergiopoulou L, Milingos S, Tsaahalina E, Seferiadis K, Templeton AA. Effect of FSH treatment on the pituitary response to LHRH in postmenopausal women. *Human Reprod* 1996; **9**: 241.
59. Nippold TB, Reame NE, Kelch RP, Marshall JC. The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 67.

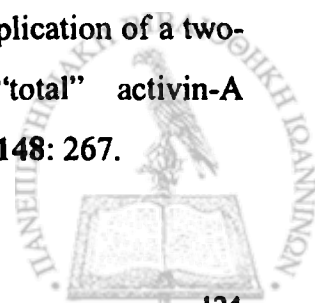




60. Maruncic M, Casper RF. The effect of luteal phase oestrogen antagonism on luteinizing hormone pulsatility and luteal function in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **64**: 148.
61. Laatikainen T, Raisanen I, Tulenheimo A, Salminen K. Plasma  $\beta$ -endorphin and the menstrual cycle. *Fertil Steril* 1985; **44**: 206.
62. Wehrenberg WB, Wardlow SL, Frantz AG, Ferin M.  $\beta$ -Endorphin in hypophyseal portal blood: variations throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1982; **111**: 879.
63. Mortola JF, Laughlin GA, Yen SSC. A circadian rhythm of serum follicle-stimulating hormone in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**: 861.
64. Massagne J. The transforming growth factor beta family. *Ann Rev Cell Biol* 1990; **6**: 597.
65. Kingley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: new members new receptors and new genetic tests of function in different agonisms. *Genes Dev* 1994; **8**: 133.
66. Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 1986; **234**: 205.
67. Matzuk MM, Finegold MJ, Su J-G J, Hsueh AJW, Bradley A.  $\alpha$ -inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; **360**: 313.
68. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, De Kretser DM. Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **65**: 954.
69. Buckler HM, Healy DL, Burger HG. Purified FSH stimulates inhibin production from the human body. *J Endocrinology* 1989; **122**: 279.
70. Illingworth P J, Reddi K, Smith K B, Baird D T, The source of inhibin secretion during the human menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **73**: 667.
71. Lenton EA, De Koccher DM, Woodward AJ, Robertson DM. Inhibin concentrations throughout the menstrual cycles of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **73**: 1180.

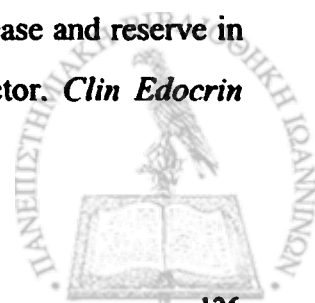


72. Groome N, O'Brian M. Preparation and application of monoclonal antibodies to inhibin and its subunits. *Frontiers in Endocrinology*, Rome: Ares Serono; 1994, 33.
73. Farnworth PG, Wang Q-F, Findlay JK, Robertson DM, De Krestler DM, Burger HG. The mechanism of action of inhibin in *Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders* (Melmed S & Robbins R J, editors), Blackwell Scientific Publications, Boston: 1991, pp 129.
74. Ling N, Ying S, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$ -subunits from the two form of inhibin. *Nature* 1986; **321**: 779.
75. Braden T D, Conn P M. Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 1992; **130**: 2101.
76. Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; **131**: 1009.
77. Hillier SG, Miro F. Inhibin, activin and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Ann NY Acad Sci* 1993; **687**: 29.
78. Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GG, Mather JP. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 1990; **127**: 3196.
79. Miro F, Smyth CD, Hillier SG. Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 3388.
80. Illingworth PJ, Groome NP, Duncan WC. Measurement of circulating inhibin forms, during the establishment of pregnancy. *J Clin Endocr Metab* 1996; **81**: 1471.
81. Petraglia F, Sawchenko P, Lim ATW, Riner LJ, Vole W. Localisation, secretion and action of inhibin in human placenta. *Science* 1987; **237**: 187.
82. Kninght PG, Muttakrishna S, Groome NP. Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of "total" activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *J Endocrinol* 1996; **148**: 267.



83. De Kretser DM, Foulds LM, Hancock M, Robertson DM. Partial characterisation of inhibin, activin and follistatin in the term human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 502.
84. Petraglia F, De Vita D, Gallinelli A, Aguzzali L, Genazzani AR, Romero R, Woodruff TK. Abnormal concentration of maternal serum activin-A in gestational diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 558.
85. Qu J & Thomas K. Inhibin and activin production in human placenta. *Endocrin Rev* 1995; **16**: 485.
86. Kettel LH, Delalo LV, Morales AJ, Apker D, Ling N, Yen SC. Circulating levels of follistatin from puberty to menopause. *Fertility & Sterility* 1996; **65**: 472.
87. Wallace EH & Healy DL. Inhibins and activins; role in clinical practice. *Br J Obst Gynaecol* 1996; **103**: 945.
88. Schenken RS, Hodgen GD. FSH induced ovarian hyperstimulation in monkeys: blockade of the LH surge. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; **57**: 50.
89. Littman BA & Hodgen GD. Human menopausal gonadotrophin stimulation in monkeys: blockade of the LH surge by a highly transient ovarian factor. *Fertility & Sterility* 1984; **41**: 440.
90. Ferrarietti AP, Gracia JE, Acosta AA, Jones G. Serum LH during ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilisation in normally menstruating women. *Fertility & Sterility* 1983; **40**: 742.
91. Messinis IE, Templeton AA. The effect of pulsatile FSH on the endogenous luteinizing hormone surge in women. *Clin Endocrinol* 1986; **25**: 633.
92. Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertility & Sterility* 1982; **32**: 281.
93. Messinis IE, Templeton AA, Bird DT. Endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with sequential use of clomiphene and pulsatile human menopausal gonadotropin. *J Clin Endocrinol* 1985; **61**: 1076.
94. Messinis IE & Templeton AA. Blockage of the positive feedback effect of oestradiol during prolonged administration of clomiphene citrate to normal women. *Clin Endocrinol* 1988; **29**: 509.

95. Templeton AA, Messinis IE, Baird DT. Characteristics of ovarian follicles in spontaneous and stimulating cycles in which there was endogenous LH surge. *Fertility & Sterility* 1986; 46: 1113.
96. Messinis IE, Templeton AA. Endocrine and follicle characteristics of cycles with and without endogenous luteinizing hormone surges during superovulation induction with pulsatile FSH. *Hum Reprod* 1987; 2:11.
97. Messinis IE, Templeton AA, Baird DT. Relationship between the characteristics of endogenous LH surge and the degree of ovarian hyperstimulation during superovulation induction in women. *Clin Endocrin* 1986; 25: 394.
98. Messinis IE, Templeton AA. Effect of high dose exogenous oestrogen on mid cycle LH surge in human spontaneous cycles. *Clin Endocrin* 1989; 27:453.
99. Messinis IE, Templeton AA. Effects of supraphysiological concentration of progesterone on the characteristics of the oestradiol- induced gonadotrophin surge in women. *J Reprod Fert* 1990; 88: 513.
100. Geiger JM, Plas-Roser S, Avon CL. Mechanisms of ovulation in female rats treated with FSH at the beginning of oestrous cycle; changes in pituitary responsiveness to LHRH. *Biol Reprod* 1980; 22: 837.
101. Sopolak VM & Hodgen GD. Blockade of the oestrogen- induced LH surge in monkeys: a nonsteroidal antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertility & Sterility* 1984; 41: 108.
102. Messinis IE, Templeton AA. Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. *J Reprod Fert* 1989; 87: 633.
103. Messinis IE, Templeton AA. In-vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor. *Clin Endocrin* 1990; 33: 213.
104. Messinis IE, Templeton AA. Superovulation induction in women suppresses LH secretion of the pituitary level. *Clin Endocrin* 1990; 32: 107.
105. Messinis IE, Templeton AA. Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulating women by gonadotrophin surge attenuating factor. *Clin Endocrin* 1991; 34: 259.



106. Lagase L, Labrie F, Lorenzen J, Schwartz NB, Channing CP. Selective inhibitory effect of porcine follicular fluid on follicle stimulating hormone secretion in anterior pituitary cells in culture. *Clin Endocrin* 1979; **10**: 401.
107. Huang EJ, Miller WL. Porcine ovarian inhibin preparations sensitize cultured urine gonadotropes to LHRH. *Endocrinology* 1984; **115**: 513.
108. Danforth DR, Sinosich MJ, Anderson TL, Cheng UY, Bardin CW, Hodgen GO. Identification of gonadotrophin surge-inhibiting factor (GnSIF) in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol Reprod* 1987; **47**: 1075.
109. Tsonis CG, McNeil AS, Baird DT. Measurement of exogenous and endogenous inhibin in sheep serum, using a new and externally sensitive bioassay for inhibin based on inhibition of ovine pituitary FSH secretion in vitro. *J Endocr* 1986; **110**: 341.
110. Fowler PA, Messinis IE, Templeton AA. Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotropin surge attenuating factor from human follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1990; **90**: 587.
111. Farnworth DG, Robertson DM, de Kretser DM, Burger H. The effects of 31KDa bovine inhibin on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: antagonisms of GnRH and busserelin. *J Endocr* 1988; **119**: 233.
112. Busbridge N, Chamberlain GVP, Griffiths A, Whitehead SA. Nonsteroidal follicular factors attenuate the self-priming action of gonadotrophin-releasing hormone on the pituitary gonadotrophin. *Neuroendocrinology* 1990; **41**: 493.
113. Fowler PA, Messinis IE, Templeton AA. Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. *J Reprod Fert* 1990; **90**: 587.
114. De Koning J, Tijssen AMI, van Rens GP. The self-priming action of LHRH increases the low pituitary LH and FSH response caused by ovarian factors: observations in vitro. *J Endocrinol* 1989; **110**: 439.
115. Koppelaar DW, Tijssen AM, van Dieën JAMG, de Koning J. The self-priming

- action of LHRH is under negative FSH control through a factor released by the ovary: observations in female rats in vitro. *J Endocrinol* 1991; **129**: 205.
116. Fowler PA, Townsend C, Messinis IE, Cunningham P, Templeton AA. GnSAF attenuates in-vitro LH secretion induced by GnRH from cultured ovine pituitary cells only during the breeding season. *J Endocrine* 1992; **135**: 221.
117. Koppenaal DW, Tijssen AM, de Koning J. The effect of GnSiF on the self-priming action of GnRH in female rats in vitro. *J Endocrinol* 1992; **134**: 427.
118. Knight PG, Lacey M, Peter JLT, Whitehead SA. Demonstration of a nonsteroidal factor in human follicular fluid that attenuates the self-priming action of GnRH on pituitary gonadotropes. *Biol Reprod* 1990; **42**: 613.
119. Fowler PA, Messinis IE, Cunningham P, Fraser M, Templeton AA. Effects of GnSAF on the two pools of GnRH-induced LH secretion. *Hum Reprod* 1993; **8**: 822.
120. Fowler PA, Cunningham P, Fraser M et al. Circulating GnSAF from superovulating women suppresses in-vitro GnRH self-priming. *J Endocrinol* 1994; **143**: 45.
121. Byrne B, Fowler PA, Templeton AA. GnSAF reduces progesterone augmentation of urine GnRH-induced LH secretion. *Biol Reprod* 1995; **52**: 86.
122. Byrne B, Fowler PA, Templeton AA. Role of progesterone and non-steroidal ovarian factors in regulating GnRH self-priming in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **426**.
123. Wang CF, Lasley BL, Lein A, Yen SSC. The functional changes of the pituitary gonadotrophins during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; **42**: 718.
124. Messinis I E, Templeton AA. Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulating women by gonadotrophin surge attenuating factor. *Clin Edocrin* 1991; **34**: 259.
125. Messinis IE, Templeton AA. Evidence that GnSAF exists in man. *J Reprod & Fert* 1991; **92**: 217.



126. Messinis IE, Hirsch P, Templeton AA. Follicle stimulating hormone stimulates the production of GnSAF in vivo. *Clin Endocr* 1991; **35**: 403.
127. Anderson RE, Cragg JM, Chang RJ, Stanczyk FZ, Lobo RA. A pharmacodynamic comparison of human urinary FSH and hMG in normal women and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1989; **52**: 216.
128. Laseley BL, Wang CF, Yen SSC. The effects of oestrogen and progesterone on the functional changes of the gonadotrophins. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; **41**: 820.
129. Burger HG. Inhibin. *Reprod Medic Rev* 1992; **1**: 1.
130. Messinis IE, Lolis D, Papastergiopoulou L, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Templeton AA. Effect of FSH treatment on the pituitary response to LHRH in postmenopausal women. *Human Reprod* 1996; **9**: 241.
131. Yen SSC, Lein A. The apparent paradox of the negative and positive feedback central system on gonadotropin secretion. *Am J Obstet Gynaecol* 1976; **126**: 942.
132. Hoff JD, Lasley BL, Wang CF, Yen SSC. The two pools of pituitary gonadotrophin; regulation during the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 1977; **44**: 302.
133. Messinis I E, Lolis D, Papadopoulos L et al. Effect of varying concentrations of follicle stimulating hormone on the production of gonadotropin surge attenuating factor (GnSAF) in women. *Clin Endocrin* 1993; **39**: 45.
134. Lambalt CB, Shoemaker J, van Rees GP, de Koning J, van Dielen HAMJ. Exogenous versus endogenous pulses of LHRH and secretion patterns of gonadotrophins. *Fertil Steril* 1991; **56**: 446.
135. Messinis IE, Mademtzis I, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Tsolas O, Templeton AA. Positive feedback effect of oestradiol in superovulated women. *Hum Reprod* 1992; **7**: 469.
136. Miyake A, Tasaka K, Sakamoto T, Kawamura Y, Aono T. Oestrogen induces the release of LHRH in normal cycling women. *J Clin Endocr Metab* 1983; **56**: 1100.

137. Patritti-Laborde N, Wolfsen AR, Heber D, Odell WD. Pituitary gland: site of shortloop feedback for luteinizing hormone in rabbit. *J Clin Invest* 1979; **64**: 1066.
138. Patritti-Laborde N, Asch RH, Panerstein CJ, Odell WD. Prevention of the postovulatory LH surge by ultrashort feedback control. *Fertil Steril* 1982; **38**: 349.