

PRO-ÖSTRUS EVRESİNDEKİ RATLARDA SERUM GONADOTROPİN HORMONLARI İLE β -ENDORFİN SEKRESYON PROFİLLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Selahattin KUMRU, Ekrem SAPMAZ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.06.2000

Investigation of Relationship Between Serum Beta Endorphine and Gonadotropic Hormones Levels Secretion Profiles In Pro-Oestrus Rats

SUMMARY

Beta endorphine levels are high in subjects like athletes who are involved in intense physical activity and in hypothalamic amenorrhea cases. Additionally, levels of β -endorphine in hypophyseal portal system are found to be varied in different phases of oestrus cycles. With the lights of these knowledges in the present study we aimed to investigate the relationship between serum Luteinizing Hormone (LH), Follicle Stimulating Hormone (FSH) and β -endorphine levels in serum at the day of pro-oestrus. For this purpose total of 22 Wistar albino rats were decapitated at 09.00 am (n=7), 11.00 am (n=8) and 13.00 pm (n=7) and LH, FSH and β -endorphine levels in the serum was determined. One Way ANOVA (MINITAB for Windows) was used for statistical analysis of the data. The serum β -endorphine levels of groups sacrificed at 09.00am, 11.00 am and 13.00 pm was 8.90 ± 4.91 , 10.27 ± 7.8 and 3.27 ± 2.66 fg/ml, respectively; the LH levels of groups was 0.34 ± 0.04 , 0.34 ± 0.03 and 0.40 ± 0.04 ng/ml respectively, and the FSH levels was 4.20 ± 0.71 , 4.44 ± 0.34 ve 4.21 ± 0.27 ng/ml respectively. It was found that β -endorphine levels was significantly reduced at 13.00 compared to those sacrificed at 09.00 am ($p<0.05$) and in LH there was a modest increase that was not statistically significant. There was no difference between the FSH levels. It was concluded that decreased opioid activity might be contributing to the pro-oestrus LH surge secretion and FSH is under the control of other factor(s).

Key words: β -endorphine, FSH, LH surge, Pro-östrus, ,

ÖZET

Atletizm gibi ağır sporlarla uğraşan sporcularda ve yoğun stres altındaki hipotalamik amenore vakalarında β -endorfin düzeyleri yüksek bulunmaktadır. Ayrıca östrus siklusunun farklı dönemlerinde hipofizeal portal sistemdeki β -endorfin düzeyleri de farklı bulunmaktadır. Bu bilgilerin ışığında, mevcut çalışma ratlarda pro-östrus günü serum Luteinizing Hormon (LH), Folikül Stimülant Hormon (FSH) ve β -endorfin düzeyleri arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek amacıyla planlandı. Bu amaçla pro-östrus safhasındaki yedi, sekiz ve yedi rattan oluşan toplam yirmi iki Wistar albino rat saat 09.00, 11.00 ve 13.00'de dekapite edilerek öldürüldükten sonra serumlarında β -endorfin, LH ve FSH tayinleri yapıldı. Verilerin istatistiksel analizinde One Way ANOVA (MINITAB for Windows) programı kullanıldı. Saat 09.00, 11.00 ve 13.00 gruplarının serum β -endorfin değerleri sırasıyla 8.90 ± 4.91 , 10.27 ± 7.8 ve 3.27 ± 2.66 fg/ml; LH değerleri sırasıyla 0.34 ± 0.04 , 0.34 ± 0.03 ve 0.40 ± 0.04 ; FSH değerleri de sırayla 4.20 ± 0.71 , 4.44 ± 0.34 ve 4.21 ± 0.27 ng/ml bulundu.

Sabah 09.00'dan öğleden sonra 13.00'e doğru serum β -endorfin düzeyleri anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), LH'da istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artma eğilimi saptandı. FSH'da ise herhangi bir değişim izlenemedi

Sonuç: Azalan opioid aktivitenin pro-östrus LH surge sekresyonuna katkıda bulunduğu, FSH'nın ise başka faktör yada faktörlerin kontrolünde olabileceği şeklinde değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Pro-östrus, β -endorfin, LH surge, FSH.

GİRİŞ

Atletizm başta olmak üzere yüksek efor gerektiren dallarda uğraşan sporcularda, kaslardaki faaliyet artışına bağlı olarak organizmada β -endorfin konsantrasyonlarında artış meydana geldiği bildirilmiştir (1). Bu endorfin artışının Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) sekresyonlarında önemli ölçüde düşmeye neden olarak atletlerde sıkça görülen amenorenin önemli sebeplerinden birini oluşturduğuna inanılmaktadır (2). Hipotalamik amenore vakalarında da plazma Luteinizan Hormon (LH) seviyeleri oldukça düşük bulunurken, buna beyinde artan bir endojen opioid aktivitesi eşlik etmekte, LH sekresyonları da sık ve düşük amplitüdü olmaktadır (3,4). Böyle durumlarda dışarıdan verilen naloksan ile opioidlerin gonadotropinler üzerindeki supressif etkileri tersine çevrilerek başarılı sonuçlar alınabildiği bildirilmiştir (4,5).

Endojen Opioid peptidler (EOP) ile GnRH, LH ve Folikül Stümülan Hormon (FSH) arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek için pek çok çalışma yapılmıştır. EOP'leri içeren nöronlar hipotalamusun Median Preoptik Area, Arcuat Nucleus, dorsal ve ventral medial çekirdekler ile ME bölgelerinde, GnRH nöronları ile sinaps yaparlar (6,7). Bu nöronlar taşıdıkları steroid hormon reseptörleri sayesinde aldıkları mesajları GnRH nöronlarına iletirler (8). Böylece β -endorfinlerin ve diğer EOP'lerin LH salınımını hipotalamik düzeyde GnRH'yı etkilemek suretiyle inhibe ettikleri ve hipofiz bezine direk etkilerinin olmadığı bildirilmiştir (9,10). Hipofiz ön lobunun opioid reseptörleri yönünden fakir olduğunun da bildirilmesiyle (11), EOP'lerin LH salınımını hipotalamik düzeyde etkilediği fikri ağırlık kazanmıştır.

Akut ve kronik morfin uygulanması GnRH salgılanmasını ve buna bağlı olarak da ovulasyonu engelleyebilmektedir (12,13). Benzer şekilde hem morfin hem de β -endorfin pro-östrusta kullanıldığında pre-ovulatuvar LH surge salınımını ve bunun sonucunda ovulasyonu bloke edebilmektedir (14). Üçüncü ventrikül içine β -endorfin ya da dinorfin anti-serumlarının infüze

edilmesi plazma LH düzeylerini artırabilmektedir (15).

Çeşitli grupların yaptığı çalışmalarda, naloksanın GnRH salınımı üzerindeki opioidlerjik inhibisyonu engelleyebildiği ve ratlarda bu ajanın kullanımının GnRH sekresyonu artışı ile birlikteliği gösterilmiştir (16,17,18). Pro-östrus günü sabahı naloksan uygulanması, opioidlerjik inhibitör etkiyi engelleyerek LH salınımını artırabilmektedir (17).

Östrus siklusu boyunca FSH sekresyon profili izlendiğinde bazal ve surge şeklinde iki türlü salınım paterninin olduğu belirtilmiştir; surge salınımı pro-östrus öğleden sonrasında östrus sabahına kadar olan dönemde görülür, östrus siklusunun diğer dönemlerinde de bazal FSH salınımı mevcuttur (19). Bazı yazarlar FSH sekresyonunun Luteinizan Hormon Releasing Hormon (LHRH)'dan farklı bir Folikül Stümülan Hormon Releasing Faktör (FSHRH) tarafından kontrol edildiğini varsayarken (20), bazıları da bazal FSH sekresyonlarının LHRH'dan farklı faktörler tarafından kontrol edildiğini ancak yükselmiş FSH salgıları için LHRH'nın gerekli olduğunu belirtmekte (21) olup konu henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

Hipotalamusun β -endorfin içeriği diurnal ritm şeklinde değişmekte, geceleri belirgin artma göstermekte ve bu artış gece siklusunun karanlık fazının supresyonu ile ortadan kaldırılabilmektedir (22). Östrus siklusunun farklı dönemlerinde hipofizeal portal sistemdeki β -endorfin düzeyleri de farklıdır (23). Pro-östrus sabahında ve öğleden sonrasında plazma β -endorfin seviyeleri minimal düzeylerde bulunmuştur (10). Yine de pro-östrus günü öğleden sonrasında β -endorfin düzeyleri en düşük değerlerde olduğuna göre sabahleyin yüksek olabileceği akla gelmektedir (23).

Ratlarda pro-östrus günü pre-ovulatuvar LH surge eğrisini başlatılmasında EOP'lerden en güçlü peptid olduğu düşünülen β -endorfin ile LH ve FSH'nın plazma düzeylerindeki değişiklikleri ve aralarındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek amacıyla planlandı.

MATERYAL METOT

Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenmesi

Araştırma, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Araştırmalar Ünitesi'nden temin edilen 200-250 gr. ağırlığında toplam 22 adet Wistar-Albino cinsi düzenli siklus gösteren dişi rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar otomatik olarak çalışan (12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) bir aydınlatma ve sabit ısı ($21\pm 1^\circ\text{C}$) ortamında barındırıldı, standart rat yemi ve su ile beslendi.

Deneylerde kullanılan ratların östrus siklusu evrelerinin belirlenmesi amacıyla her gün sabah 8.30-10.00 saatleri arasında vaginal smear örneklerindeki hücrelerin morfolojik özellikleri ışık mikroskobu (10X) ile incelendi. Smear histolojisine göre pro-östrus safhasında oldukları tespit edilen ratlar saat 09.00, 11.00 ve 13.00 da yedi, sekiz ve yedi rattan oluşan üç grup halinde (toplam 22 rat) dekapitasyonla öldürülerek kan örnekleri alındı. $+4^\circ\text{C}$ 'da 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek serumları ayrıştırıldı ve ölçümler yapılmaya kadar -80°C 'da saklandı. Elde edilen serumlarda β -endorfin, LH ve FSH düzeyleri Radioimmüno Assay (RIA) metoduyla belirlendi.

β -endorfin Ölçümleri

β -endorfin tayinleri Dr.Gabor B. Makara ve ekibi tarafından, (Institute of Experimental Medicine Budapest HUNGARY) Chiago Üniversitesi Psikiyatri Bölümünde üretilen ve met-enkefalin, leu-enkefalin, α -endorfin ya da τ -endorfin ile cross-reaksiyona girmeyen ancak β -lipoprotein 30% ile karışma gösteren β -endorfin antikorunu (Chiago IL) kullanılarak RIA ile gerçekleştirildi (24)

LH ve FSH Ölçümleri

LH ve FSH analizleri National Hormone and Pituitary Program of NIDDK (Baltimore, Maryland, USA) tarafından üretilen reagentler yardımıyla RIA ile gerçekleştirildi. Hem LH, hem de FSH'ya karşı kullanılan antijenler iyot-125 (IMS 30, Amerham Life Science Ltd, Bucks, UK) ile chloramine-T prosedürüne benzer modifiye bir yöntemle gerçekleştirildi (25).

İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesi One- Way ANOVA (MINITAB for windows) ile yapıldı. $p<0.05$ ve altındaki istatistik sonuçları anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Saat 09.00 Grubu:

Hayvanların serum β -endorfin düzeyleri (ortalama \pm standart hata) 8.90 ± 4.91 fg/ml iken LH seviyeleri 0.34 ± 0.04 , FSH düzeyleri de 4.20 ± 0.71 ng/ml olarak bulundu.

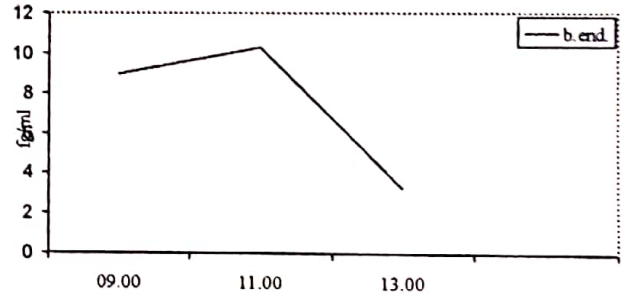
Saat 11.00 Grubu:

Hayvanların serum β -endorfin düzeyleri (ortalama \pm standart hata) 10.27 ± 7.8 fg/ml iken LH seviyeleri 0.34 ± 0.03 , FSH düzeyleri de 4.44 ± 0.34 ng/ml olarak bulundu.

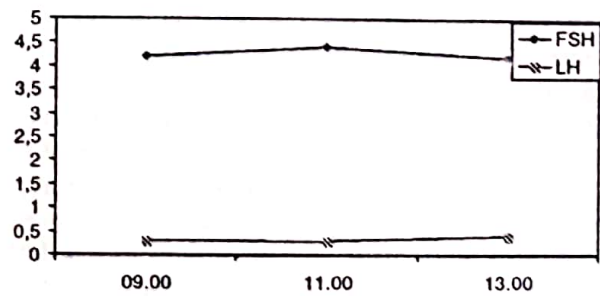
Saat 13.00 Grubu:

Hayvanların serum β -endorfin düzeyleri (ortalama \pm standart hata) 3.27 ± 2.66 fg/ml iken LH seviyeleri 0.40 ± 0.04 , FSH düzeyleri de 4.21 ± 0.27 ng/ml olarak bulundu.

Ratların serum β -endorfin değerleri şekil 1'de, LH ve FSH değerleri şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil.1. Hayvanların saat 09.00, 11.00 ve 13.00'da β -endorfin (b.end) değerleri (fg/ml). Saat 13.00 grubunda saat 09.00 grubuna göre β -endorfin değerlerinde anlamlı azalma mevcuttu ($p<0.05$; One-Way ANOVA).



Şekil. 2. Pro-östrus günü sabah 09.00 ile öğleden sonra 13.00 saatleri arasında serum LH ve FSH düzeylerindeki değişimler. LH ve FSH düzeylerindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte saat 13.00'de LH'nun hafif artma eğilimine girdiği gözlemlendi. ($p>0.05$, One Way ANOVA).

TARTIŞMA

LH surge sekresyonunun beklendiği pro-östrus gününde ratların serumlarında sabah 09.00'dan öğleden sonra 13.00 saatlerine doğru β -endorfin düzeyleri anlamlı olarak azalırken LH düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artma eğilimi gösterdiği tespit edildi. β -endorfin düzeylerinde düşme görülürken LH seviyelerinde artma eğiliminin olması EOP'lerin LH sekresyonu üzerine inhibitör etkilerinin olabileceği ve bu inhibitör etkinin ortadan kalkması ile ovulasyonu tetikleyen LH surge salınımının başlamış olabileceği şeklinde değerlendirildi. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Lieberman ve ark. da pre-ovulatuvar opioid tonusteki azalmanın LH surge sekresyonuna izin verdiğini bildirmişlerdir (26).

Literatürde EOP'lerin GnRH ve buna bağlı olarak da LH salınımı üzerindeki inhibitör etkilerinin mevcut olduğu ve bu etkilerinin yaşa ve menstrüel siklusun dönemine bağlı olarak değiştiği yönünde bilgiler içermektedir (27,28). Bir opioid reseptör antagonisti olan naloksan menstrüel siklusun perioovulatuvar ve luteal fazında plazma LH düzeyini artırabildiği halde, foliküler dönemde artıramamıştır (29). Yine benzer şekilde naloksan verilmesi hem puberte öncesi hem de post-menapozal dönemde LH düzeylerini yükseltmede başarılı olamamıştır (30). Bu çalışmalara ek olarak dişi ratlarda ovariyektomi uygulayarak ya da ovariyektomi yapılmış hayvanlara ovarium steroidleri enjekte edilerek yapılan çalışmalar EOP'lerin GnRH salınımına ve bu yolla LH salınımına etkilerinin gonadal steroidlere son derece bağımlı olduğunu göstermektedir (31).

Pro-östrus sabahından öğleden sonrasına doğru saat 09.00 ve 13.00 serum β -endorfin ve FSH değerleri karşılaştırıldığında serum β -endorfin düzeylerinde azalma olurken, FSH seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığını gözledik. Makalenin giriş kısmında kısaca anlatıldığı gibi östrus siklusu boyunca FSH'nın bazal ve surge şeklinde iki türlü salınım paterninin olduğu belirtilmektedir; surge salınımı pro-östrus öğleden sonrasından östrus sabahına kadar olan dönemde; bazal salınım da siklusun diğer dönemlerinde görülmektedir (19). Literatürde EOP'lerin LH surge sekresyonunun beklendiği pro-östrus gününde LH ve FSH salınımları üzerine inhibitör etkilerinin olduğu ve bu inhibisyonun

opioid reseptör antagonistleri ile ortadan kaldırılabileceğini bildiren yayınlar olduğu gibi (32,33,34). LH üzerine inhibitör etkileri olduğu halde FSH için böyle etkilerinin olmadığından da bahsedilmektedir. (35) Biz bulgularımızı FSH salınımının LH salınımından farklı bir hormon tarafından kontrol edildiği şeklinde değerlendirdik. Bizim değerlendirmemize benzer şekilde FSH salınımının LH salınımından farklı bir hormon tarafından kontrol edildiği görüşüne ilgi devam etmektedir (20). Pro-östrus günü öğleden sonrasında LH surge sekresyonunun başladığı kritik dönemde FSH surge salınımının başlatılması için luteinizing hormon releasing hormon (LHRH)'nın gerekli olabileceği gösterilmiştir, ancak GnRH antagonistleri verilmesine rağmen geç pro-östrus ile östrus sabahı arasındaki yükselmiş FSH düzeylerinin devam ettiğinin görülmesi nedeniyle bu dönemde yükselmiş FSH düzeylerinin devamı için LHRH aktivasyonun gerekmediği düşünülmüştür (36). Burada overden salınan inhibin azalması (37), gonadal steroid miktarı değişiklikleri (38) ya da FSH salınımını etkileyen merkezi sinir sistemi FSH oto feed-back mekanizmalarının mevcut olabileceğinden bahsedilmektedir (39,38,40).

Pro-östrus gününün sabahından öğleden sonrasına doğru serum β -endorfin ve LH düzeylerinde değişiklik olduğu halde FSH düzeylerinde değişiklik olmaması Estienne ve ark bildirdiği gibi (41) FSH salınımının opioid inhibisyonundan etkilenmemesinden kaynaklanmış olabileceği gibi pituitar FSH sekresyon değişimlerinin periferik dolaşıma yansımamasından da kaynaklanmış olabilir. Zira GnRH pulsları ile hipofizeal portal kandaki FSH konsantrasyonları arasında %93 oranında korelasyon olduğu halde, periferik kandaki FSH konsantrasyonları ile korelasyon çok daha düşük bulunmaktadır (36).

Sonuç olarak pro-östrus günü sabahındaki β -endorfin düzeylerinin öğleden sonra azaldığı görüldü. Bu opioid aktivite azalmasının LH surge sekresyonunun başlamasına katkıda bulunabileceği ve LH salınımı üzerine EOP'lerin inhibitör etkilerinin olabileceği şeklinde yorumlandı. LH seviyelerinde farklılıklar izlediğimiz halde FSH'da gruplar arasında fark olmaması FSH salınımının LH'dan farklı faktörün veya faktörlerin kontrolünde olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Heitkamp H.C, Schulz H, Rucker K. and Dickhuth H.H. Endurance training in females: changes in beta-endorphin and ACTH. *Int J Sports Med* 1998; 19: 260-264.
2. Cumming D.C, Wheeler G.D Opioids in exercise physiology. In: *Seminars in reproductive endocrinology*. Thieme Med Pub. London, Vol. 5, pp. 171-179. 1987; 178-182.
3. Harber V J Sutton JR, MacDougall J D, et al. Plasma concentrations of beta-endorphin in trained eumenorrheic and amenorrheic women. *Fertil Steril* 1997; 67: 648-653.
4. Genazzani A D, Petraglia, F, Fabbri G, et al. Evidence of luteinizing hormone secretion in hypothalamic amenorrhea associated with weight loss. *Fertil and Steril* 1990; 54: 222-226.
5. Petraglia, F D' Ambrogio, G, Comitini, G, et al. Impairment of opioid control of luteinizing hormone secretion in menstrual disorders. *Fertil. Steril* 1985; 43: 535-540.
6. Leranth N J, MacLusky, N.J, Shanabrough M, Naftolin F, Catecholaminergic innervation of luteinising hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurones in the medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 591-602.
7. Kordon C, Drouva, SV, de la Escalera, G M. and Weiner, R.I. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinising hormone and prolactin. In *The Physiology of Reproduction* Eds. Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press Ltd. New York 1994; 1621-1681.
8. Bicknel RJ. Endogenous opioids peptides and hypothalamic neuroendocrine neurons. *J Endocrinol* 1985; 107: 437-446.
9. Parnet P, Lenoir V, Palkovits M, Kerdelhue, B. Estrous cycle variations in gonadotropin-releasing hormone, substans P and beta-endorphin contents in the median eminence, the arcuate nucleus and the medial preoptic nucleus in the rat: a detailed analysis of proestrous changes. *J Neuroendocrinol* 1990; 2: 291-296.
10. Khachaturian H, Lewis ME, Schafer M K H, Watson S J. Anatomy of the CNS opioid systems. *TINS* 1985; 8: 111-119.
11. Barraclough CA, Sawyer C H. Inhibition of the release of pituitary ovulatory hormone in the rat by morphine. *Endocrinology* 1955; 57: 329-337.
12. Mehmanesh H, Almedia O.F.X, Nikolarakis KE, Herz A. Hypothalamic LH-RH release after acute and chronic treatment with morphine studied in a combined in vivo/in vitro model. *Brain Res*, 1988; 451: 69-76.
13. Leadem, C A, Yagenova SV. Effects of spesific activation of Mu-, Delta- and Kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1987; 45: 109-117.
14. Schultz R, Wilhelm A, Pirke KM. et al. Endorphin and dynorphin control serum luteinising hormone level in immature female rats. *Nature* 1981; 294: 757-759.
15. Piva F, Maggi R, Limonta P. et al. Effects of naloxone on luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in the different phases of estrous cycle. *Endocrinology* 1985; 117: 766-772.
16. Allen LG, Kalra S.P. Evidence that a decrease in opioid tone may evoke preovulatory luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology*, 1986; 118: 2375-2381.
17. Brown CH, Gilmore DP, Kalia V, et al. Dose-dependent opioid modulation of the pre-ovulatory luteinising hormone surge in the rat. Mediating by catecholamines. *Biogenic Amines* 1994; 10: 119-128.
18. Noguchi J, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S. Supression of basal secretion of FSH inhibits follicular development and maturation during the oestrus cycle of rat. *J Endocrinol*, 1993; 139: 287-293.
19. McCann S.M, Kimura M, Walczewska A, et al. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines and leptin. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 333-334.
20. Culler MD, Negro-Vila R A. Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 1986; 118: 609-612.
21. Genazzani AR, Criscuolo M, Bergamashi M, et al. Daily photoperiod and beta-endorphin concentrations in MBH and pituitary gland. In *Pineal Research, Fundamentals and Clinics*, Eds. Trentini, G.P. DeGaetani, C. And Pevet, P. Raven Press, New York 1987; 271-275.
22. Sarkar DK, Yen SSC, Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. *Endocrinology* 1985; 108: 862-867.
23. Barna I, Koenig JI. Effects of mediobasal hypothalamic lesion on immunoreactive ACTH/ β -endorphin levels in cerebrospinal fluid, in discrete brain regions, in plasma and in pituitary of the rat. *Brain Res*. 1992; 593: 69-76.
24. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ^{125}I -labelled human growth hormone of high spesific activity. *Biochem J* 1963; 89: 114-123.
25. Lieberman PB, Woods JH, Young EA The role of endogenous opioids in the luteinizing hormone surge in rats: studies with clozapine, a long-lasting opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1998; 352: 73-79.

26. Bhanot R, Wilkinson M. Opiaterjik control of gonadotropin secretion during puberty in the rat: a neurochemical basis for the hypothalamic gonadostat? *J Clin. Endocrinol Metab* 1983; 113: 596-598.
27. Petraglia F, Bernasconi S, Lughetti L, et al. a. Naloxone-induced luteinizing hormone secretion in normal, precocious and delayed puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 63: 1112.
28. Petraglia F, Porro C, Facchinetti F, et al. b. Opioid control of LH secretion in humans: menstrual cycle, menopause and aging reduce effect of naloxone but not of morphine. *Life Sci.* 1986; 38: 2103-2110.
29. Petraglia F, D'Ambrogio G, Comitini G, et al. Impairment of opioid control of luteinizing hormone secretion in menstrual disorders. *Fertil. Steril.* 1985; 43: 535-540.
30. Kalra SP, Mandatory neuropeptide-steroid signalling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endoc Rev*, 1993; 14: 507-538
31. Muraki, T. Tokunaga, Y. and Makino, T. Effects of morphine and naloxone on serum LH, FSH and prolactin levels and on hypothalamic content of LH-RF in proestrous rats. *Endocrinol Jpn*; 1977; 24: 313-315
32. Muraki T, Nakadate H, Tokunaga Y. et al. Effect of narcotic analgesics and naloxone on proestrous surges of LH, FSH and prolactin in rats. *Neuroendocrinology* 1979; 28: 241-247
33. Fulghesu AM, Lanzone A, Apa R, et al. The hypothalamic-pituitary-luteal axis in women: effects of long-term orally active opioid antagonist naltrexone administration. *J Endocrinol Invest* ; 1997; 20: 368-373
34. Estienne MJ, Kesner JS, Barb CR, et al. Gonadotropin and prolactin secretion following intraventricular administration of morphine in gilts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 193: 92-97
35. Padmanabhan V, McFadden K, Mauger TD, et al. Neuroendocrine control of follicle stimulating hormone FSH secretion. I. Direct evidence for separate episodic and basal components of FSH secretion. *Endocrinology*, 1997; 138: 424-431.
36. Schwartz NB, Channing CP, Evidence of ovarian 'inhibin' suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels on proestrus rats by injection of porcine follicle fluid. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1977; 74: 5721
37. Chappel SC, Ulloa-Aguirre, Coutifaris C, Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrinol* 1983; 4: 179-211.
38. Blake CA, Kelch RP. Administration of antiluteinizing-hormone-releasing hormone serum to rats: Effects on periovulatory secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrinol*, 1981; 109: 2176-2179.
39. Coutifaris, C. and Chappel, S.C. Intraventricular injection of follicle stimulating hormone FSH during proestrus stimulates the rise in serum FSH on estrus in phenobarbital-treated hamsters through a central nervous system dependent mechanism. *Endocrinology*. 1982; 110: 105-113.
40. Estienne MJ, Kesner JS, Barb CR. et al. Gonadotropin and prolactin secretion following intraventricular administration of morphine in gilts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 193: 92-97.