

Chapter 12

Samenvatting en conclusies

De pulsatieve vrijstelling van groeihormoon (GH) door de voorkwab van de hypofyse wordt vooral gestuurd door de wisselwerking van de hypothalamische hormonen GH-releasing hormoon (GHRH) en somatostatine (SS). Het GHRH stimuleert en SS remt de afgifte van GH (Tannenbaum en Ling, 1984). Daarnaast wordt de hypofysaire GH-secretie beïnvloed door de negatieve terugkoppeling van de insuline-achtige groeifactor-I (IGF-I) (Voss et al., 2000) en van circulerend GH (Conway et al., 1985; Lanzi en Tannenbaum, 1992). De amplitude en de frequentie van GH pulsen zijn afhankelijk van veel factoren, waaronder leeftijd, voeding, lichaamssamenstelling, lichamelijke activiteit, en verscheidene andere hormonen (Hartman, 2000).

In 1999 werd ghreline ontdekt, een peptide dat vooral in de maag wordt geproduceerd. Het bestaat uit 28 aminozuren en bevordert de afgifte van GH via de GH-secretagoog receptor type 1a (Kojima et al., 1999). Eerder was al vastgesteld dat deze receptor specifiek de werking medieert van een groep synthetische GH-afgifte bevorderende peptiden en niet-peptiden, zoals GH-releasing peptide-6, hexareline, en MK-0677 (Momany et al., 1981; Momany et al., 1984; Bowers, 1993). Ghreline heeft naast de sterke GH-vrijstellende werking ook andere eigenschappen zoals bevordering van de eetlust, controle van de energiebalans, controle van de maagmotiliteit, en beïnvloeding van het glucosemetabolisme. Voor een overzicht van de regulatie van de secretie van het hypofysaire GH, en van de verscheidene endocriene en niet-endocriene functies van synthetische GH-secretagogen en ghreline wordt de lezer verwezen naar **hoofdstuk 2** van dit proefschrift.

Verscheidene pathologische (bv. vetzucht en hypercortisolisme) en niet-pathologische (bv. veroudering) veranderingen bij de mens gaan gepaard met een verminderde hypofysaire GH vrijstelling (Casanueva, 1992; Leal-Cerro et al., 1994). In **hoofdstuk 3** worden de effecten van chronische glucocorticoïd-overmaat op het plasma GH-profiel beschreven bij de hond. Alhoewel ook bij honden met hypofyse-afhankelijk hyperadrenocorticisme (HAH) GH in pulsen werd afgegeven, was er sprake van een afname van de afgifte van GH per puls. De basale plasma GH-concentratie veranderde niet.

Chronische overproductie van cortisol gaat bij de mens niet alleen gepaard met een afname van de hypofysaire GH-secretie maar ook met een verminderde GH-respons op diverse stimuli (Casanueva, 1992; Leal-Cerro et al., 1994). Zelfs de gecombineerde toediening van GHRH en GHRP-6, dat een sterke stimulus is voor GH-secretie, veroorzaakt geen significante stijging van de plasma GH-concentratie bij mensen met het syndroom van Cushing (Leal-Cerro et al., 1994). De resultaten van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 4** laten ook zien dat, vergeleken met gezonde honden van vergelijkbare leeftijd, toediening van

GHRP-6 leidt tot een verminderde GH-respons bij honden met HAH. De ghreline-geïnduceerde GH-vrijstelling bij honden met HAH was ook laag maar niet significant verschillend van de GH-vrijstelling bij gezonde honden.

De afgenomen pulsatiele secretie van GH bij honden met HAH zou een gevolg kunnen zijn van veranderingen in de aansturing van de hypofyse. Een toename van de hypothalamische afgifte van SS (Wehrenberg et al., 1990; Lima et al., 1993; Wajchenberg et al., 1996; Terzolo et al., 2000), een afname van de hypothalamische aanmaak en afgifte van GHRH (Miell et al., 1991; Senaris et al., 1996; Ohya et al., 1997), of een combinatie van beide (Leal-Cerro et al., 1998) zouden de verminderde pulsatiele hypofysaire GH-afgifte kunnen verklaren. Naast hun effect op de hypothalamus, zouden glucocorticoïden ook een rechtstreekse invloed op de groeihormoonproducerende cellen van de hypofyse kunnen uitoefenen (Leal-Cerro et al., 1994). Zoals reeds eerder vermeld, leidt chronische cortisol-overmaat tot verminderde responsiviteit van GH op stimulantia zoals GHRH (Peterson en Altszuler, 1981; Wehrenberg et al., 1983; Hotta et al., 1988; Burguera et al., 1990; Voltz et al., 1995; Meij et al., 1997; Ohya et al., 1997; Watson et al., 2000). Daarnaast is ook gepostuleerd dat het 'post-receptor'-systeem van de GHRH-receptor minder goed functioneert indien de groeihormoonproducerende cellen gedurende lange tijd worden blootgesteld aan hoge doses dexamethason (Ohya et al., 1997). De hierboven beschreven afname van de hypothalamische afgifte van GHRH zou kunnen leiden tot minder gevoelige groeihormoonproducerende cellen, en daarmee tot een afname van de aanmaak en secretie van GH, alsook een afgenomen responsiviteit op toegediend GHRH (Thakore en Dinan, 1994). Tenslotte, bij jonge ratten is aangetoond dat toediening van glucocorticoïden het aantal groeihormoonproducerende cellen in de hypofyse vermindert (Niimi et al., 1993).

Typische lichamelijke kenmerken van HAH bij de hond zijn vetzucht en een toegenomen buikomvang (Rijnberk, 1996). Aangezien niet alleen chronisch hypercortisolisme maar ook vetzucht gepaard gaat met een verminderde GH-respons op GH-stimulantia (Bowers, 1993) kan de gedachte opkomen dat de onderdrukte GH-vrijstelling bij het syndroom van Cushing ook veroorzaakt wordt door vetzucht. In tegenstelling tot de situatie bij chronisch hypercortisolisme (Leal-Cerro et al., 1994), leidt intraveneuze toediening van GHRH en GHRP-6 bij zwaarlijvige personen echter wel tot een toegenomen GH-respons (Bowers, 1993). Dit impliceert dat de verminderde GH-respons bij het syndroom van Cushing niet alleen kan worden verklaard door vetzucht.

Bij een groot aantal zoogdieren nemen de basale en gestimuleerde GH-vrijstelling, alsook de circulerende IGF-I-concentraties af met de leeftijd (Finkelstein et al., 1972;

Rudman, 1985; Zadik et al., 1985; Corpas et al., 1992; Wilshire et al., 1995; Muller et al., 2002; Lee et al., 2004). Gegevens over leeftijdsgebonden verschillen in de gestimuleerde GH-vrijstelling bij de hond zijn echter nauwelijks voorhanden. De resultaten van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** laten zien dat er ook bij honden leeftijdsgebonden verschillen zijn met betrekking tot de GH-respons op intraveneus toegediende GH-secretagogen. Bij zowel jonge als oude honden veroorzaakt toediening van ghreline, in vergelijking met 0.9 % NaCl, een significante toename in de plasma GH-concentraties. Bij jonge honden is ghreline een sterkere stimulus voor GH-secretie dan GHRH en GHRP-6. Bij oude honden echter, is GHRH-toediening een sterkere stimulus voor GH-vrijstelling dan de toediening van ghreline of GHRP-6. Er zijn ook interessante diersoortgebonden verschillen. Bij de rat is de vrijstelling van ghreline-geïnduceerd GH vergelijkbaar met die na GHRH-toediening (Kojima et al., 1999), terwijl bij de mens toediening van ghreline leidt tot hogere GH-concentraties dan toediening van GHRH of hexareline (Takaya et al., 2000; Arvat et al., 2001).

De gemiddelde ghreline-geïnduceerde plasma GH-respons was significant lager bij oude honden dan bij jonge honden. Deze plasma GH-respons was ook lager bij de oude honden dan bij de jonge honden na GHRH en GHRP-6 toediening, maar dit verschil was niet significant. Deze observaties zijn vergelijkbaar met die bij de mens waar niet alleen het GH-vrijstellend effect van ghreline (Broglia et al., 2003), maar ook dat van GHRH en van synthetische GH-secretagogen een leeftijdsgebonden afname vertoont (Bowers et al., 1992; Aloï et al., 1994; Chapman et al., 1996; Muccioli et al., 2002; Broglia et al., 2003). Ook bij oude ratten (Ceda et al., 1986; Walker et al., 1990) en oude honden (Cella et al., 1995) is de GH-respons op synthetische GH-secretagogen afgenomen. De leeftijdsgebonden afname van zowel basaal als gestimuleerd GH wordt bij de mens toegeschreven aan veranderingen in de neurale controle van de groeihormoonproducerende cellen in de hypofysevoorkwab (Giustina en Veldhuis; 1998; Ghigo et al., 1999). Deze veranderingen kunnen het gevolg zijn van wijzigingen in de hypothalame aansturing van de hypofyse, waarbij vooral gedacht moet worden aan het gelijktijdig optreden van verminderde GHRH-secretie en toegenomen SS-afgifte (Kelijman, 1991; Giustina en Veldhuis; 1998; Ghigo et al., 1999; Muller et al., 1999). Bevindingen van een recente studie over de hypothalame afgifte van GHRH en SS bij apen laten zien dat de frequentie en de amplitude van de GHRH-pulsen en de basale GHRH-concentratie bij oude apen veel lager zijn dan bij jongvolwassen apen. Daarentegen zijn de amplitude van de SS-pulsen en de basale SS-concentratie significant hoger bij oude apen dan bij jongvolwassen apen (Nakamura et al., 2003). Veranderingen op het niveau van de groeihormoonproducerende cellen spelen waarschijnlijk geen essentiële rol (Muller et al.,

1999). Inderdaad, herhaalde GHRH-injecties bij oude mensen, gecombineerde toediening van GHRH en clonidine bij oude honden, of GHRH + GHRP-6 injectie bij oude ratten (Walker et al., 1991) veroorzaken een significante toename van circulerend GH (Cella et al., 1993; Nicolas et al., 1994). Deze bevindingen tonen aan dat de groeihormoonproducerende cellen van de hypofysevoorkwab in staat blijven om voldoende GH te synthetiseren en vrij te stellen tijdens veroudering (Corpas et al., 1992; Cella et al., 1993; Muller et al., 1999; Muccioli et al., 2002), ondanks het feit dat het aantal en de grootte van de groeihormoonproducerende cellen afneemt met voortschrijdende leeftijd (Sun et al., 1984) en dat de afgenomen GH-afgifte bij oude ratten gepaard gaat met een afname van de hoeveelheid hypofysair GH (Sonntag et al., 1980), een afname van mRNA coderend voor GH (Takahashi et al., 1990) en een lage concentratie mRNA coderend voor de GHRH-receptor in de hypofyse (Kamegai et al., 1999). De verminderde GH-respons op GHRH-toediening bij oude mensen, ratten en honden geeft aan dat de groeihormoonproducerende cellen in de hypofyse minder gevoelig zijn voor GHRH (Pavlov et al., 1986; Cella et al., 1989; Arce et al., 1990).

De resultaten van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** tonen aan dat ghreline en GHRP-6 GH-specifiek zijn bij jonge en oude honden, dit wil zeggen dat beide stimulantia noch de hypofyse-bijnierschors-as, noch de vrijstelling van thyroïd-stimulerend hormoon (TSH), luteïniserend hormoon (LH) of prolactine (PRL) beïnvloeden. Deze bevindingen zijn vergelijkbaar met die in studies bij ratten onder narcose waarbij intraveneuze toediening van ghreline enkel GH-vrijstelling stimuleerde zonder verandering in de plasmaconcentraties van de andere hypofysevoorkwabhormonen (Kojima et al., 1999). Toediening van GHRP-6 induceert echter bij ratten bij bewustzijn vrijstelling van adrenocorticotroop hormoon (ACTH) en cortisol (Thomas et al., 1997). Bij de mens is aangetoond dat intraveneuze toediening van ghreline en synthetische GH-secretagogen, niet alleen de GH-afgifte bevordert, maar ook leidt tot verhoogde circulerende concentraties van PRL, ACTH, en cortisol (Arvat et al., 2001; Muccioli et al., 2002; Takaya et al., 2002).

De diagnose GH-deficiëntie dient gebaseerd te zijn op resultaten van een stimulatietest, daar basale plasma GH- en IGF-I-concentraties kunnen overlappen bij hypofysaire dwergen en gezonde individuen (Gill et al., 1998; Kooistra et al., 2000). Aangezien toediening van ghreline bij jonge honden een sterkere stimulus voor GH-secretie bleek te zijn dan GHRH, zou dit peptide mogelijk ook gebruikt kunnen worden om GH-deficiëntie vast te stellen. In **hoofdstuk 6** worden de effecten van intraveneuze toediening van ghreline op de plasma GH-concentratie beschreven bij Duitse herders met een aangeboren tekort van meerdere hypofysevoorkwabhormonen en bij gezonde honden van vergelijkbare

leeftijd. Ghreline-toediening leidde bij geen enkele hypofysaire dwerg tot een toename van de plasma GH-concentratie boven de 5 µg/l. Dit is in overeenstemming met waarnemingen bij de mens waar geïsoleerde GH-deficiëntie bij kinderen ook gekenmerkt wordt door een sterk verminderde GH-respons op ghreline (Aimaretti et al., 2002). Echter, bij enkele gezonde honden bleef de plasma GH-concentratie ook laag na toediening van ghreline. Dus, terwijl een ghreline-geïnduceerde plasma GH-waarde hoger dan 5 µg/l GH deficiëntie blijkt uit te sluiten kunnen fout-negatieve resultaten voorkomen.

Ghreline veroorzaakt, via andere wegen dan die betrokken bij GH-secretie, ook gewichtstoename door stimulatie van de eetlust en vermindering van vetafbraak. Bij verscheidene zoogdieren blijkt dit peptide ook een rol te spelen bij de initiatie van voedselopname (Kamegai et al., 2000; Tschop et al., 2000; Wren et al., 2000; Wren et al., 2001). In **hoofdstuk 7** is het onderzoek bij gezonde honden beschreven naar de effecten van voedselopname en vasten. Hiertoe werden de plasmaconcentraties van ghreline, GH, IGF-I, glucose en insuline bepaald na voedselopname op het gebruikelijke voedertijdstip, na 1 dag vasten, na 3 dagen vasten, en na hervatting van de voedselverstrekking op het gebruikelijke voedertijdstip de volgende dag. Onze bevindingen waren vergelijkbaar met onderzoeksresultaten bij knaagdieren (Tschop et al., 2000; Asakawa et al., 2001) en mensen (Cummings et al., 2001). Toediening van een maaltijd resulteerde in lagere plasma ghrelineconcentraties en vasten leidde tot hogere plasma ghrelineconcentraties. De hogere plasma ghrelineconcentratie tijdens vasten zou de fysiologische rol van dit peptide bij de toename van eetlust en initiatie van voedselopname kunnen weerspiegelen. De hoogste plasma ghrelinewaarden werden bij onze honden waargenomen net voor de toediening van voedsel op de eerste dag. Het is mogelijk dat deze preprandiale toename van de plasma ghrelineconcentratie een anticiperende respons is op voedselopname, aangezien de honden gedurende jaren het voeder kregen toegediend op hetzelfde moment van de dag. Sugino et al. (2002) toonden aan dat emotionele factoren, en vooral de verwachting dat voedsel zal worden verstrekt, bij schapen ghrelinesecretie stimuleert. Deze tijdelijke toename van de ghrelinesecretie zou het gevolg kunnen zijn van een geconditioneerde emotionele respons. Het is bekend dat secretie van speeksel en maagzuur vlak voor voederopname op gang komt doordat een dergelijke geconditioneerde emotionele respons leidt tot stimulatie van de *nervus vagus* (Harding en Leek, 1973).

Overeenkomstig de bevindingen bij knaagdieren en mensen, namen bij onze honden de plasma ghrelineconcentraties ook af vlak na inname van voedsel, maar deze afname was niet significant. Zeer recent hebben Yokoyama et al. (2005) bij honden een significante daling

van de circulerende ghrelineconcentraties vlak na voederopname gerapporteerd. Het mechanisme dat hiervoor verantwoordelijk is begint stilaan duidelijk te worden: veranderingen in de plasma insulineconcentratie, intestinale osmolariteit, en intestinale neurale signalen lijken een rol te spelen, terwijl uitzetting van de maag, vagale activiteit en glucagon-achtig peptide geen rol lijken te spelen (Williams et al., 2003; Gelling et al., 2004).

In overeenstemming met de resultaten van een onderzoek bij koeien (Miura et al., 2004) werd bij onze honden geen GH-stijging gezien parallel aan de preprandiale toename van de plasma ghrelineconcentratie. Dit is in tegenstelling met bevindingen bij de mens en bij schapen (Cummings et al., 2001; Sugino et al., 2002), waarbij de anticipatie van voedselverstreking wel leidt tot een stijging van de plasma ghrelineconcentratie.

Evenals bij de mens (Cummings et al., 2001), waren de veranderingen in het plasmaprofiel van ghreline tijdens voedselopname en vasten tegengesteld aan de veranderingen in het circulerend profiel van glucose en insuline. De vraag is dan of insuline de vrijstelling van ghreline negatief beïnvloedt of omgekeerd. De eerste hypothese werd onderzocht door verscheidene onderzoeksgroepen (Saad et al., 2002; Flanagan et al., 2003; Kamegai et al., 2004). Deze onderzoeken toonden aan dat insuline de plasmaconcentraties van ghreline kan onderdrukken als het wordt toegediend in supra-fysiologische doses of hoog-normale doses worden gegeven gedurende een lange periode. Fysiologische insulineconcentraties blijken de vrijstelling van ghreline niet te reguleren (Caixas et al., 2002; Schaller, et al., 2003; Soriano-Guillen et al., 2004). Er is ook gesuggereerd dat ghreline de secretie en de werking van insuline zou kunnen blokkeren om zo het bloedglucosegehalte te handhaven (Broglia et al., 2001; Cummings et al., 2005). Verscheidene studies hebben aangetoond dat ghreline de glucose-gemedieerde insulinesecretie kan remmen, zowel *in vivo* als *in vitro* (Egido, et al., 2002; Colombo, et al., 2003; Reimer, et al., 2003). Ook exogeen toegediend ghreline verlaagt circulerende insulineconcentraties bij muizen (Reimer, et al., 2003) en mensen (Broglia et al., 2003).

De aanmaak en vrijstelling van GH is aangetoond in diverse humane extra-hypofysaire weefsels zoals het centrale zenuwstelsel (Render et al., 1995) en het immuunsysteem (Clark, 1997; Van Buul-Offers en Kooijman, 1998). Expressie van mRNA coderend voor GH is ook gevonden in het beenmerg (Kooijman et al., 1997) en de testis (Untergasser et al., 1997).

Een prachtig voorbeeld van extra-hypofysaire GH-synthese bij de hond is de progesteron-geïnduceerde aanmaak in melkklierweefsel. De productie van GH in de melkklier kan worden geïnduceerd door endogeen progesteron en door de toediening van progestativa. Activatie van de progesteronreceptor door progesteron of progestativa wordt dan ook

beschouwd als de eerste stap in dit proces (Selman et al., 1994a; Mol et al., 1995 a,b; Mol et al., 1996; van Garderen et al., 1997). Bij de hond bereikt het mammaire GH de systemische circulatie, waardoor het beeld van hypersomatotropisme of acromegalie kan ontstaan (Selman et al., 1994b). Het plasma GH-profiel bij teven met progesteron-geïnduceerde acromegalie heeft geen pulsatiel karakter (Watson et al., 1987). Bovendien kunnen de plasma GH-concentraties bij deze honden niet gestimuleerd worden met GHRH noch geremd worden met SS (Watson et al., 1987; Selman et al., 1991). Endogeen progesteron en synthetische progestativa zoals medroxyprogesteron acetaat (MPA) induceren de expressie van GH voornamelijk in het epitheel van de ductale, knopvormig uitgroeiende structuren van de melkklier tijdens de proliferatiefase. Dit suggereert dat lokaal geproduceerd GH de proliferatie van epitheel bevordert op een autocriene en/of paracriene wijze (van Garderen et al., 1997). Het lokaal gevormde GH speelt dus waarschijnlijk een rol bij de proliferatie en differentiatie van ductale structuren, waaruit uiteindelijk alveolair, secernerend klierepitheel ontstaat.

Expressie van GH is ook aangetoond in goed- en kwaadaardige melkkliertumoren bij de hond (Mol et al., 1995a). GH-genexpressie is ook gevonden in fibroadenomateuze melkklierhyperplasie bij katten die behandeld waren met progestativa (Mol et al., 1995a). Bij deze diersoort lijkt het mammaire GH de algemene circulatie echter niet te bereiken. Ook in humaan onaangestast melkklierweefsel en in melkkliertumoren werd GH-expressie aangetoond (Mol et al., 1995a). Het GH-gen in melkklierweefsel en melkkliertumoren van mens en hond is identiek aan het gen coderend voor GH in de hypofysevoorkwab (Mol et al., 1995 a,b). Voor een overzicht van de effecten van progesteron en synthetische progestativa bij de teef, wordt de lezer verwezen naar **hoofdstuk 2** van dit proefschrift.

In overeenstemming met eerdere publicaties (Takahashi et al., 1981; French et al., 1987; Kooistra et al., 2000) laten de in **hoofdstuk 8** beschreven bevindingen zien dat bij de gezonde teef GH pulsatiel wordt afgegeven. Toediening van MPA gedurende 1 jaar resulteerde bij gezonde controlehonden in hogere basale plasma GH- en IGF-I-concentraties, hogere oppervlaktes onder de curve (AUCs) boven het nulniveau voor GH, en lagere AUCs boven de basaallijn voor GH (= minder GH afgegeven in pulsen) dan bij honden die een volledige mastectomie hadden ondergaan. De bevindingen bij de controlehonden zijn te verklaren door een negatieve terugkoppeling van progesteron-geïnduceerd mammair GH en de toegenomen plasma IGF-I-concentraties op de pulsatiele afgifte van hypofysair GH.

In de anoestrusfase van de ovariële cyclus en vóór MPA-behandeling was het melkklierweefsel bij histologisch onderzoek inactief. Na 1 jaar MPA-behandeling was het

grootste deel van het mammaweefsel gedifferentieerd tot alveolair melk-secernerend klierepitheel, behalve bij één hond waarbij melkklierweefsel in de proliferatiefase werd gevonden. Het epitheel bij deze hond bestond uit ductale, knopvormig uitgroeiende structuren. Deze bevindingen zijn vergelijkbaar met de bevindingen in een eerder onderzoek bij honden (van Garderen et al., 1997).

In de hondenmelkklier worden immunoreactief GH (iGH) en GH-genexpressie voornamelijk gevonden in ductale, knopvormig uitgroeiende structuren in de vroege en midluteale fase van de ovariële cyclus. GH-genexpressie neemt sterk af in gedifferentieerd alveolair secernerend klierepitheel en in de anoestrusfase van de ovariële cyclus (van Garderen et al., 1997). Ook in onze studie was geen iGH aantoonbaar in de melkklier van de honden in anoestrus vóór behandeling met MPA. Bij de controlehonden die gedurende 1 jaar zijn behandeld met MPA werd bij één hond iGH gevonden in het epitheel van ductale, knopvormig uitgroeiende structuren.

RT-PCR-analyse, een veel gevoeliger techniek dan immunohistochemie, liet zien dat onder invloed van de MPA-behandeling in het melkklierweefsel van de controlehonden de GH-genexpressie toenam en de GH-receptor (GHR)-genexpressie afnam. Ook in een andere studie werd een toegenomen concentratie GH-mRNA gevonden in de hondenmelkklier na langdurige toediening van progestativa (Mol et al., 1995a). Passend bij onze bevindingen is ook met immunohistochemisch onderzoek aangetoond dat de expressie van de GHR vermindert in gedifferentieerd alveolair secernerend klierepitheel op het einde van de luteale fase (van Garderen et al., 1999).

Naast de effecten in de melkklieren, heeft het door progesteron-geïnduceerde mammaire GH mogelijk ook een endocrien effect op het baarmoederslijmvlies. Zo is door ons gepostuleerd dat het mammaire GH een rol speelt bij de ontwikkeling van cysteuze endometriumhyperplasie (CEH). Cysteuze endometriumhyperplasie wordt frequent waargenomen bij teven die herhaaldelijk zijn behandeld met progestativa ter preventie van de loopsheid (Capel-Edwards et al., 1973; Sokolowski en Zimbelman, 1973; Goyings et al., 1977). CEH kan zich echter ook spontaan ontwikkelen gedurende de luteale fase van de ovariële cyclus bij teven van middelbare en hoge leeftijd. (Dow, 1958). Gezien de gelijkenis tussen de progesteron-geïnduceerde epitheliale veranderingen in de melkklier en de baarmoeder, kan de vraag gesteld worden of mammair GH ook betrokken is bij de ontwikkeling van progesteron-geïnduceerde CEH. Met immunohistochemie werd reeds GH aangetoond in uterusepitheel van honden die behandeld werden met progestativa. Echter de

afwezigheid van mRNA coderend voor GH suggereerde dat dit niet wordt aangemaakt in de uterus zelf (Kooistra et al., 1997).

De bevindingen van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 8** tonen aan dat bij beide groepen honden (controlehonden en gemastectomeerde honden) MPA-behandeling leidt tot uteriene veranderingen met macroscopische als microscopische kenmerken van CEH. In het uterusepitheel van beide groepen honden was ná MPA-behandeling immunoreactiviteit voor GH aanwezig, terwijl er vóór behandeling geen iGH was. Deze bevindingen tonen aan dat progesteron-geïnduceerd mammair GH geen essentiële rol speelt bij de ontwikkeling van CEH. Echter, de aanwezigheid van iGH in het cytoplasma van hyperplastisch uterusepitheel bij honden met CEH suggereert dat GH mogelijk wel betrokken is bij het ontstaan van CEH.

Bij onderzoek met RT-PCR bleek dat na MPA-behandeling GH-mRNA alleen was toegenomen in het uterusepitheel van gemastectomeerde honden en niet bij de gezonde controlehonden. Vergelijkbaar met de progesteron-geïnduceerde GH genexpressie in de hondenmelkklier (van Garderen et al., 1997), leidde MPA-behandeling ook tot meer GH genexpressie in het uterusepitheel. Waarschijnlijk leidde bij de controlehonden de toename van de plasmaconcentraties van mammair GH en de daaruit voortkomende toename van plasma IGF-I-concentraties tot een onderdrukking van de GH-genexpressie, op eenzelfde manier als reeds aangetoond voor de hypofyse (Hartman et al., 1993). MPA-behandeling resulteerde ook in een toegenomen expressie van het IGF-I-gen in de baarmoeder, maar dit was alleen significant bij de controlehonden. Een verklaring hiervoor zou het stimulerend effect van de toegenomen plasmaconcentraties van mammair GH op de IGF-I-genexpressie kunnen zijn. MPA-behandeling stimuleerde de expressie van GHRn in uterusepitheel bij onze honden niet, waardoor het niet waarschijnlijk lijkt dat toename van de GHRn de aanwezigheid van iGH in uterusepitheel, zoals eerder gesuggereerd door Kooistra et al. (1997), zou kunnen verklaren

In **hoofdstuk 9** worden de effecten van MPA op de functie van de hypofysevoorkwab bij de teef beschreven. De effecten van supra-hypofysaire stimulatie, waarbij gebruik gemaakt werd van een gecombineerde functietest voor de hypofysevoorkwab (Meij et al., 1996), op de vrijstelling van zeven hypofysevoorkwabhormonen werd bestudeerd vóór MPA-toediening en op diverse tijdstippen tijdens een 1 jaar durende MPA-behandeling. Oestruspreventie door middel van MPA bij onze honden kon niet worden toegeschreven aan een significante afname van de plasmaconcentraties van follikelstimulerend hormoon (FSH) of LH. Sterker nog, MPA-behandeling werd zelfs gekenmerkt door een toename van de basale plasma FSH-concentratie, zonder verandering van de basale plasma LH-concentratie gedurende de eerste

maanden van MPA-behandeling. Deze toegenomen basale FSH-concentratie zou het gevolg kunnen zijn van een direct remmend effect van MPA op het niveau van het ovarium, resulterend in een vermindering van de ovariële oestradiol- en/of inhibinesecretie of stimulatie van de activinevrijstelling (Couzinet en Schaison, 1993; Poindexter et al., 1993; Shupnik, 1996; Heikinheimo et al., 1996). Bij voortgaande MPA-behandeling namen de basale FSH-concentraties weer af tot hun niveau vóór MPA-behandeling, terwijl de hypofysaire FSH-respons op supra-hypofysaire stimulatie daalde. Onderdrukking van de hypofysaire GnRH-receptoren door continue GnRH-stimulatie zou hiervoor een verklaring kunnen zijn (Belchetz et al., 1978).

Eerdere bevindingen toonden aan dat progestativa de GH-IGF-I-as (Eigenmann et al., 1983; Selman et al., 1994b) bij de teef beïnvloeden, en dit werd bevestigd bij het onderzoek vermeld in **hoofdstuk 9**. Basale plasma GH-concentraties stegen geleidelijk gedurende de 1 jaar durende MPA-behandeling, echter de stijging was niet statistisch significant. Concannon et al. (1980) vonden eerder dat plasma GH-concentraties niet significant stegen bij 27 van de 36 MPA-behandelde honden. Echter, de significante stijging van circulerend IGF-I gedurende MPA-behandeling in ons onderzoek impliceert indirect de overmatige blootstelling aan GH (Selman et al., 1994b). Plasma IGF-I-concentraties lijken dus een meer gevoelige indicator te zijn dan plasma GH-concentraties voor het documenteren van de effecten van progestativa op de GH-IGF-I-as.

Naast een interactie met de progesteronreceptor heeft MPA ook een relatief hoge affiniteit voor de glucocorticoïdreceptor (Selman et al., 1996). Onderdrukking van de hypothalamus-hypofyse-bijnierschors-as gedurende MPA-behandeling werd verwacht, aangezien dit eerder al aangetoond was bij de mens (Willemse et al., 1990) en de hond (Selman et al., 1994c, Selman et al., 1996). Echter, de resultaten van de studie beschreven in **hoofdstuk 9** laten zien dat de effecten op de ACTH-secretie gedurende MPA-behandeling beperkt bleven. Aangezien de supra-hypofysaire stimulatie uitgevoerd werd ongeveer 4 weken na injectie van MPA is het mogelijk dat de ACTH-synthese zich intussen had hersteld. De onderdrukking van de cortisolsecretie was evenwel meer uitgesproken en vergelijkbaar met resultaten in vorige studies (Selman et al., 1996). Blijkbaar was de onderdrukking van de ACTH-secretie sterk genoeg om aanleiding te geven tot atrofie van de zona fasciculata van de bijnierschors.

De basale plasma TSH-concentraties waren 8 maanden na MPA-behandeling gestegen, maar ze bleven toch binnen de referentiegrenzen van ons laboratorium. Frank et al. (1979) vonden geen effect van MPA-behandeling op de circulerende TSH-concentratie. Men

zou kunnen veronderstellen dat MPA door de inherente glucocorticoïde werking een direct effect heeft op de schildklier (Kemppainen et al., 1983). Via terugkoppeling op de hypofyse zou dit een (lichte) stijging van de plasma TSH-concentraties tot gevolg kunnen hebben.

MPA-behandeling veroorzaakte geen veranderingen in de secretie van PRL of α -melanocyt-stimulerend hormoon. Een verklaring voor het uitblijven van een effect op de PRL-secretie gedurende MPA-behandeling zou de afwezigheid van een duidelijke afname van progestagene activiteit kunnen zijn. Van dergelijke abrupte dalingen is bekend dat ze leiden tot verhoogde afgifte van PRL (Galac et al., 2000).

De aanwezigheid van progesteronreceptoren in de hondenmelkklier maakt het mogelijk om honden met progesteron-geïnduceerde mammaire GH-hypersecretie doelgericht te behandelen met progesteronreceptor-blokkers. De resultaten van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 10** tonen aan dat toediening van de progesteronreceptor-blokker aglépristone aan honden met progesteron-geïnduceerd hypersomatotropisme leidt tot een significante daling van de plasma GH- en IGF-I-concentraties. Dit stemt overeen met de bevindingen van Watson et al. (1987) die bij honden met progesteron-geïnduceerde acromegalie vonden dat met de toediening van de progesteronreceptor-antagonist mifepristone de plasma GH-concentratie significant daalde en de plasma IGF-I-concentratie normaliseerde. Bij analyse van het plasma GH-profiel bleek dat de gemiddelde basale GH-concentratie en de AUC boven het nulniveau voor GH bij onze honden met GH-overmaat op het einde van de behandeling met aglépristone gering waren afgenomen, vergeleken met deze waarden vóór aglépristonebehandeling. De AUC boven de basaallijn voor GH, dat is de hoeveelheid GH geproduceerd in pulsen, was aan het einde van de aglépristonebehandeling gestegen, hoewel niet significant. Dus, behandeling met aglépristone resulteerde in gedeeltelijk herstel van de normale pulsatiele GH-secretie. Een hogere dosis aglépristone zou mogelijk kunnen leiden tot complete normalisatie van het pulsatiele GH patroon.

Drie en een half en 5,5 week na de laatste toediening van aglépristone namen de plasma IGF-I-concentraties weer toe; een teken van toegenomen blootstelling aan GH. De terugkeer van IGF-I hypersecretie na het stoppen van aglépristone-toediening was niet verbazingwekkend aangezien alle honden een depot-progesteronpreparaat toegediend hadden gekregen gedurende een periode van 1 jaar, en aangezien het progesteroneffect van dit preparaat veel langer is dan de duur van de aglépristone-behandeling in deze studie. Dit impliceert dat behandeling met een progesteronreceptor-antagonist zo lang moet duren als het te verwachten effect van het progestageen.

De volgende conclusies kunnen worden getrokken voor de hond:

- Hypofyse-afhankelijk hyperadrenocorticisme gaat niet alleen gepaard met een afname van de afgifte van GH in pulsen, maar ook met een verminderde respons op GH-stimulantia.
- Bij jonge honden is ghreline een potentere stimulus voor GH-afgifte dan GHRH en GHRP-6. Bij oude honden leidt GHRH-toediening tot hogere plasma GH-concentraties dan de toediening van ghreline of GHRP-6.
- De ghreline-geïnduceerde GH-secretie neemt af met toenemende leeftijd; deze leeftijdsafhankelijke afname is veel lager bij toediening van GHRP-6 of GHRH.
- Ghreline en GHRP-6 stimuleren specifiek de vrijstelling van GH en veroorzaken geen toename van de secretie van ACTH, cortisol, TSH, LH, of PRL.
- Een ghreline-stimulatietest is een bruikbaar alternatief voor stimulatie met GHRH bij de diagnostiek van hypofysaire dwerggroei.
- Vasten en voedselopname gaan gepaard met, respectievelijk, hogere en lagere circulerende ghrelineconcentraties.
- De veranderingen in plasma ghrelineconcentraties gedurende voedselopname en vasten gaan niet gepaard met vergelijkbare veranderingen in de plasma GH-concentraties.
- Gedurende vasten en voedselopname zijn de veranderingen in de circulerende insuline- en glucoseconcentraties omgekeerd aan de veranderingen in de plasma ghrelineconcentraties.
- Bij gezonde controlehonden leidt toediening van medroxyprogesteron acetaat (MPA) tot een hogere basale plasma GH-concentratie en minder GH afgegeven in pulsen dan bij honden zonder melkklieren. Bij gemastectomeerde honden leidt behandeling met MPA niet tot een verandering van de basale plasma GH-concentratie, de AUC boven het nulniveau en boven de basaallijn voor GH, en de frequentie van de GH pulsen.
- Zowel bij gezonde honden als bij gemastectomeerde honden ontwikkelt zich na behandeling met MPA cysteuze endometriumhyperplasie (CEH). Dus, progesteron-geïnduceerd mammair GH speelt geen essentiële rol bij de ontwikkeling van CEH.
- De aanwezigheid van immunoreactief GH in het cytoplasma van hyperplastisch baarmoederepitheel suggereert echter een rol van GH in de pathogenese van CEH.
- Het effect van MPA op de secretie van gonadotrope hormonen blijft beperkt tot de FSH-secretie. Gedurende de eerste maanden leidt MPA-behandeling tot een toename van de basale plasma FSH-concentratie, terwijl de FSH respons op supra-hypofysaire stimulatie afneemt.
- Progesteron-geïnduceerd hypersomatotropisme kan met de progesteronreceptor-antagonist aglépristone worden behandeld.

Referenties

Aimaretti G, Baffoni C, Broglio F, Janssen JA, Corneli G, Deghenghi R, Van Der Lely AJ, Ghigo E, Arvat E. Endocrine responses to ghrelin in adult patients with isolated childhood-onset growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 2002;56:765-771.

Aloi JA, Gertz BJ, Hartman ML, Huhn WC, Pezzoli SS, Wittreich JM, Krupa DA, Thorner MO. Neuroendocrine responses to a novel growth hormone secretagogue, L-692, 429, in healthy older subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;8:4249-4257.

Arce V, Cella SG, Loche S, Ghigo E, Devesa J, Muller EE. Synergistic effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and clonidine in stimulating GH release in young and old dogs. *Brain Res* 1990;537:359-362.

Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1169-1174.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-345.

Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978;202:631-633.

Bowers CY, Newell D, Granda-Alaya R, Garcia M, Barrera C. Comparative studies on growth hormone release in younger and older men and women. In: *Proceedings of the 74th Annual Meeting of the Endocrine Society* 1992; p. 172.

Bowers CY. Editorial: A new dimension on the induced release of growth hormone in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:817-818.

Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5083-5086.

Broglio F, Benso A, Castiglioni C, Gottero C, Prodham F, Destefanis S, Gauna C, Van der Lely AJ, Deghenghi R, Bo M, Arvat E, Ghigo E. The endocrine response to ghrelin as function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1537-1542.

Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodham F, Destefanis S, Gauna C, Maccario M, Deghenghi R, van der Lely AJ, Ghigo E. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4268-4272.

Burguera B, Muruais C, Penalva A, Dieguez C, Casanueva FF. Dual and selective actions of glucocorticoids upon basal and stimulated growth hormone release in man. *Neuroendocrinology* 1990;51:51-58. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1902.

Capel-Edwards K, Hall DE, Fellowes KP, Vallance DK, Davies MJ, Lamb D, Robertson WB. Long-term administration of progesterone to the female beagle dog. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973;24:474-488.

Casanueva FF. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21:483-517.

Ceda GP, Valenti G, Butturini U, Hoffman AR. Diminished pituitary responsiveness to GH-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* 1986;118:2109-2114.

Cella SG, Moiraghi V, Minuto F, Barreca A, Cocchi D, De Gennaro Colona V, Reina G, Muller EE. Prolonged fasting or clonidine can restore the defective growth hormone secretion in old dogs. *Acta Endocrinol* 1989;121:177-184.

Cella SG, Arce VM, Pieretti F, Locatelli V, Settembrini BP, Müller EE. Combined administration of growth hormone-releasing hormone and clonidine restores defective growth hormone secretion in old dogs. *Neuroendocrinol* 1993;57:432-438.

Cella SG, Locatelli V, Poratelli M, De Gennaro Colonna V, Imbimbo BP, Deghenghi R, Muller EE. Hexarelin, a potent GHRP analogue: interactions with GHRH and clonidine in young and aged dogs. *Peptides* 1995;16:81-86.

Chapman IM, Bach MA, Van Cauter E, Farmer M, Krupa D, Taylor AM, Schilling LM, Cole KY, Skiles EH, Pezzoli SS. Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4249-4257.

Clark R. The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 1997;18:157-179.

Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas* 2003;27:161-166.

Concannon PW, Altszuler N, Hampshire J, Butler WR, Hansel W. Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 1980;106:1173-7.

Conway S, McCann SM, Krulich L. On the mechanism of growth hormone autofeedback regulation: possible role of somatostatin and growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 1985;117:2284-2292.

Corpas E, Harman SM, Pineyro MA, Roberson R, Blackman MR. Growth hormone (GH)-releasing hormone-(1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:530-535.

Couzinet B and Schaison G. The control of gonadotrophin secretion by ovarian steroids. *Hum Reprod* 1993;8:97-101.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-1719.

Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 2005;6:153-169.

Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Vet Rec* 1958;70:1102-1110.

Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002;146:241-244.

Eigenmann JE, Eigenmann RY, Rijnberk A, van der Gaag I, Zapf J, Froesch ER. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983;104:167-176.

Finkelstein JW, Roffwarg HP, Boyar RM, Kream J, Hellman L. Age-related change in the 24-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;35:665-670.

Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:313-316.

Frank DW, Kirton KT, Murchison TE, Quinlan WJ, Coleman ME, Gilbertson TJ, Feenstra ES, Kimball FA. Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. *Fertil Steril* 1979;31:340-346.

French MB, Vaitkus P, Cukerman E, Sirek A, Sirek OV. Secretory pattern of canine growth hormone. *Am J Physiol* 1987;252:E268-E272.

Galac S, Kooistra HS, Butinar J, Bevers MM, Dieleman SJ, Voorhout G and Okkens AC. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with alogliptone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology* 2000;53:941-950.

Gelling RW, Overduin J, Morrison CD, Morton GJ, Frayo RS, Cummings DE, Schwartz MW. Effect of uncontrolled diabetes on plasma ghrelin concentrations and ghrelin-induced feeding. *Endocrinology* 2004;145:4575-4582.

Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Maccario M, Camanni F (1999) The regulation of growth hormone secretion. In: *The endocrine response to acute illness*, pp 152-175. Eds. RC Jenkins, RJM Ross. Karger, Basel: *Frontiers of Hormone Research*.

Gill MS, Toogood AA, O'Neill PA, Thorner MO, Shalet SM, Clayton PE. Urinary growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-binding protein-3 measurements in the diagnosis of adult GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2562-2565.

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

Goyings LS, Sokolowski JH, Zimbelman RG, Geng S. Clinical, morphologic, and clinicopathologic findings in Beagles treated for two years with melengestrol acetate. *Am J Vet Res* 1977;38:1923-1931.

Harding R, Leek BF. Central projections of gastric afferent vagal inputs. *J Physiol* 1973;228:73-90.

Hartman ML, Clayton PE, Johnson ML, Celniker A, Perlman AJ, Alberti KG, Thorner MO. A low dose euglycemic infusion of recombinant human insulin-like growth factor I rapidly suppresses fasting-enhanced pulsatile growth hormone secretion in humans. *J Clin Invest* 1993;91:2453-2462.

Hartman ML. Physiological regulators of growth hormone secretion. In: *Growth hormone in adults*. Eds A Juul and JOL Jorgensen. Cambridge University Press, UK, pp 3-53.

Heikinheimo O, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD. Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions. *Contraception* 1996;53:55-64.

Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Sugino N, Demura H, Ling N, Shizume K. Effect of human growth hormone-releasing hormone on GH secretion in Cushing's syndrome and non-endocrine disease patients treated with glucocorticoids. *Life Sci* 1988;42:979-984.

Kamegai J, Wakabayashi I, Kineman RD, Frohman LA. Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 1999;11:299-306.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 2000;141:4797-4800.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 2004;119:77-81.

Kelijman M. Age-related alterations of the growth-hormone/insulin-like growth factor-I axis. *J Am Geriatr Soc* 1991;39:295-307.

Kemppainen RJ, Thompson FN, Lorenz MD, Munnell JF, Chakraborty PK. Effects of prednisone on thyroid and gonadal endocrine function in dogs. *J Endocrinol* 1983;96:293-302.

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

Kooijman R, Malur A, Van Buul-Offers SC, Hooghe-Peters EL. Growth hormone expression in murine bone marrow cells is independent of the pituitary transcription factor Pit-1. *Endocrinology* 1997;138:3949-3955.

Kooistra HS, Okkens AC, Mol JA, van Garderen E, Kirpensteijn J, Rijnberk A. Lack of association of progestin-induced cystic endometrial hyperplasia with GH gene expression in the canine uterus. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:355-361.

Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA, Rijnberk A. Combined pituitary hormone deficiency in German shepherd dogs with dwarfism. *Domest Anim Endocrinol* 2000;19:177-190.

Lanzi R, Tannenbaum GS. Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology* 1992;130:780-788.

Leal-Cerro A, Pumar A, Garcia-Garcia E, Dieguez C, Casanueva FF. Inhibition of growth hormone release after the combined administration of GHRH and GHRP-6 in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1994;41:649-654.

Leal-Cerro A, Venegas E, Garcia-Pesquera F, Jimenez LM, Astorga R, Casanueva FF, Dieguez C. Enhanced growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone after dietary restriction in patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1998;48:117-121.

Lee WM (2004). Growth hormone secretion in healthy and diseased dogs. Thesis Universiteit Utrecht.

Lima L, Arce V, Diaz MJ, Tresguerres JA, Devesa J. Glucocorticoids may inhibit growth hormone release by enhancing beta-adrenergic responsiveness in hypothalamic somatostatin neurons. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:439-444.

Meij BP (1997). Transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. Thesis Universiteit Utrecht.

Meij BP, Mol JA, Hazewinkel HA, Bevers MM, Rijnberk A. Assessment of a combined anterior pituitary function test in beagle dogs: rapid sequential intravenous administration of four hypothalamic releasing hormones. *Domest Anim Endocrinol* 1996;13:161-170.

Miell J, Corder R, Miell PJ, McClean C, Gaillard RC. Effects of glucocorticoid treatment and acute passive immunization with growth hormone-releasing hormone and somatostatin antibodies on endogenous and stimulated growth hormone secretion in the male rat. *J Endocrinol* 1991;131:75-86.

Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Ohnami Y. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 2004;82:1329-1333.

Mol JA, van Garderen E, Selman PJ, Wolfswinkel J, Rijnberk A, Rutteman GR. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J Clin Invest* 1995a; 95:2028-2034.

Mol JA, Henzen-Logmans SC, Hageman P, Misdorp W, Blankenstein MA, Rijnberk A. Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1995b;80:3094-3096.

Mol JA, van Garderen E, Rutteman GR, Rijnberk A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;57:67-71.

Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1981;108:31-39.

Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides.

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

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

Nakamura S, Mizuno M, Katakami H, Gore AC, Terasawa E. Aging-related changes in in vivo release of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from the stalk-median eminence in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:827-833.

Nicolas V, Prewett A, Bettica P, Mohan S, Finkelman RD, Baylink DJ, Farley JR. Age-related decrease in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-B in femoral cortical bone from both men and women: Implications for bone loss with aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1011-1016.

Niimi K, Krieg RJ Jr, Hanna JD, Santos F, Chan JC. Glucocorticoid-induced changes in the quantity and secretory capacity of individual rat somatotropes. *J Am Soc Nephrol* 1993;3:1428-1433.

Ohyama T, Sato M, Niimi M, Hizuka N, Takahara J. Effects of short- and long-term dexamethasone treatment on growth and growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH)-insulin-like growth factor-1 axis in conscious rats. *Endocr J* 1997;44:827-835.

Pavlov EP, Harman SM, Merriam GR, Gelato MC, Blackman MR. Responses of growth hormone (GH) and somatomedin-C to GH-releasing hormone in healthy aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:595-600.

Peterson ME and Altszuler N. Suppression of growth hormone secretion in spontaneous canine hyperadrenocorticism and its reversal after treatment. *Am J Vet Res* 1981;42:1881-1883.

Poindexter AN, Dildy GA, Brody SA, Snabes MC, Brodyand SA. The effects of a long-acting progestin on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in women with normal menstrual cycles. *Contraception* 1993;48:37-45.

Reimer MK, Pacini G, Ahren B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2003;144:916-921.

Rijnberk A (1996). Hypothalamus-pituitary system. In: *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*, pp 11-34. Ed. A Rijnberk. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Render CL, Hull KL, Harvey S. Neural expression of the pituitary GH gene. *J Endocrinol* 1995;147:413-422.

Rudman D. Growth hormone, body composition and aging. *J Am Geriatr Soc* 1985;33:800-807.

Rutteman GR, Stolp R, Rijnberk A, Loeffler S, Bakker JA, Bevers MM, Meulenbergh PM, Eigenmann JE. Medroxy-progesterone acetate administration to ovariectomized, oestradiol-primed Beagle bitches. Effect on secretion of growth hormone, prolactin and cortisol. *Acta Endocrinol* 1987;114:275-282.

Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3997-4000.

Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolzt M, Luger A. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 2003;52:16-20.

Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A. Progestins and growth hormone excess in the dog. *Acta Endocrinol* 1991;125(Suppl):42-47.

Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E, Rijnberk A. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 1994a;134:287-92.

Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A. Progestin treatment in the dog: I. Effects on growth hormone, IGF-I, and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol* 1994b;131:413-421.

Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A. Progestin treatment in the dog: II. Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 1994c;131:422-430.

Selman PJ, Wolfswinkel J, Mol JA. Binding specificity of medroxyprogesterone acetate and proligestone for the progesterone and glucocorticoid receptor in the dog. *Steroids* 1996;61:133-7.

Senaris RM, Lago F, Coya R, Pineda J, Dieguez C. Regulation of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing hormone, and growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids. *Endocrinology* 1996;137:5236-5241.

Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 1996;54:279-286.

Sokolowski JH, Zimbelman RG. Canine reproduction: effects of a single injection of medroxyprogesterone acetate on the reproductive organs of the bitch. *Am J Vet Res* 1973;34:1493-1499.

Sonntag et al., 1980 Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 1980;107:1875-1879.

Sonntag WE, Steger RW, Forman LJ, Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 1980;107:1875-1879.

Soriano-Guillen L, Barrios V, Lechuga-Sancho A, Chowen JA, Argente J. Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Res* 2004;55:830-835.

Sugino T, Hasegawa Y, Kikkawa Y, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Terashima Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:255-260.

Sun YK, Xi YP, Fenoglio CM, Pushparaj N, O'Toole KM, Kledizik GS, Nette EG, King DW. The effect of age on the number of pituitary cells immunoreactive to growth hormone and prolactin. *Hum Pathol* 1984;15:169-180.

Takahashi Y, Ebihara S, Nakamura Y, Takahashi K. A model of human sleep-related growth hormone secretion in dogs: effects of 3, 6, and 12 hours of forced wakefulness on plasma growth hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology* 1981;109:262-272.

Takahashi S, Kawashima S, Seo H, Matsui N. Age-related changes in growth hormone and prolactin messenger RNA levels in the rat. *Endocrinol Jpn* 1990;37:827-840.

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4908-4911.

Tannenbaum GS, Ling N. The interrelationship of growth hormone releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of growth hormone secretion. *Endocrinology* 1984;115:1952-1957.

Terzolo M, Bossoni S, Ali A, Doga M, Reimonda G, Milani G, Peretti P, Manelli F, Angeli A, Giustina A. Growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone alone or combined with arginine in patients with adrenal incidentaloma: evidence for enhanced somatostatinergic tone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1310-1315.

Thakore JH and Dinan TG. Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids. *Life Sci* 1994;55:1083-1099.

Thomas GB, Fairhall KM, Robinson ICAF. Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by the Growth-Hormone (GH) Secretagogue, GH-Releasing Peptide-6, in rats. *Endocrinology* 1997;138:1585-1591.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908-913.

Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, Madersbacher S, Dirnhofner S, Berger P. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1997;130:53-60.

van Buul-Offers SC and Kooijman R. The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:1083-1094.

van Garderen E, De Wit M, Voorhout WF, Rutteman GR, Mol JA, Nederbragt H, Misdorp W. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: Evidence for a potential autocrine/ paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol* 1997;150:1037-47.

van Garderen E, van der Poel HJ, Swennenhuis JF, Wissink EH, Rutteman GR, Hellmen E, Mol JA, Schalken JA. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* 1999;140:5907-5914.

Voss TC, Mangin TM, Hurley DL. Insulin-like growth factor-1 causes a switch-like reduction of endogenous growth hormone mRNA in rat MtT/S somatotroph cells. *Endocrine* 2000;13:71-79.

Wajchenberg BL, Liberman B, Gianella Neto D, Morozimato MY, Semer M, Bracco LO, Salgado LR, Knoepfelmacher M, Borges MHS, Pinto ACAR, Kater CE, Lengyel AMJ. Growth hormone axis in Cushing's syndrome. *Horm Res* 1996;45:99-107.

Walker RF, Codd EE, Barone FC, Nelson AH, Goodwin T, Campbell SA. Oral activity of the growth hormone releasing peptide His-DTrp-Ala-trp-Dphe-Lys-NH₂ in rat, dogs, monkeys. *Life Sci* 1990;47:29-36.

Walker RF, Yang S-W, Bercu BB. Robust growth hormone (GH) secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and GH-releasing hormone (GHRH). *Life Sci* 1991;49:1499-1504.

Watson ADJ, Rutteman GR, Rijnberk A, Mol JA. Effects of somatostatin analogue SMS 201-995 and antiprogesterin agent RU486 in canine acromegaly. *Front Horm Res* 1987;17:193-198.

Watson S, Porter RJ, Young AH. Effect of hydrocortisone on the pituitary response to growth hormone releasing hormone. *Psychopharmacology* 2000;152:40-46.

Wehrenberg WB, Baird A, Ling N. Potent interaction between glucocorticoids and growth hormone-releasing factor in vivo. *Science* 1983;221:556-558.

Wehrenberg WB, Bergman PJ, Stagg L, Ndon J, Giustina A. Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with somatostatin antibodies. *Endocrinology* 1990;127:2705-2708.

Willemse PHB, Dikkeschei LD, Tjabbes T, Vanveelen H, Sleijfer DT. Adrenal steroids as parameters of the bioavailability of MA and MPA. *Eur J Cancer* 1990;26:359-62.

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

Wilshire GB, Loughlin JS, Brown JR, Adel TE, Santoro N. Diminished function of the somatotrophic axis in older reproductive-aged women. *J Endocrinol Metab* 1995;80:608-613.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000;141:4325-4328.

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5992.

Yokoyama M, Nakahara K, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin in healthy dogs. *Eur J Endocrinol* 2005;152:155-160.

Zadik Z, Chalew SA, Mc Carter RJ Jr, Meistas M, Kowarski AA. The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J Endocrinol Metab* 1985;60:513-516.

