



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Α΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΕΡΕΥΝΑΣ "Ν.Σ. ΧΡΗΣΤΕΑΣ"**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΔΙΑΜΑΝΤΗ – ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ

**« ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΓΛΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΙΜΥΩΝ »**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΣΧΟΝΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ – ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΔΙΑΜΑΝΤΗ – ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ

**« ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΓΛΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ
ΜΥΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΥΩΝ »**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΣΧΟΝΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ – ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

Γ΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ

Α΄ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Γ. ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΕΡΕΥΝΑΣ "Ν.Σ. ΧΡΗΣΤΕΑΣ"**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Δ. ΠΕΡΡΕΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΥΠΟΒΟΛΗΣ ΑΙΤΗΣΗΣ 07/07/2006

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 06/10/2006

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

1. **Ευανθία Διαμάντη –Κανδαράκη**, Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού – Διευθύντρια Γ΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής, Νοσοκομείο «Σωτηρία»
2. **Διονύσιος Μητρόπουλος**, Καθηγητής Ουρολογίας, Α΄ Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο
3. **Αναστάσιος Ζέρβας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας, Α΄ Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 23/04/2007

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 31/03/2014

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. **Ευανθία Διαμάντη –Κανδαράκη**, Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού – Διευθύντρια Γ΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής
2. **Διονύσιος Μητρόπουλος**, Καθηγητής Ουρολογίας, Α΄ Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο
3. **Αναστάσιος Ζέρβας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας, Α΄ Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο
4. **Αθανάσιος Παπαβασιλείου**, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας- Διευθυντής Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας
5. **Πηνελόπη Κορκολοπούλου**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής
6. **Δέσποινα Περρέα**, Καθηγήτρια Πειραματικής Παθολογικής Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Διευθύντρια Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης «Ν. Σ. Χρηστέας»
7. **Χριστίνα Πυτέρη**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας

ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΣΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΣ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΥΣΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ,
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΣΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΒΕΣΘΑΙ ΕΣΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΣΕΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Στην οικογένεια μου

*και σε όσους με στήριξαν στο ωραίο αυτό ταξίδι
και συνεχίζουν να με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα*

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Εκπαίδευση

Απρ 2007-σήμερα	Υποψήφιος Διδάκτορας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σεπτ 1997 - Ιούλ 2003	Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών Βαθμός πτυχίου: Λίαν καλώς (7.67)
Σεπτ 1996 - Ιούν 1997	Τμήμα Οδοντοτεχνικής Τ.Ε.Ι. Αθήνας
Σεπτ 1993 - Ιούν 1996	1 ^ο Λύκειο Νέου Ψυχικού Βαθμός Απολυτηρίου: Άριστα (19.6/20)

Επαγγελματική εμπειρία

Απρ 2013 – Σήμερα	Specialty Urology Doctor in Buckinghamshire NHS Trust Urology Department
Νοε 2012 – Απρ 2013	Locum Specialty Registrar University Hospital of Oxford Urology Department
Μαρ 2009 - Μαί 2012	Ειδικευόμενος Ουρολογίας στην Ουρολογική Κλινική του ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» Αθήνας
Νοέ 2006 - Νοέ 2007	Ειδικευόμενος Ουρολογίας στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Κορίνθου
Ιαν 2005 - Οκτ 2006	Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στην Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Πρέβεζας
Ιαν 2004 - Δεκ 2004	Αγροτικός ιατρός Κ.Υ. Καρλοβάσου Σάμου για την εξυπηρέτηση Κοινότητας Άνω Βαθέος
Οκτ 2003 - Ιαν 2004	Τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στον Παθολογικό, Χειρουργικό και Καρδιολογικό Τομέα του Γενικού Νοσοκομείου Σάμου

Εθελοντική εργασία

Οκτ 2011-Μια 2012	Συμμετοχή στην κατάρτιση του πίνακα κωδικοποιήσεων ιατρικών πράξεων στην ειδικότητα Ουρολογίας για το Υπουργείο Υγείας με τον Διευθυντή της Ουρολογικής Κλινικής του ΓΝΑ Γεννηματάς Δρ. Νικόλαο Παπανδρέου
Απρ 2006	Εκπαιδευτής στα σεμινάρια επείγουσας Ιατρικής που διοργανώθηκαν από την Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Γενικό Νοσοκομείο Πρέβεζας
Ιαν 2004 - Δεκ 2004	Εθελοντική συμμετοχή στο πρόγραμμα «Βοήθεια στο Σπίτι» του Δήμου Βαθέος Σάμου
Οκτ 2004 - Δεκ 2004	Διδασκαλία του μαθήματος «Βασικές Αρχές Χειρουργικής» στη Σχολή βοηθών Νοσηλευτών του Γενικού Νοσοκομείου Σάμου

Άδειες - Τίτλοι

Ιούνιος 2012	Τίτλος Fellow of the European Board of Urology - FEBU
Μάιος 2012	Τίτλος Ιατρικής ειδικότητας Ουρολογίας
Σεπτ 2004	Επιτυχής παρακολούθηση σεμιναρίου Advanced Trauma Life Support(ATLS)
Αύγ 2003	Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος

Επαγγελματικές ενώσεις

Μαρ 2012	Μέλος General Medical Council UK
Οκτώβριος 2010	Εκπρόσωπος ειδικευομένων στην επιτροπή εκπαίδευσης της Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας για την περίοδο 2010-2012
Ιαν 2010	International Resident Membership in the American Urological Association
Φεβ 2006	Μέλος της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ειδικευομένων Ουρολογίας της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας

Ανακοινώσεις / Συμμετοχές σε Συνέδρια

1. «ΚΑΚΩΣΕΙΣ ΝΕΦΡΟΥ ΜΕ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ: ΕΙΝΑΙ ΑΡΚΕΤΗ Η ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ;»
Σ. Σαββαΐδης, **Δ. Μοσχονάς**, Γ. Μέγας, Σ. Λιβασιάνης, Γ. Σταθούρος, Γ. Παπαδόπουλος
Ουρολογική Κλινική, Γ.Ν.Α. "Γ Γεννηματάς" - 38ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
16-19 Μαΐου 2012 Αθήνα
2. «ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΣΤΟΜΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ PIG TAIL ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΥΕΛΟΝΕΦΡΙΤΙΔΑΣ.»
Σ. Λιβασιάνης, **Δ. Μοσχονάς**, Σ. Σαββαΐδης, Χ. Γκίκας, Ο. Αρίστας, Κ. Ντούμας
Ουρολογική Κλινική, Γ.Ν.Α. "Γ Γεννηματάς" - 38ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
16-19 Μαΐου 2012 Αθήνα
3. «ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΥΣΤΕΩΣ ΣΕ ΥΠΕΡΗΛΙΚΕΣ: ΑΥΞΑΝΕΙ Η ΗΛΙΚΙΑ ΤΗ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΙΖΙΚΗΣ ΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗΣ;»
Δ. Μοσχονάς, Μ. Κοντράρος, Χ. Γκίκας, Γ. Παπαδόπουλος, Κ. Ντούμας, Γ. Σταθούρος
Ουρολογική Κλινική Γ.Ν.Α. "Γ. Γεννηματάς" - 38ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
16-19 Μαΐου 2012 Αθήνα
4. «Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΗ ΓΕΛΗΣ ΣΤΗΝ ΕΥΚΑΜΠΤΗ ΚΥΣΤΕΟΣΚΟΠΗΣΗ: ΑΞΙΖΕΙ ΝΑ ΠΕΡΙΜΕΝΕΙΣ Η ΟΧΙ;»
Χ. Γκίκας, Σ. Λιβασιάνης, **Δ. Μοσχονάς**, Σ. Σαββαΐδης, Ι. Γκιάλας, Κ. Ντούμας
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» - 38ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 16-
19 Μαΐου 2012 Αθήνα
5. 9^η Συνάντηση των Ουρολογικών Κλινικών ΕΣΥ της Αθήνας «Βιβλιογραφική Ενημέρωση» - Πέμπτη 30 Ιουνίου 2011: Κοντράρος Μιχαήλ, Μοσχονάς Δημήτριος, Μέγας Γεώργιος, Συντονιστής Παπαδόπουλος Γεώργιος

6. "DOES THE TECHNIQUE OF BLADDER NECK DISSECTION DURING OPEN RADICAL RETROPUBIC PROSTATECTOMY AFFECT THE RATE OF POSITIVE SURGICAL MARGIN?"

Moschonas D., Spanopoulos S., Stathouros, G., Megas, G., Savvaidis, S., Ntoumas, K., Fragoulis A., General Hospital of Athens "G Gennimatas", Dept. of Urology, Athens, Greece -26th EAU Congress 2011 Vienna

7. «OUR EXPERIENCE WITH OPEN RADICAL PROSTATECTOMY THROUGH A 6CM INCISION FOR THE TREATMENT OF LOCALISED PROSTATE CANCER »

Moschonas D., Stathouros G., Kontraros M., Trimmis E., Gkialas I., Ntoumas K. General Hospital of Athens " G Gennimatas" - 6th South Eastern European Meeting (SEEM) 01 Oct - 02 Oct 2010 EAU Istanbul Turkey

8. «BODY MASS INDEX AND RADICAL CYSTECTOMY. DOES HIGH BODY WEIGHT INCREASE THE MORBIDITY OF THE PROCEDURE? »

Spanopoulos S., Kontraros M., **Moschonas D.**, Stathouros G., Gkialas I., Ntoumas K. General Hospital of Athens " G Gennimatas" - 6th South Eastern European Meeting (SEEM) 01 Oct - 02 Oct 2010 EAU Istanbul Turkey

9. «ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΑΜΣΟΥΛΟΣΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΒΟΛΗ ΛΙΘΩΝ ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΤΡΙΤΗΜΟΡΙΟΥ ΟΥΡΗΤΗΡΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ < 1cm »

Μοσχονάς Δ., Τρίμμης Ε., Κοντράρος Μ., Σταθούρος Γ., Γκιάλας Ι., Φραγκούλης Α. Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

10. «ΠΕΡΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΟΛΠΙΚΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΣΕ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗΣ ΤΑΙΝΙΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΤΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΚΡΑΤΕΙΑΣ ΑΠΟ ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΑ »

Μοσχονάς Δ., Τρίμμης Ε., Σαββαΐδης Σ., Σταθούρος Γ., Ντούμας Κ., Φραγκούλης Α. Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

11. «ΤΑ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΟΥΡΗΘΡΙΚΗΣ ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΤΟΥ ΟΥΡΗΤΗΡΙΚΟΥ ΚΟΛΟΒΩΜΑΤΟΣ (PLUQ) ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΑΝΟΙΚΤΗ ΕΚΤΟΜΗ ΤΟΥ ΣΕ ΝΕΦΡΟΟΥΡΗΤΗΡΕΚΤΟΜΗ ΓΙΑ ΤCC »

Μοσχονάς Δ., Λιβασιάνης Σ., Σαββαΐδης Σ., Σταθούρος Γ., Γκιάλας Ι., Ντούμας Κ.
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο
23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

12. «ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ Ο ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΤΟΥ ΚΥΣΤΙΚΟΥ ΑΥΧΕΝΑ ΣΕ ΡΙΖΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΩΝ ΟΡΙΩΝ; »

Σπανόπουλος Σ., Σταθούρος Γ., **Μοσχονάς Δ.**, Μέγας Γ., Σαββαΐδης Σ., Ντούμας Κ.
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό
Συνέδριο 23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

13. «ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΡΙΖΙΚΗ ΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗ. ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΟ ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΤΗ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ; »

Σπανόπουλος Σ., Κοντράρος Μ., **Μοσχονάς Δ.**, Σταθούρος Γ., Αρίστας Ο.,
Λιακατάς Ι. Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο
Ουρολογικό Συνέδριο 23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

14. «ΤΟ ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΟ PSA ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΑΥΤΙΣΗΣ ΤΟΥ GLEASON SCORE ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΟΡΘΙΚΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΚΑΙ ΡΙΖΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗΣ»

Τρίμμης Ε., Σπανόπουλος Σ., **Μοσχονάς Δ.**, Μέγας Γ., Σταθούρος Γ., Ντούμας Κ.
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό
Συνέδριο 23 - 27 Οκτωβρίου 2010 Λεμεσός Κύπρου

15. 8^η Συνάντηση των Ουρολογικών Κλινικών ΕΣΥ της Αθήνας «Βιβλιογραφική Ενημέρωση» - Πέμπτη 27 Μαΐου 2010 : Κοντράρος Μιχάλης και Μοσχονάς Δημήτρης, Συντονιστής Σταθούρος Γεώργιος.

16. «ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΙΚΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΡΟΦΟΥ ΜΕΤΑ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΠΕΪΚΗΣ ΠΡΟΘΕΣΗΣ AMS 700»

Γ. Σταθούρος, Μ. Κοντράρος, **Δ. Μοσχονάς**, Γ. Μέγας, Ι. Γκιάλας, Κ. Ντούμας
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ «Γ.Γεννηματάς» - 36ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό
Συνέδριο - 4-8 Μαΐου 2010 Αθήνα

17. «ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΑΙΝΙΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ (MINIARC, TVT SECURE) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑΣ ΑΚΡΑΤΕΙΑΣ»

Μ. Κοντράρος, Γ. Σταθούρος, **Δ. Μοσχονάς**, Σ. Σπανόπουλος, Ι. Γκιάλας, Κ. Ντούμας

Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» - 36ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο - 4-8 Μαΐου 2010 Αθήνα

18. «ΚΑΚΩΣΕΙΣ ΑΥΧΕΝΟΣ ΚΥΣΤΕΩΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΤΗ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΚΑΤΑΓΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΥΕΛΟΥ. ΤΥΠΟΙ ΚΑΚΩΣΕΩΝ, ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ»

Σ. Σαββαΐδης, Μ. Κοντράρος, **Δ. Μοσχονάς**, Γ. Σταθούρος, Ι. Γκιάλας, Κ. Ντούμας
Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» - 36ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο - 4-8 Μαΐου 2010 Αθήνα

19. «ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΕΝΔΟΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΩΝ ΡΗΞΕΩΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ»

Δ. Μοσχονάς, Σ. Σαββαΐδης, Ο. Αρίστας, Σ. Λιβασιάνης, Γ. Σταθούρος, Κ. Ντούμας

Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς» - 36ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο - 4-8 Μαΐου 2010 Αθήνα

20. «ΑΝΟΙΚΤΗ ΡΙΖΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ ΜΕ ΤΟΜΗ 6 ΕΚ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ. ΜΙΑ ΝΕΑ ΕΛΑΧΙΣΤΑ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ»

Γ. Σταθούρος, Μ. Κοντράρος, **Δ. Μοσχονάς**, Σ. Μπολομύτης, Ι. Γκιάλας, Κ. Ντούμας

Ουρολογική Κλινική ΓΝΑ "Γ. Γεννηματάς" - 36ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο - 4-8 Μαΐου 2010 Αθήνα

21. «ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS – AGES) ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ»

Δ. Μοσχονάς, Δ. Μητρόπουλος, Χ. Πιτέρη, Δ. Περρέα, Χ.Αδαμόπουλος, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη, Α.Γ. Παπαβασιλείου - 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 1-5/10/2008. *Ελεύθερη Ανακοίνωση*

22. «ΟΥΡΗΘΡΙΚΑ «STENTS» ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΗ ΜΝΗΜΗ ΣΤΟ Γ.Ν. ΚΟΡΙΝΘΟΥ. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ- ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.»
Θ. Καραολίδης, **Δ. Μοσχονάς**, Γ. Λουκά, Ι. Ξωξάκος, Σ. Στοκίδης, Δ. Στοκίδης - 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 1-5/10/2008. *Αναρτημένη Ανακοίνωση*
23. «ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS – AGES) ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥΣ RAGE ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ ΑΡΡΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ»
Δ. Μοσχονάς, Δ. Μητρόπουλος, Χ. Πιπέρη, Δ. Περρέα, Ε. Διαμάντη- Κανδαράκη, Α.Γ. Παπαβασιλείου - 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 1-5/10/2008. *Ελεύθερη Ανακοίνωση*
24. «ΑΝΑΛΥΣΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΟΥΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΤΟ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ Γ.Ν. ΚΟΡΙΝΘΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΘΗΣΗ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ»
Π. Παπαδόπουλος, Ι. Ξωξάκος, **Δ. Μοσχονάς**, Γ. Λουκά, Σ. Στοκίδης, Δ. Στοκίδης- 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 1-5/10/2008. *Αναρτημένη Ανακοίνωση*
25. «ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ»
Δ. Μοσχονάς, Δ. Μητρόπουλος, Χ. Πιπέρη, Δ. Περρέα, Χ. Αδαμόπουλος, Α. Παπαβασιλείου, Ε. Διαμάντη-Κανδαράκη - 35^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, 19-22/3/2008. *Ελεύθερη Ανακοίνωση*
26. «ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΟΥΡΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΟΥΣΑ ΚΑΙ ΚΑΤΙΟΥΣΑ ΟΥΡΟΓΡΑΦΙΑ»
Γ. Λουκά, Θ. Καραολίδης, **Δ. Μοσχονάς**, Ε. Μπαρμπαγιάννη, Ε. Σταμούλη, Ε. Χαχάμης, Χ. Κέντον, Δ. Στοκίδης - 10^ο Ετήσιο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος, Λουτράκι, 19-20 Μαΐου 2007. *Προφορική Ανακοίνωση*

27. «ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΚΤΙΝΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ. ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ GUIDELINES ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΑΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ESUR»

Θ. Καραολίδης, **Δ. Μοσχονάς**, Ε. Μπαρμπαγιάννη, Ε. Χαχάμης, Γ. Λουκά, Χ. Κέντον, Δ. Στοκίδης, Α. Σουσσούνης - 10^ο Ετήσιο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος, Λουτράκι, 19-20 Μαΐου 2007. *Αναρτημένη Ανακοίνωση*

28. «ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ ΑΠΟ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΑ ΜΕΣΑ»

Ε. Μπαρμπαγιάννη, Ε. Χαχάμης, Χ. Κέντον, Ε. Σταμούλη, Ι. Θεοδωράκης, Γ. Λουκά, Θ. Καραολίδης, **Δ. Μοσχονάς**, Α. Σουσσούνης - 10^ο Ετήσιο Συνέδριο Ακτινολόγων Νοτιοδυτικής Ελλάδος, Λουτράκι, 19-20 Μαΐου 2007. *Αναρτημένη Ανακοίνωση*

29. Μέλος της Οργανωτικής επιτροπής του 4^{ου} Σεμιναρίου Επείγουσας Ιατρικής, Πρέβεζα, 21-23 Σεπτεμβρίου 2007.

30. Μέλος της Οργανωτικής επιτροπής του 3^{ου} Σεμιναρίου Επείγουσας Ιατρικής, Πρέβεζα, 15-17 Απριλίου 2005.

Βραβεία - Υποτροφίες

1. The Karl Storz 3rd prize for best poster presentation for the abstract on “OUR EXPERIENCE WITH OPEN RADICAL PROSTATECTOMY THROUGH A 6CM INCISION FOR THE TREATMENT OF LOCALISED PROSTATE CANCER” at the EAU 6th SEEM in Istanbul, Turkey, 1-2 October 2010

2. 1^ο βραβείο για ελεύθερη ανακοίνωση στο 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο για την εργασία «ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS – AGES) ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ».

3. Υποτροφία του ΙΜΟΠ για εβδομαδιαία επίσκεψη (22-28/10/2102) στο κέντρο αριστείας του εξωτερικού, στην Ουρολογική Κλινική του νοσοκομείου Pitié-Salpêtrière στο Παρίσι

Δημοσιεύσεις

«Impact of diet-induced obesity in male mouse reproductive system: The role of advanced glycation end product-receptor for advanced glycation end product axis»

Moschonas DP, Piperi C, Korkolopoulou P, Levidou G, Kavantzias N, Trigka EA, Vlachos I, Arapostathi C, Perrea D, Mitropoulos D, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014 May 28 [Epub ahead of print]

"Comparison of efficacy and satisfaction profile, between penile prosthesis implantation and oral PDE-5 inhibitor Tadalafil therapy, in men with nerve –sparing radical prostatectomy erectile dysfunction"

Megas G., Papadopoulos G., Stathouros G., Moschonas D., Gkialas I., Ntoumas K. *BJU Int*. 2013 Jul;112(2):E169-76

"Re: Kreshover et al.: Predictors for negative ureteroscopy in the management of upper urinary tract stone disease)."

Papadopoulos G, Megas G, Moshonas D, Doumas K. (*Urology* 2011;78:748-752)*Urology* 2012 Apr;79(4):972-3; author reply 973.

"Radiofrequency ablation of renal tumors in patients unfit for surgery. Our experience"

I. Gkialas, M. Kontraros, P. Vassilakis, S. Spanopoulos, E. Theodoropoulos, G. Stathouros, D. Moschonas, K. Ntoumas
J BUON vol. 16, no. 2, 2011

«Όψιμος υπογοναδισμός (σύνδρομο LOH) και θεραπεία υποκατάστασης με τεστοστερόνη»

Θ. Καραολίδης, Δ. Μοσχονάς, Γ. Λουκά
Info Urology T. 46 Απρ-Μάι-Ιούν 2007

Συνεχής Κατάρτιση

Παρακολούθηση ποικίλων συνεδρίων, εκδηλώσεων, σεμιναρίων

12-16 Μαρ 2012	7 ^η Εκπαιδευτική Εβδομάδα Ελλήνων Ειδικευομένων Ουρολόγων
14-16 Οκτ 2011	1 ^ο Κλινικό Φροντιστήριο Λειτουργικής και Επανορθωτικής Ουρολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών
2-7 Σεπτ 2011	2011 European Urology Residents Educational Program, Prague, Czech
14-19 Μαί 2011	AUA Annual Meeting 2011, Washington DC, USA
18-22 Μαρ 2011	26 th Annual EAU Congress, Vienna, Austria
15 Ιαν 2011	Σεμινάριο Ανδρικής Υπογονιμότητας από το τμήμα ΑΝΔΡΥΠΟ της Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας
23-27 Οκτ 2010	20 ^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Λεμεσός, Κύπρος
17-19 Σεπτ 2010	Innovation in Urology, Milan
25-28 Φεβ 2010	3 rd World Congress on Controversies in Urology, Athens
11-12 Δεκ 2009	“Istanbul Urolitiazis Gunleri”, Istanbul
1-5 Οκτ 2008	19 ^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική
19-21 Σεπτ 2008	8 ^ο Πανελλήνιο Ανδρολογίας - Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Ανδρολογίας, Αθήνα
10-11 Μαΐ 2008	28ες Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες, Αθήνα
19-22 Μαρ 2008	35 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα
1 Μαρ 2008	Ημερίδα «Ρομποτική Χειρουργική Παρόν και Μέλλον», Αθήνα
2-3 Φεβ 2008	4 ^ο Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας, Αθήνα
11-14 Δεκ 2007	1 ^ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Πειραματικής Βιοϊατρικής Έρευνας, Αθήνα
4-7 Οκτ 2007	“Innovations And Evidence Based Medicine in Urology” και “Hands on Training Workshop on Laparoscopy And Ureteroscopy”, Αθήνα

7-10 Ιούν 2007	2 ^η Πανελλήνια Επιστημονική Συνάντηση του Τμήματος Ουρογεννητικής Ογκολογίας, Καλαμπάκα
21-24 Μαρ 2007	22 ^ο Ετήσιο Συνέδριο της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας, Βερολίνο, Γερμανία
17 Μαρ 2007	1 ^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο του Τμήματος Ενδοουρολογίας-Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής Ουρολογίας, Αθήνα
9-11 Φεβ 2007	1 ^ο Ουρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας, Λάρισα
2006 - 2012	Παρακολούθηση Επιστημονικών Συνεδριών Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας, Αμφιθέατρο ΝΙΜΤΣ, Αθήνα
1 Δεκ 2006	«Λοιμώξεις: Από την πρόληψη στη θεραπεία», Λουτράκι
15-18 Ιούν 2006	1 st Athenian EuroAmerican Congress of urology, Αθήνα
17-19 Μαρ 2006	5 ^ο Ανδρολογικό Συμπόσιο Πάτρας και Κλινικό Φροντιστήριο του Τμήματος Ανδρολογίας και Υπογονιμότητας (ΑΝΔΡΥΠΟ)

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Άριστο επίπεδο - Proficiency Certificate in English (Cambridge University)

Γαλλικά: Ικανοποιητικό επίπεδο - DELF, Certificat de langue française (Institut Français)

Γνώσεις Η/Υ

MS Office (Word, Excel, Power Point), Related to Internet Application-Software

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη διατριβή μου. Πυρήνα της έμπνευσης του θέματος, της οργάνωσης και της διεκπεραίωσης αυτής της εργασίας αποτέλεσε η καθηγήτρια κα Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη, στην οποία ως Επιβλέπουσα της Διατριβής οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη μοναδική ευκαιρία που μου έδωσε, την άρτια καθοδήγηση και την αμέριστη στήριξη που μου παρείχε. Με εισήγαγε στην ιατρική έρευνα, με κατεύθυνε στην ορθή επιστημονική σκέψη και με την αφοσίωσή της συνέβαλε ουσιαστικά στην πολυπόθητη για εμένα κατάκτηση του στόχου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Ουρολογίας κύριο Διονύσιο Μητρόπουλο, ο οποίος ήταν μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και μου εμπιστεύτηκε το υλικό του πειράματος. Η βαθιά του επιστημονική κατάρτιση, ο τρόπος του να μεταδίδει τη γνώση και η εξαιρετική υπομονή του στη διάρκεια της διατριβής θα αποτελούν για μένα παράδειγμα. Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που στην εξέλιξη της προσπάθειας αυτής συναντήθηκα με τον Καθηγητή μου από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Πατρών, κύριο Αθανάσιο Παπαβασιλείου, ο οποίος είναι Διευθυντής του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την υποστήριξη και την ενθάρρυνση ως προς την πραγματοποίηση της μελέτης, όπως επίσης και για τις καινοτόμες επιστημονικές του συμβουλές, οι οποίες στις δύσκολες καμπές της προσπάθειας αυτής σημαντικά συνέβαλαν στην εξέλιξη αφού χωρίς τη συμβολή του το αποτέλεσμα δε θα ήταν ίδιο. Σημαντική ήταν και η προσφορά του Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας κύριου Αναστασίου Ζέρβα, χωρίς τη συγκατάθεση του οποίου δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί η προσπάθεια αυτή.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια Κυρία Χριστίνα Πιπέρη, για την πολύτιμη συμβολή της στην κατανόηση βιοχημικών μονοπατιών, απαραίτητων για τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας, τη βοήθειά της στην εκμάθηση και εφαρμογή της εργαστηριακής μεθοδολογίας, την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της δημοσίευσης και της διατριβής. Παράλληλα υποχρεωμένος αισθάνομαι στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας,

κυρία Πηνελόπη Κορκολοπούλου, η οποία επιλήφθηκε των παθολογοανατομικών μελετών και συνέβαλε σημαντικά στη συγγραφή της δημοσίευσης. Μοιραστήκαμε και με τις δύο ατέλειωτες, δημιουργικές και ευχάριστες ώρες κάνοντας πειράματα και αναζητώντας αποτελέσματα. Οφείλω να αναγνωρίσω ότι με στήριξαν επιστημονικά και ψυχολογικά σε όλες τις φάσεις.

Το αρχικό πειραματικό σκέλος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν. Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την καθοδήγηση του καθηγητή Κ. Κατσιλάμπρου, του οποίου ήταν η ιδέα του αρχικού πρωτοκόλλου και συνέβαλε με την προσωπική του εργασία στην υλοποίηση και την επίβλεψη εκ του σύνεγγυς της εκτέλεσης καθώς και της καθηγήτριας κυρίας Περρέα, την οποία ιδιαίτερα ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη της. Θα ήθελα εδώ να αναφερθώ ονομαστικά στην κυρία Χριστίνα Αραποστάθη, που ήταν υπεύθυνη για την εκτέλεση του πειράματος, την κυρία Ειρήνη Τζανετάκη, κλινική διαιτολόγο που συνεργάστηκε μαζί μου για την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από το διατροφικό πρότυπο των πειραματοζώων και τον κύριο Ιωάννη Βλάχο, ο οποίος ανέλαβε τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα επίσης ευχαριστώ την κυρία Γεωργία Λεβίδου, ιατρό – Παθολογοανατόμο, η οποία με βοήθησε σημαντικά στην αρχική αξιολόγηση των ιστολογικών ευρημάτων και στη στατιστική ανάλυση. Δε μπορώ εξάλλου να μην αναφερθώ στην κυρία Μαρία Κεμερλή η οποία ανέλαβε την εκτέλεση των ανοσοοϊστοχημικών χρώσεων.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους υπόλοιπους ερευνητές που στελεχώνουν το εργαστήριο της Βιολογικής Χημείας και εκπόνησαν παράλληλα τις διατριβές τους για τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες που μοιραστήκαμε καθώς και την ευχάριστη συνεργασία που αναπτύξαμε.

Θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία αυτή στους γονείς μου ως ελάχιστη ανταμοιβή των κόπων τους, στον αδερφό μου που είναι πάντα δίπλα μου και σε όσους με τον τρόπο τους με στήριξαν στο μακρύ και δύσκολο αυτό ταξίδι και συνεχίζουν να με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παχυσαρκία αποτελεί συστηματική διαταραχή με επιπτώσεις σε διάφορα όργανα μεταξύ των οποίων και το ουροποιογεννητικό σύστημα. Η υπεργλυκαιμία, η υπερλιπιδαιμία και το οξειδωτικό stress, στα πλαίσια της παχυσαρκίας οδηγούν στο σχηματισμό τοξικών μεταβολικών προϊόντων, των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products - AGEs), που εναποτίθενται στους ιστούς με βλαπτικές επιδράσεις. Η εξωγενής πρόσληψη και η ενδογενής συσσώρευση συμβάλλουν στην παθογένεια μεταβολικών και αναπαραγωγικών διαταραχών τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την επίδραση διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα [saturated fatty acids (SAFA)] στο λιπιδαιμικό και μεταβολικό προφίλ (επίπεδα AGE, οξειδωτικό stress) καθώς επίσης και στις ιστοπαθολογικές (έκφραση AGE, RAGE, απόπτωση) και μορφομετρικές παραμέτρους του αναπαραγωγικού συστήματος αρρένων μυών C57BL6 *in vivo*. Μετά την εκδήλωση παχυσαρκίας τα αποτελέσματα της χορήγησης διατροφής πλούσιας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα [monounsaturated fatty acids (MUFA)] ή ίσης περιεκτικότητας MUFA και SAFA εκτιμήθηκαν. Τα πειραματόζωα της ομάδας SAFA παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης ($p < .05$) σε σύγκριση με τους μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα AGE και υπεροξειδίων δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ομάδων πειραματισμού. Αυξημένη εναπόθεση AGE ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στα γαμετικά κύτταρα με υψηλότερη ένταση χρώσης σε ζώα με υψηλή σε SAFA διατροφή, σε σύγκριση με τη MUFA ή MUFA-SAFA τροφή ή τους μάρτυρες ($p = .018$). Στα κύτταρα Leydig, η εντόπιση AGE ήταν υψηλότερη στην ομάδα πειραματοζώων με τροφή υψηλή σε λιπαρά σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p < .05$). Επίσης παρουσιάζουν αυξημένο αποπτωτικό δείκτη στα σπερματικά τους κύτταρα ($p < .005$). Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της πτύχωσης του βλεννογόνου του προστάτη των ζώων, η οποία αντιστράφηκε μετά τη χορήγηση της τροφής MUFA. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του άξονα AGE-RAGE σε διαταραχές των όρχεων και του προστάτη στα πλαίσια της προκαλούμενης από τη διατροφή παχυσαρκίας. Απλές διατροφικές παρεμβάσεις θα μπορούσαν να έχουν ευεργετική επίδραση στη μεταβολική δυσλειτουργία του

αναπαραγωγικού συστήματος πριν την εκδήλωση συστηματικών μεταβολικών διαταραχών, υποδεικνύοντας τη γλυκοζυλίωση ως υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο.

SUMMARY

Obesity represents a route to broad physiological dysfunction affecting major organs including male urogenital system. Hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress associated with obesity augment the formation of reactive metabolic byproducts, namely advanced glycation end products (AGEs), leading to increased tissue deposition and damage. The exogenous intake and the endogenous accumulation of AGEs contribute to metabolic and reproductive abnormalities in both females and males. The present study assessed the effects of a diet high in saturated fatty acids (SAFA) on the lipid and metabolic profile (AGE levels, oxidative stress) as well as pathogenic (AGE, RAGE expression, apoptosis) and morphometric parameters of male reproductive system *in vivo*. Effects of switching to a diet rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) or equal in the proportion MUFA to SAFA were further investigated. SAFA-fed animals were characterized by increased serum lipid concentrations ($p < .05$) compared to controls, but AGEs and peroxide levels were not significantly different across the different experimental groups. Elevated AGE deposition was detected for the first time in germ cells with a higher staining intensity in animals on the SAFA diet, compared to MUFA or MUFA-SAFA-fed animals or the control samples ($p = .018$). In Leydig cells, AGE localization was higher in the entire cohort of high-fat fed animals compared to controls ($p < .05$). High-fat fed mice displayed enhanced apoptosis compared to controls ($p < .005$). Furthermore, prostatic tissue demonstrated reduction in epithelial folding, an effect which was significantly reversed after MUFA diet administration. Our findings provide the basis for further investigation of AGE–RAGE axis in testicular and prostatic disturbances associated with diet-induced obesity. Simple dietetic intervention has beneficial effects on metabolic dysfunction of reproductive system before overt manifestations, indicating glycation as a promising therapeutic target.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ - ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΙ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ.....	6
1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της παχυσαρκίας.....	6
1.2 Επιδημιολογία παχυσαρκίας.....	9
1.3 Επιπτώσεις παχυσαρκίας.....	10
1.4 Μεταβολικό σύνδρομο – Ορισμοί.....	11
1.5 Πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.....	13
1.6 Επίδραση της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου στο ουροποιογεννητικό σύστημα.....	15
1.6.1 Συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και καλοήθους προστατικής υπερπλασίας.....	16
1.6.1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	16
1.6.1.2 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.....	18
1.6.2 Συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και καρκίνου προστάτη.....	21
1.6.2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	21
1.6.2.2 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.....	23
1.6.3 Συσχέτιση παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και στυτικής δυσλειτουργίας.....	25
1.6.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	25
1.6.3.2 Παθοφυσιολογικές συσχετίσεις παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και στυτική δυσλειτουργίας.....	26
1.6.4 Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ και ορχικής δυσλειτουργίας – υπογονιμότητας.....	29

1.6.4.1. Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με γονιμότητα και συχνότητα εγκυμοσύνης.....	29
1.6.4.2. Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος.....	30
1.6.4.3. Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με κατακερματισμό DNA.....	31
1.6.4.4. Παθοφυσιολογική συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ και υπογονιμότητας.....	32
1.7 Συμβολή του διατροφικού λίπους στην εμφάνιση παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου.....	35
1.7.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα (Saturated fatty acids – SFA).....	38
1.7.2 Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated fatty acids– MUFA).....	39
1.7.3 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids– PUFA).....	41
1.8 Διατροφικά λιπαρά οξέα και ουροποιηγεννητικό σύστημα.....	42
Προστάτης.....	42
Όρχεις –Σπέρμα.....	44
2. ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS): ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ, ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	46
2.1 Βιοχημεία γλυκοζυλίωσης και σχηματισμού AGEs.....	46
2.2 Πιθανά μονοπάτια σχηματισμού AGEs.....	48
2.3 Ταξινόμηση των τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης.....	54
2.4. Εξωγενείς πηγές.....	57
2.5 Αμυντικοί μηχανισμοί κατά της γλυκοζυλίωσης και των AGEs	58
2.6. Δράσεις των AGEs.....	60
Α. Εξωκυττάρειες δράσεις των AGEs.....	60
Β. Ενδοκυττάρειες δράσεις.....	62
Γ. Μεσολαβούμενες από υποδοχείς.....	63

2.7 Υποδοχέας RAGE.....	65
2.7.1 Δομή του RAGE.....	65
2.7.2 Ισομορφές του RAGE.....	66
2.7.3 Ο πολυσυνδεδετικός υποδοχέας RAGE.....	69
2.7.4 Μετάδοση του σήματος μέσω ενεργοποίησης του RAGE από τα AGEs.....	71
2.8 Σχέση AGEs με οξειδωτικό stress.....	75
2.9 AGEs και απόπτωση.....	77
2.10 AGEs και αναπαραγωγικό σύστημα θηλέων.....	78
2.11 AGEs και RAGE στο ουροποιογεννητικό σύστημα αρρένων.....	80
1. Ουροδόχος κύστη.....	80
2. Προστάτης.....	82
3. Όρχεις.....	85
4. Επιδιδυμίδα.....	87
5. Σπέρμα.....	88
6. Πέος.....	91
2.12 Φαρμακολογικές επιλογές κατά των AGEs και θεραπευτικές παρεμβάσεις..	94
2.12.1. Θεραπευτική στόχευση κατά των προϊόντων AGEs.....	94
2.12.2. Φαρμακολογική αναστολή συσσώρευσης AGEs και δράσης τους στο ουροποιογεννητικό.....	98
Ουροδόχος κύστη.....	98
Σπέρμα.....	99
Πέος.....	99
3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	102
3.1 Γενικές έννοιες/εισαγωγή.....	102
3.2 Μονοπάτια απόπτωσης και ρύθμιση της.....	104

3.2.1 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην ενεργοποίηση των προενζύμων/Η οικογένεια Bcl-2.....	109
3.2.2 Ο ρόλος άλλων γονιδίων στην απόπτωση.....	111
3.3 Μέθοδοι ανίχνευσης της απόπτωσης.....	112
3.4 Απόπτωση και σπερματογένεση.....	115
3.4.1 Απόπτωση των γεννητικών κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη.....	116
3.4.2 Απόπτωση των γεννητικών κυττάρων στον όρχι.....	117
3.4.3 Ορμονικός έλεγχος της απόπτωσης και της επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων.....	118
3.4.4 Απόπτωση και επιβίωση των σπερματοζωαρίων.....	120
3.4.5 Η προστασία των σπερματοζωαρίων από την αποπτωτική διαδικασία.....	123
3.4.6 Το οξειδωτικό stress και η απόπτωση στα σπερματοζωάρια.....	125
3.4.7 Διαταραχή της κινητικότητας του σπέρματος.....	127
3.4.8 Δείκτες της απόπτωσης στα σπερματοζωάρια.....	128
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	129
4.1 Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας των όρχεων μυός.....	131
4.2 Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας προστάτου μυός.....	135
4.3 Παρασκευή και μονιμοποίηση ουροποιογεννητικών οργάνων μυών..	140
ΣΚΟΠΟΣ.....	143
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	144
1.Α) ΕΠΙΛΟΓΗ ΖΩΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ.....	144
1.Β) ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	146

1.Γ) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ.....	146
1.Δ) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	147
1.Ε) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑΣ.....	152
1.ΣΤ) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑΣ.....	154
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	154
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	164
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	177
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	184

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ - ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΙ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΡΡΕΝΩΝ

Η παχυσαρκία έχει εξελιχθεί σε μείζον κοινωνικό πρόβλημα υγείας σε όλες της αναπτυγμένες χώρες και παρουσιάζει πλέον τάσεις εξάπλωσης ακόμη και στις αναπτυσσόμενες. Οφείλεται σε θετικό ισοζύγιο της προσλαμβανόμενης ενέργειας από τις τροφές, οι οποίες είναι συνήθως πλούσιες σε λιπαρά, έναντι της καταναλισκομένης με το βασικό μεταβολισμό, τη θερμογένεση και τη φυσική δραστηριότητα. Η περίσσεια της προσλαμβανόμενης ενέργειας αποθηκεύεται με μορφή λίπους στον οργανισμό, το οποίο όταν υπερβεί ένα συγκεκριμένο επίπεδο παραβλάπτει την υγεία. Με τα σημερινά δεδομένα αποτελεί τη δεύτερη, μετά το κάπνισμα, προβλέψιμη αιτία θανάτου, παρά τα τεράστια χρηματικά ποσά που δαπανώνται τόσο για την πρόληψή της, όσο και για την αντιμετώπισή της, αλλά κυρίως για την αντιμετώπιση των πολλών νοσημάτων που άμεσα ή έμμεσα σχετίζονται με αυτήν.

1.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία πολυπαραγοντική διαταραχή καθώς η ανάπτυξή της εξαρτάται από πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος. Η σημαντική αύξηση στον επιπολασμό των υπέρβαρων και παχύσαρκων τα τελευταία 30 χρόνια ήταν παγκοσμίως διαδεδομένη και έχει προκύψει σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα (Ng et al, 2014). Οι θεωρίες που αιτιολογούν την επιδημική αύξηση θα πρέπει συνεπώς να περιλαμβάνουν τόσο τη χρονική διάσταση όσο και τη γεωγραφική διασπορά.

Ο άξονας εγκέφαλος-γαστρεντερικός σωλήνας φαίνεται να αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της παθοφυσιολογίας της παχυσαρκίας. Ο υποθάλαμος είναι το

πρωτεύον κέντρο του εγκεφάλου που ευθύνεται για την βραχυπρόθεσμη ρύθμιση της όρεξης και του κορεσμού, ενώ στην μακροπρόθεσμη διατήρηση του σωματικού βάρους ενεργό ρόλο παίζουν ορμονικά ερεθίσματα προερχόμενα από τον γαστρεντερικό σωλήνα και τον λιπώδη ιστό.

Την τελευταία δεκαετία έχει βρεθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων (Nadler et al, 2000) και πρωτεϊνών (Korner et al, 2005) εμπλέκονται στην ρύθμιση του σωματικού βάρους και της όρεξης του ανθρώπινου οργανισμού. Έχει αναφερθεί από σχετικές έρευνες ότι μέχρι σήμερα περίπου 340 γονίδια και χρωμοσωμικές περιοχές επιδρούν στη ρύθμιση του ανθρώπινου βάρους. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί αρκετές μονογονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες ευθύνονται για το 5-10% των περιπτώσεων παχυσαρκίας και επηρεάζουν μεμονωμένα γονίδια που κυρίως δρουν στο μονοπάτι λεπτίνης-μελανοκορτίνης του υποθαλάμου. Τα περισσότερα γονίδια έχουν την τάση να συμβάλουν στην αύξηση του πάχους του ανθρώπινου οργανισμού αλλά υπάρχουν και κάποια τα οποία λειτουργούν ως προς την μείωση του αντίστοιχα (Rose et al, 2004).

Ορμόνες και πρωτεΐνες όπως η λεπτίνη, η ινσουλίνη, η γλυκόζη, η γκρελίνη, το πεπτίδιο ΥΥ και πάρα πολλές άλλες όπως έδειξαν μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους και πειραματόζωα έδειξαν ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της όρεξης του οργανισμού και της ποσότητας λίπους του ανθρώπινου σώματος (Korner et al, 2005; Otukonyong et al, 2005). Αναλυτικότερα, στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου παράγονται ορεξιγόνα πεπτίδια όπως το νευροπεπτίδιο Υ [NPY] και το agouti-related peptide [AgRP] και ανορεξιγόνα πεπτίδια όπως η προ-οπιομελανοκορτίνη [POMC]. Στην πλάγια υποθαλαμική περιοχή παράγονται ορεξιγόνα πεπτίδια, όπως η μελανοκορτίνη [MCH] και οι ορεξίνες. Οι προαναφερθείσες περιοχές του εγκεφάλου επικοινωνούν με τον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας και την εσχάτη πτέρυγα. Η λεπτίνη, ορμόνη που παράγεται από τον λιπώδη ιστό, καταστέλλει την παραγωγή των ορεξιγόνων πεπτιδίων [NPY/AgRP] και διεγείρει την παραγωγή των ανορεξιγόνων πεπτιδίων [POMC] με συνέπεια τον περιορισμό της λήψης τροφής και της αύξησης του βάρους. Στην πλειοψηφία των παχύσαρκων ατόμων διαπιστώνεται μειωμένη ευαισθησία των υποδοχέων της λεπτίνης (Gehlert, 1999). Η ινσουλίνη, ορμόνη που παράγεται στο

πάγκρεας και καταστέλλει την παραγωγή των ορεξιογόνων πεπτιδίων [NPY/AgRP], αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της παθοφυσιολογίας της παχυσαρκίας. Τα επίπεδα ινσουλίνης στην κυκλοφορία σχετίζονται με τα επίπεδα λιπώδους ιστού στο σώμα, με την παρουσία της να αυξάνει την δυνατότητα αποθήκευσης λίπους, και τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη να συνδέεται άρρηκτα με την παχυσαρκία και την υπερινσουλιναίμια (Kahn & Flier, 2000).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Το επίπεδο της σωματικής δραστηριότητας που έχει κάθε άνθρωπος, η καθημερινή διατροφή του, ο ημερήσιος αριθμός γευμάτων του, η ποσότητα των τροφών που καταναλώνει και το είδος των θρεπτικών συστατικών που προσλαμβάνει είναι κύριοι ρυθμιστές του σωματικού του βάρους. Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι η αυξημένη πρόσληψη λίπους και γενικότερα αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη αποτελούν κύριους παράγοντες που ευθύνονται για την αύξηση της παχυσαρκίας στο σύγχρονο δυτικό κόσμο αλλά νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι είναι η αναλογία όλων των θρεπτικών συστατικών και όχι μόνο η περίσσεια των λιπαρών που ενοχοποιείται (Moussavi et al, 2008). Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι το επίπεδο μόρφωσης, η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση και η εθνικότητα φαίνεται επίσης να επηρεάζουν το σωματικό βάρος του ανθρώπινου οργανισμού.

Τέλος ψυχολογικοί παράγοντες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τις συνήθειες και το μέγεθος της κατανάλωσης τροφής. Η άσχημη ψυχολογική κατάσταση, το καθημερινό στρες, η κατάθλιψη ενδέχεται να είναι ένας από τους σημαντικούς παράγοντες εμφάνισης της νόσου της παχυσαρκίας. Η συμβολή των ψυχολογικών παραγόντων στην όρεξη είναι δύσκολο να αποτιμηθεί επακριβώς.

Μεταξύ των διαφόρων δυνητικών παραγόντων που συμβάλουν στη μεγάλη αύξηση της παχυσαρκίας τα τελευταία 30 χρόνια έχουν προταθεί και αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου (microbiome) (Turnbaugh et al, 2009). Πειραματική απόδειξη της σημασίας της χλωρίδας (microbiome) για το μεταβολισμό της ενέργειας οδήγησε σε εναλλακτικές θεωρίες σχετικά με το ρόλο

της αλλαγής του microbiome στην παγκόσμια επιδημία παχυσαρκίας (Greenblum et al, 2012).

1.2 Επιδημιολογία παχυσαρκίας

Η διαρκώς αυξανόμενη συχνότητα υπέρβαρων ανθρώπων σε διάφορες χώρες οδήγησε στην αναγνώριση της παχυσαρκίας ως σύγχρονη παγκόσμια επιδημία (Ng et al, 2014). Ο επιπολασμός του συνδυασμού υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων αυξήθηκε κατά 27.5% στους ενήλικες και 47.1% στα παιδιά μεταξύ 1980 και 2013. Ο συνολικός αριθμός υπέρβαρων και παχύσαρκων αυξήθηκε από 857 εκατομμύρια το 1980, σε 2.1 δισεκατομμύρια το 2013 παγκοσμίως. Η αναλογία ανδρών που ήταν υπέρβαροι (Δείκτης Μάζας Σώματος > 24 Kg/m²) αυξήθηκε από 28.8% (28.4–29.3) το 1980 σε 36.9% (36.3–37.4) το 2013, και η αναλογία υπέρβαρων γυναικών από 29.8% (29.3–30.2) σε 38% (37.5–38.5). Η αύξηση παρατηρήθηκε τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες αλλά με διαφορετική φυλετική κατανομή. Στις αναπτυγμένες χώρες υπερσχύουν οι υπέρβαροι και παχύσαρκοι άνδρες ενώ στις αναπτυσσόμενες οι γυναίκες σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Ο ρυθμός της αύξησης ήταν υψηλότερος τη δεκαετία 1992 - 2002 και επιβραδύνθηκε την τελευταία δεκαετία στις αναπτυγμένες χώρες.

Ενδιαφέρον όμως είναι ότι σε σύγκριση με το 1980 ο επιπολασμός της παχυσαρκίας παρουσιάζει ανησυχητική αυξητική τάση και στα παιδιά τόσο στα αγόρια που είναι σχετικά πιο συχνή όσο και σε κορίτσια παγκοσμίως. Η συχνότητα στα παιδιά και τους εφήβους στις ανεπτυγμένες χώρες έχει αυξηθεί σημαντικά, όπου 23.8% (22.9-24.7) των αγοριών και 22.6% (21.7-23.6) των κοριτσιών ήταν υπέρβαρα ή παχύσαρκα το 2013. Ο επιπολασμός των υπέρβαρων και παχύσαρκων αυξήθηκε επίσης σε παιδιά και εφήβους στις αναπτυσσόμενες χώρες, από 8.1% (7.7-8.6) σε 12.9% (12.3-13.5) το 2013 για τα αγόρια και από 8.4% (8.1-8.8) σε 13.4% (13-13.9) στα κορίτσια. Διαδοχικές γενεές παρουσιάζουν αύξηση του σωματικού τους βάρους σε όλες τις ηλικίες συμπεριλαμβανομένης της παιδικής και εφηβικής,

με την πιο έντονη αύξηση στο ηλικιακό εύρος μεταξύ 20 και 40 ετών. Στις αναπτυσσόμενες χώρες ο κορυφαίος επιπολασμός μετακινείται προς νεότερες ηλικίες

Σύμφωνα με τα ως τώρα δημοσιευμένα δεδομένα η παχυσαρκία στους ενήλικες στην Ελλάδα κυμαίνεται από 17.8% έως 26.6%. Σύμφωνα με τη μελέτη Attica που δημοσιεύτηκε το 2004 στο αστικό περιβάλλον της Αττικής φάνηκε ότι οι άνδρες ήταν πιο πιθανό να είναι παχύσαρκοι σε σχέση με τις γυναίκες (Panagiotakos et al, 2004). Ο μέγιστος επιπολασμός της παχυσαρκίας παρατηρήθηκε στους άνδρες ηλικίας άνω των 40 ετών και στις γυναίκες ηλικίας 50-59 ετών. Επίσης, βρέθηκε ότι η παχυσαρκία κεντρικού τύπου ήταν πιο συχνή στις γυναίκες (43%) σε σχέση με τους άνδρες (36%). Τέλος, βρέθηκε ότι οι παχύσαρκοι και υπέρβαροι συμμετέχοντες στη μελέτη, ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία, είχαν χαμηλότερο εκπαιδευτικό επίπεδο, ακολουθούσαν μια λιγότερο υγιεινή διατροφή και ήταν πιο πιθανό να έχουν καθιστική ζωή σε σχέση με τους συμμετέχοντες που είχαν φυσιολογικό βάρος.

Σε πιο πρόσφατη μελέτη από την Θεσσαλία (Koukoulis et al, 2010) με μεικτό δείγμα από αστικές και αγροτικές περιοχές ο συνολικός επιπολασμός της παχυσαρκίας ήταν παρόμοιος σε άνδρες (27.8%) και γυναίκες (25.6%), ενώ η συχνότητα υπέρβαρων ήταν 39.4% με υπεροχή των ανδρών (50.8% vs. 29.3%, $p < 0.001$). Ο συνολικός επιπολασμός των παχύσαρκων στη μελέτη της Θεσσαλίας ήταν υψηλότερος παλαιότερης μελέτης από την περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας (19.9%). Μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2006 (Karantais et al, 2006) στηριζόμενη σε δεδομένα σε εθνική κλίμακα κατέληξε ότι ο συνολικός επιπολασμός της παχυσαρκίας ήταν 22.5% (26% στους άνδρες και 18.2% στις γυναίκες) με τις γυναίκες να παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα παχυσαρκίας με την πάροδο του χρόνου.

1.3 Επιπτώσεις παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία έχει εξελιχθεί σε μείζονα απειλή της παγκόσμιας υγείας. Παρουσιάζει υψηλή συχνότητα νοσηρότητας και θνησιμότητας, γιατί είναι άρρηκτα

συνδεδεμένη με το επονομαζόμενο μεταβολικό σύνδρομο που περιλαμβάνει παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή και αναπνευστική ανεπάρκεια, το σύνδρομο άπνοιας στον ύπνο, το άσθμα (Malnick & Knobler, 2006). Εκφυλιστικές παθήσεις των αρθρώσεων και συμβολή στην καρκινογένεση φαίνεται να σχετίζονται με το πλεονάζον σωματικό βάρος. Η παχυσαρκία το 2010 υπολογίστηκε ότι προκαλεί 3.4 εκατομμύρια θανάτους, 4% αύξηση στα χαμένα έτη προσδοκώμενου βίου και 4% αύξηση στα χαμένα έτη ζωής λόγω πρόωρης θνησιμότητας ή ανικανότητας [disability-adjusted life-years (DALYs)], που είναι μέτρα της επίδρασης τόσο στη διάρκεια όσο και την ποιότητα της ζωής (Ng et al, 2014).

Οι επιπτώσεις στην υγεία της παχυσαρκίας ανεδείχθησαν με βάση τα δεδομένα μεγάλων μελετών που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση Global Disease Burden το 2013, στις οποίες φαίνεται σταθερή σχέση του ΔΜΣ >23 kg/m² με καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνο, διαβήτη, οστεοαρθρίτιδα και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Οι περισσότεροι θάνατοι οφείλονται σε καρδιαγγειακά συμβάματα. Από συστηματικές μετααναλύσεις φάνηκε ότι μόλις 31% του κινδύνου στεφανιαίας νόσου και 8% του κινδύνου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου που σχετίζεται με την παχυσαρκία μεσολαβείται από την αυξημένη αρτηριακή πίεση και την υπερχοληστερολαιμία. Επομένως ακόμα και με «επιθετική» θεραπευτική αντιμετώπιση της υπέρτασης και της υπερλιπιδαιμίας, ο σχετικός κίνδυνος που προκαλεί η παχυσαρκία πρέπει πρωταρχικά να αντιμετωπίζεται προκειμένου να ελεγχθεί ο καρδιαγγειακός κίνδυνος. Παρόλα αυτά η συσχέτιση της παχυσαρκίας με την θνησιμότητα από διάφορες αιτίες είναι πλέον αμφιλεγόμενη με τη νοσογόνο παχυσαρκία να συνδέεται με υψηλότερη θνησιμότητα αλλά μικρότεροι ΔΜΣ να μην παρουσιάζουν σαφή σχέση.

1.4 Μεταβολικό σύνδρομο – Ορισμοί

Η ιστορία του Μεταβολικού Συνδρόμου ξεκινάει το 1988 όταν για πρώτη φορά ο Reaven περιγράφει ως σύνδρομο Χ τη συνύπαρξη των μεταβολικών

διαταραχών που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της παχυσαρκίας, συγκεκριμένα της υπερινσουλιναϊμίας, της διαταραχής της ανοχής της γλυκόζης, της αρτηριακής υπέρτασης, της χαμηλής συγκέντρωσης HDL και της αυξημένης τιμής τριγλυκεριδίων, χωρίς ωστόσο να συμπεριλαμβάνει την ίδια την παχυσαρκία στα κριτήρια διάγνωσης. Επειδή ο συνδυασμός των διαταραχών αυτών θεωρήθηκε ικανός να εντοπίζει άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Στεφανιαίας νόσου και Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, συνεχώς αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον υπάρχει για τις συνέπειες του συνδρόμου. Δεν υπάρχει ωστόσο ομοφωνία ως προς τον ορισμό του. 3 διαφορετικές επιτροπές, η παγκόσμια Οργάνωση Υγείας [World Health Organization (WHO)], η εθνική επιτροπή για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας [National Cholesterol Education Program—Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)], και η Διεθνής Οργάνωση για το Διαβήτη [International Diabetes Federation (IDF)], έχουν δημοσιεύσει κλινικούς ορισμούς του ΜΣ (Πίνακας 1). Σε γενικές γραμμές, όλοι οι ορισμοί περιλαμβάνουν διαφορετικές μεθόδους μέτρηση της παχυσαρκίας, της ινσουλινοαντίστασης, της αρτηριακής υπέρτασης και της αθηρογόνου δυσλιπιδαιμίας με τις τιμές ωστόσο όλων των παραμέτρων να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ορισμών (Kassi et al, 2011).

	WHO (1998)	EGIR (1999)	AACE (2003)	IDF (2005)	NCEP ATP III (2005 Revision)
Required component	IR (IGT, IFG, T2DM, or additional evidence of IR)	Hyperinsulinemia ^a (plasma insulin > 75th percentile)	IR (IGT or IFG)	CO (WC) ^b	None
Criteria	Required component and $\geq 2/5$ below	Required component and $\geq 2/4$ below	Required component and any below based on clinical judgment	Required component and $\geq 2/4$ below	$\geq 3/5$ below
Obesity	WHR > 0.9 (M), > 0.85 (F) or BMI > 30 kg/m ²	WC ≥ 94 cm (M), ≥ 80 cm (F)	BMI ≥ 25 kg/m ²	–	WC > 102 cm (M) > 88 cm (F)
Hyperglycemia (mg/dL)	+	+	+	Fasting glucose ≥ 100	Fasting glucose ≥ 100 or Rx
Dyslipidemia (mg/dL)	TG ≥ 150 or HDL-C < 35 (M), < 39 (F)	TG ≥ 150 or HDL-C < 39	TG ≥ 150 and HDL-C < 40 (M), < 50 (F)	TG ≥ 150 or Rx HDL < 40 (M), < 50 (F), or Rx	TG ≥ 150 or Rx HDL < 40 (M), 50 (F), or Rx
Hypertension (mm Hg)	> 140/90	> 140/90 or Rx	> 130/85	> (S), > 85 (D) or Rx	> 130 (S), > 85 (D) or Rx
Other criteria	Microalbuminuria ^c	Other features of IR ^d			

ACCE, American Association of Clinical Endocrinologists; BMI, body mass index; CO, central obesity; D, diastolic; Dx, diagnosis; EGIR, European Group for the Study of Insulin Resistance; HDL, high-density lipoprotein; IDF, International Diabetes Foundation; IFG, impaired fasting glucose; IGT, impaired glucose tolerance; IR, insulin resistance; NCEP ATP III, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; Rx, pharmacologic intervention for that criterion; S, systolic; T2DM: type 2 diabetes mellitus; TG, triglycerides; WC, waist circumference; WHO, World Health Organization; WHR, waist-hip ratio.
^a Criteria fulfilled with required component.
^b In patients without T2DM.
^c Values population dependent.
^d Urinary albumin excretion of 20 μ g/min or albumin-to-creatinine ratio of ≥ 30 mg/g.
^e This includes family history of T2DM, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to T2DM.
Adapted with permission from Huang² and Grundy SM et al.¹³

Πίνακας 1.1 Ορισμοί του μεταβολικού συνδρόμου

1.5 Πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί

Παρότι η αντίσταση στην ινσουλίνη και η παχυσαρκία θεωρούνται η κύρια διαταραχή στην παθοφυσιολογία του μεταβολικού συνδρόμου, ποικίλοι άλλοι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί, όπως η αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία, η διαταραχή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης – επινεφριδίων, ενεργοποιημένη συστηματική φλεγμονή και κυτταρικό οξειδωτικό stress. Η αντίσταση στην ινσουλίνη συμβαίνει όταν υπάρχει μειωμένη απόκριση στη δράση της στους περιφερικούς ιστούς (μυϊκός, λιπώδης ιστός και ήπαρ), με συνέπεια υπερινσουλιναίμια, η οποία ευθύνεται για την αυξημένη παραγωγή insulinlike growth factor 1 (IGF-1) από το ήπαρ (Dunhjak & Dunhjak, 2009). Η κεντρική παχυσαρκία θεωρείται πρώιμο στάδιο στην ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου. Το σπλαχνικό λίπος εκκρίνει διάφορες βιοδραστικές ουσίες, όπως οι λιποκυτοκίνες, οι οποίες μπορούν να επάγουν αντίσταση στην ινσουλίνη και έχουν προφλεγμονώδη και προαθηρογόνο δράση. Τα επίπεδα κυτταροκινών στην κυκλοφορία, όπως ρεζιστίνης, λεπτίνης και tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6, C-reactive protein (CRP), ινωδογόνου και πλασμινογόνου, activator inhibitor 1 (PAI-1), είναι συνήθως αυξημένα σε παχύσαρκους και ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Αντίθετα, οι αντιπονεκτίνες, που είναι κυκλοφορούσες ιστοειδικές ορμόνες, μειώνονται σε ασθενείς με συσσώρευση σπλαχνικού λίπους (Huang, 2009). Οι αντιπονεκτίνες ενεργοποιούν το μεταβολισμό της γλυκόζης και τη οξείδωση των λιπιδίων στο μυϊκό ιστό, προάγουν την ευαισθησία του ήπατος στην ινσουλίνη και αναστέλλουν τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα στο τοίχωμα των αγγείων (Dunhjak & Dunhjak, 2009; Huang, 2009; Reaven, 2011).

Στα πλαίσια του μεταβολικού συνδρόμου παρατηρείται χρόνια ενεργοποιημένη χαμηλού βαθμού φλεγμονή (Gorbachinsky et al, 2010). Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι ασθενείς με ΜΣ παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα δεικτών φλεγμονής, όπως η CRP και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TNF- α , IL-8, IL-6, και η IL-1b (Alexandraki et al, 2006; Gustafson et al, 2007; Murdolo & Smith, 2006). Η διήθηση του λιπώδους ιστού από τα μακροφάγα φαίνεται να συμβάλει

στην σχετιζόμενη με την παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη. Η CRP συνδέεται με πολυάριθμα χαρακτηριστικά του ΜΣ, όπως την κοιλιακή παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και το ΣΔ, την υπέρταση, τη χαμηλή συγκέντρωση HDL καθώς και αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων IL-6 και TNF-α. Η CRP έχει επίσης φανεί να διεγείρει τη σύνθεση της IL-8 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής, υπογραμμίζοντας το ρόλο αυτής της κυτταροκίνης στο ΜΣ. Επιπλέον, οι IL-6, IL-1 β, και η CRP είναι γνωστό ότι διαταράσσουν το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης, και δεν αποτελεί έκπληξη ότι αυτοί σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξη ΣΔ. Συνεπώς μια προφλεγμονώδη κατάσταση, μπορεί να συμβάλει στην εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου και των χαρακτηριστικών του.

Χαρακτηριστικά του ΜΣ, όπως η ινσουλινοαντίσταση, η υπεργλυκαιμία και η αυξημένη παραγωγή τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) και η χρόνια φλεγμονή μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη του ενδοθηλίου και αθηροσκλήρωση. Σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, υπάρχει μια μείωση των επιπέδων NO στα αγγεία, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην υγεία του ενδοθηλίου. Προστατεύει από την έναρξη της αθηροσκλήρωσης με την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, καθώς και μέσω μείωσης του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. Αν μειωθούν τα επίπεδα NO μπορεί επομένως να καταργηθούν αυτές οι προστατευτικές λειτουργίες. Αυξημένη CRP έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη σύνθεση NO σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Η υπεργλυκαιμία επίσης προάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών όπως ανιόντος υπεροξειδίου με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του NO. Επιπλέον η υπερινσουλιναίμία και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε ΣΔ2 μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων του αγγειοσυσταλτικού μορίου ενδοθηλίνης-1 (ET-1). Μειωμένη ρύθμιση της ινσουλίνης στα επίπεδα NO και ET-1 σαν αποτέλεσμα της αντίστασης στην ινσουλίνη μπορεί να μειώσει την παραγωγή του NO, ενώ η σύνθεση της ET-1 διατηρείται, προωθώντας έτσι την αγγειοσύσπαση. Αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που συνδέονται με την δυσλιπιδαιμία στα πλαίσια ΜΣ, μπορεί να προκαλέσουν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μέσω της αύξησης των ελεύθερων ριζών και αναστολής της NO συνθετάσης μέσω

ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C, ένα μονοπάτι που, τελικά οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση NO. Όλα λοιπόν τα παραπάνω σε συνδυασμό με την απώλεια της ελαστικότητας των αγγείων και την ενεργοποίηση αγγειοσυσπαστικών μηχανισμών στα πλαίσια ΜΣ δείχνουν τη στενή σχέση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας με την παθοφυσιολογία του ΜΣ και τον κεντρικό ρόλο του NO.

1.6 Επίδραση της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου στο ουροποιογεννητικό σύστημα

Πρόσφατα επιδημιολογικά, ιστοπαθολογικά, μοριακά και κλινικά δεδομένα αναδεικνύουν τον πιθανό ρόλο της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου στην παθογένεση της Καλοήθους Υπερπλασίας Προστάτη και του καρκίνου του προστάτη (De Nunzio et al, 2011b). Και οι δυο προστατικές μορφές νεοπλασίας θεωρούνται χρόνιες με πρώιμη έναρξη και αργή εξέλιξη, με κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς με τις διαταραχές που συνδέονται με την παχυσαρκία. Η πιθανότητα πρόληψης και θεραπευτικής αντιμετώπισης του ΜΣ μέσω απλών αλλαγών τρόπου ζωής, διατροφικών παρεμβάσεων ή φαρμακευτικών σκευασμάτων προβάλλει ως ενδιαφέρουσα εναλλακτική που ανοίγει νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση της ΚΥΠ και του προστατικού καρκίνου. Μια πιο πρόσφατη ιδέα είναι ότι η παχυσαρκία και το ΜΣ συνδέονται με άλλες σημαντικές κλινικές καταστάσεις στην ουρολογία, όπως τον υπογοναδισμό και την υπογονιμότητα, τη στυτική δυσλειτουργία, τη νεφρολιθίαση, την υπερδραστική ουροδόχο κύστη και τη γυναικεία ακράτεια (Gorbachinsky et al, 2010). Ωστόσο, έρευνες για τη σχέση του ΜΣ με αυτές τις κλινικές οντότητες είναι σε εξέλιξη για μικρότερο χρονικό διάστημα και τα δεδομένα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

1.6.1 Συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και καλοήθους προστατικής υπερπλασίας

Η παθοφυσιολογία της ΚΥΠ είναι ακόμα εν πολλοίς αδιευκρίνιστη, αλλά θεωρείται πιθανό να οφείλεται στην αλληλεπίδραση τοπικών και συστηματικών (νευρικών, ενδοκρινών, ανοσολογικών και αγγειακών) παραγόντων. Η κλινική παρατήρηση μεγαλύτερων προστατικών αδένων σε άτομα με μεταβολικά νοσήματα όπως σακχαρώδης διαβήτης, υπερινσουλιναίμια, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, παχυσαρκία ενέπνευσε την διατύπωση της υπόθεσης μιας πιθανής σχέσης μεταξύ της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη και αυτών των μεταβολικών διαταραχών.

1.6.1.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Το μεταβολικό σύνδρομο έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης συμπτωμάτων από το κατώτερο ουροποιητικό [Lower Urinary Tract Symptoms – LUTS] και ΚΥΠ σε διάφορες μελέτες παρατήρησης. Σε 2372 άνδρες συμμετέχοντες στη μελέτη NHANES III, άτομα με τουλάχιστον 3 από τις συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου είχαν κατά 80% υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης LUTS σε σύγκριση με άτομα χωρίς καμία από τις διαταραχές (Parsons, 2007; Rohrmann et al, 2005). Οι Hammarsten και συν. (Hammarsten et al, 1998) εξέτασαν 158 άνδρες με LUTS ως αποτέλεσμα ΚΥΠ και βρήκαν ότι άτομα με επιμέρους διαταραχές του ΜΣ είχαν σημαντικά μεγαλύτερους όγκους προστάτη και υψηλότερους ετήσιους ρυθμούς αύξησης του αδένα. Ομοίως, οι Ozden και συν. (Ozden et al, 2007) που μέτρησαν το συνολικό προστατικό όγκο και τον όγκο της μεταβατικής ζώνης με διορθικό υπέρηχο σε ένα μικρότερο δείγμα ασθενών επιβεβαίωσαν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης του προστάτη αδένα στην υποομάδα των παχύσαρκων ασθενών με ΚΥΠ. Η ανάλυση της μελέτης Boston Area Community Health (BACH) (Kupelian et al, 2009) έδειξε μια θετική συσχέτιση της επίπτωσης του μεταβολικού συνδρόμου με

το δείκτη συμπτωμάτων από το κατώτερο ουροποιητικό, American Urological Association Symptom Index (AUA-SI).

Μια πρόσφατη ανασκόπηση κατέδειξε μια άμεση και σημαντική συσχέτιση συνιστωσών διαταραχών του ΜΣ (παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη και υπέρταση) με το σύμπλεγμα ΚΥΠ/LUTS (Abdollah et al, 2011). Συγκεκριμένα στη μελέτη Baltimore Longitudinal Study of Aging, αύξηση κατά 1 kg/m^2 στο Δείκτη Μάζας Σώματος αντιστοιχούσε σε αύξηση του όγκου προστάτη κατά 0.41 ml ενώ παχύσαρκοι ασθενείς είχαν 3,5 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διογκωμένου προστάτη σε σύγκριση με μη παχύσαρκους (Parsons et al, 2006). Παρομοίως σε ανάλυση των αποτελεσμάτων από περισσότερες από 16 000 ριζικές προστατεκτομές παρατηρήθηκε ότι αύξηση κατά 1 kg/m^2 του ΔΜΣ συσχετίζεται με αύξηση κατά 0.45 g (95% CI, $0.35\text{--}0.55 \text{ g}$) του ολικού βάρους του προστάτη και με συνολική αύξηση κατά 70% του κινδύνου εμφάνισης διογκωμένου προστάτη στους παχύσαρκους σε σχέση με αδύνατους ασθενείς (Kopp et al, 2011). Εξάλλου η σχέση παχυσαρκίας με LUTS/ΚΥΠ επιβεβαιώθηκε σε διάφορες φυλές και εθνικότητες, επιτρέποντας τη γενίκευση των αποτελεσμάτων (Abdollah et al, 2011).

Υπάρχουν ωστόσο μελέτες οι οποίες δεν επιβεβαιώνουν τη σχέση ΜΣ και LUTS. Οι Parsons και συν. αξιολόγησαν στοιχεία από 422 άτομα που είχαν υποβληθεί σε μαγνητική απεικόνιση του προστάτη αλλά δεν βρήκαν οποιαδήποτε σχέση (Parsons, 2007) ενώ οι Soygur και συν. σε ένα μικρό δείγμα ατόμων με αποφρακτική ούρηση βρήκαν τα μεγαλύτερα αδενώματα στα άτομα με σωματικό βάρος 40% τουλάχιστον μεγαλύτερο από το συνιστώμενο βάρος ενώ δεν παρατήρησαν διαφορά στην ένταση των συμπτωμάτων (Soygur et al, 1996). Οι Burke και συν. έδειξαν ότι ούτε το βάρος ούτε τα άλλα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά συνδέονται σημαντικά με την παρουσία ή την πρόοδο της ΚΥΠ (Burke et al, 2006). Επιπλέον μεγάλη προοπτική μελέτη διαπίστωσε ότι ο μεγαλύτερος δείκτης μάζας σώματος συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΥΠ (Zucchetto et al, 2005).

Οι προοπτικές μελέτες στηρίζουν τα αποτελέσματά τους στην παρατήρηση μικρών ομάδων ασθενών με κλινικά σημαντικά LUTS και παρουσιάζουν αδυναμίες

ως προς τον σχεδιασμό τους. Σοβαροί περιορισμοί που καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων συνιστούν η μικρότερη επίπτωση μεταβολικού συνδρόμου σε ασιατικούς πληθυσμούς (14-29%) στους οποίους η συσχέτιση είναι αμφίβολη, σε σύγκριση με μελέτες στην Ευρώπη ή την Αμερική (29-31%), η χρήση διαφορετικών παραμέτρων για την αξιολόγηση των συμπτωμάτων καθώς και η ύπαρξη ή μη ιστολογικής επιβεβαίωσης της ΚΥΠ ή απεικονιστικής καταγραφής. Επιπρόσθετα ενδείξεις υπάρχουν ότι γενετικοί πέρα από τους μεταβολικούς παράγοντες, διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο στην εξέλιξη της ΚΥΠ και παράλληλα θα μπορούσαν να εξηγούν τη θετική σχέση μεταξύ του ύψους και ΚΥΠ. Δυστυχώς, οι μελέτες που προσπαθούν να καταδείξουν την γενετική βάση ως κύριο αίτιο για την ανάπτυξη ΚΥΠ αντιμετωπίζουν σημαντικές δυσκολίες. Το κυριότερο μειονέκτημα βρίσκεται στο γεγονός ότι η άμεση μέτρηση έκθεση σε συνδυασμό με τη γενετική προδιάθεση είναι αδύνατη ελλείψει ενός συγκεκριμένου γονιδίου προς μελέτη. Οι μελέτες λοιπόν παρατήρησης με συγκεκριμένο γεωγραφικό περιορισμό θα πρέπει απλά να υποδεικνύουν την κατεύθυνση προς περαιτέρω διερεύνηση (De Nunzio et al, 2011b).

1.6.1.2 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη με συνέπεια την υπερινσουλιαιμία σχετίζεται με την αύξηση του μεγέθους του προστάτη. Η υπερινσουλιαιμία με τη σειρά της σχετίζεται με υπερδραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος, που οδηγεί σε αυξημένο μυϊκό τόνο των λείων μυϊκών ινών του προστάτη και πιο έντονα LUTS, ανεξάρτητα από τη διόγκωση του προστάτη. Πάντως, δεν είναι ξεκάθαρο αν η εμφάνιση των LUTS είναι αποτέλεσμα κεντρικής αύξησης της δραστηριότητας του αυτόνομου νευρικού συστήματος, συνεπεία περιφερικών σημάτων ή αποτέλεσμα αλλαγής της λειτουργίας της κύστης που οδηγεί σε αυξημένη κεντρική ενεργοποίηση. Οι McVary και συν. σε μια μελέτη σε 3.047 άντρες με LUTS λόγω καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη, έδειξαν ότι η υπερδραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση των LUTS (McVary et al, 2005). Επιπροσθέτως, η αύξηση των

επιπέδων της νορεπινεφρίνης στο πλάσμα, κατόπιν της δοκιμασίας ανακλίσεως (tilt table), σχετίζεται (προβλέπει) με τον όγκο της μεταβατικής ζώνης του προστάτη.

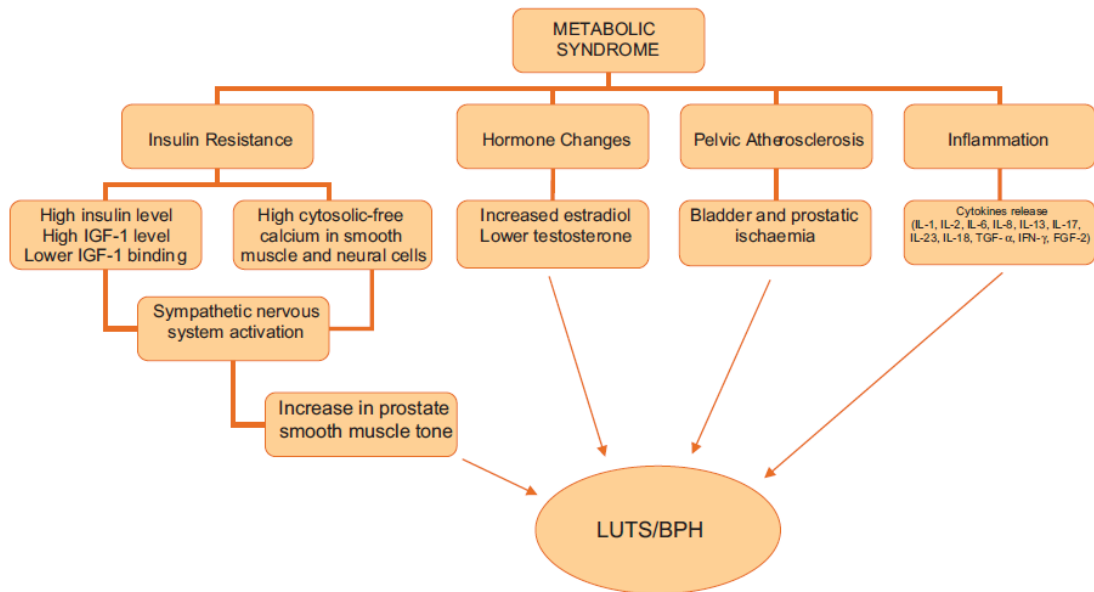
Η υπεργλυκαιμία πιθανόν παίζει ρόλο στην υπερδραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος μέσω αύξησης του ελεύθερου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των λείων μυικών ινών και των νευρικών κυττάρων. Το μονοπάτι του IGF έχει επίσης ενοχοποιηθεί καθώς η ινσουλίνη παρουσιάζει ομοιότητα με τον IGF-1 και μπορεί να συνδέεται με τον υποδοχέα του στον προστάτη οδηγώντας σε αύξηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Παράλληλα η αύξηση της ινσουλίνης στην κυκλοφορία δεσμεύει την IGF-1 δεσμευτική πρωτεΐνη, οδηγώντας σε μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα IGF. Η υπόθεση αυτή προτάθηκε σαν αποτέλεσμα της παρατήρησης ότι η τοπικά ενεργοποιημένη φλεγμονή σε ασθενείς με ΜΣ μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΚΥΠ. Η δραστηριότητα των T-κυττάρων στον προστάτη μπορεί να οδηγεί στην ενεργοποίηση των στρωματικών και επιθηλιακών κυττάρων, των οποίων η υπερπλασία πιθανό να συντηρείται από αυτοάνοσους μηχανισμούς. Η ιστική βλάβη και ο χρόνια ενεργοποιημένος μηχανισμός αποκατάστασης της βλάβης οδηγεί στο σχηματισμό των οζιδίων της ΚΥΠ (De Nunzio et al, 2011b).

Τα στεροειδή του φύλου συνεισφέρουν επίσης στην παθοφυσιολογική συσχέτιση παχυσαρκίας και ΜΣ με LUTS και ΚΥΠ. Άνδρες με LUTS και ΚΥΠ συχνά παρουσιάζουν σχετικά χαμηλά επίπεδα ανδρογόνων και υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, όπως και οι παχύσαρκοι άνδρες υποδεικνύοντας τη μεταξύ τους σχέση. Στις κλασικές μελέτες της επίδρασης των φυλετικών ορμονών στην ανάπτυξη του προστάτη σε σκύλους από την ομάδα του Johns Hopkins, αποδείχτηκε ότι τα οιστρογόνα δρουν έντονα συνεργικά με τα ανδρογόνα και αυξάνουν πάνω από 4 φορές το ολικό βάρος του αδένα. Η αυξητική αυτή επίδραση απαιτεί την αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με 5^α ανηγμένα στεροειδή όπως η διυδροτεστοστερόνη ή ένας από τους μεταβολίτες της (Coffey, 2001).

Διάφορες άλλες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για την εξήγηση της σχέσης παχυσαρκίας και ΜΣ με την ΚΥΠ, αποτελώντας ουσιαστικά κοινή βάση για την εξήγηση της σχέσης με τη στυτική δυσλειτουργία. Η πρώτη υπόθεση βασίζεται στη

διαταραχή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) στο ενδοθήλιο των οργάνων της πυέλου (προστάτης, ουροδόχος κύστη, πέος) ως αποτέλεσμα αγγειακών παραγόντων κινδύνου (διαβήτης, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία κ.ά.), που οδηγεί σε αύξηση του προστατικού τόνου και στην κλινική εμφάνιση των LUTS (McVary & McKenna, 2004). Μία άλλη υπόθεση βασίζεται στην αυξημένη ενεργοποίηση της Rho-κινάσης, με αποτέλεσμα μείωση της χάλασης των λείων μυϊκών ινών και –επομένως– αυξημένες αντιστάσεις στην έξοδο των ούρων (Bing et al, 2003). Επιπρόσθετα, η πυελική αθηροσκλήρωση και η ισχαιμία στα πλαίσια γενικευμένης αγγειακής διαταραχής σε παχύσαρκα άτομα με ΜΣ οδηγούν σε απώλεια λείων μυϊκών ινών και μείωση της ευενδοτότητας, η οποία έχει αποδειχτεί σε πειραματόζωα και μιμείται τις επιπτώσεις της υπερχοληστερολαιμίας και της πυελικής ισχαιμίας. Η υποξία προκαλεί υπερέκφραση της TGFb1 και μεταβάλλει την παραγωγή των προστανοειδών, με αποτέλεσμα εναπόθεση κολλαγόνου και ίνωση της ουροδόχου κύστης (Medina et al, 1999). Οι θεωρίες αυτές είναι συμβατές μεταξύ τους και μπορεί να επικαλύπτονται σημαντικά (Kohler & McVary, 2009). Η αθηροσκλήρωση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων του NO και ενεργοποίηση της Rho-κινάσης. Η μειωμένη αρτηριακή παροχή στην πύελο οδηγεί σε μείωση των μυϊκών ινών του εξωστήρα της ουροδόχου κύστης και ίνωση του προστάτη με αποτέλεσμα μείωση της ευενδοτότητας της κύστης και αυξημένες ουρηθρικές αντιστάσεις, αντίστοιχα.

Στην εικόνα 1.1 συνοψίζονται οι διάφοροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συσχετίζουν την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο με την καλοήγη προστατική υπερπλασία και τα συμπτώματα από το κατώτερο ουροποιητικό.



HPA = hypothalamic–pituitary adrenal axis **IGF-1** = insulinlike growth factor 1 **TNF-a** = tumour necrosis factor 1 **IL-6** = interleukin-6 **CRP** = C-reactive protein **PAI-1** = plasminogen activator inhibitor 1 **HDL** = high-density lipoprotein **LDL** = low-density lipoprotein.

1.6.2 Συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και καρκίνου προστάτη

Μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών μελετών υποστηρίζουν τη σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου προστάτη και την ανάδειξή της ως ανεξάρτητου παράγοντα κινδύνου προχωρημένου καρκίνου.

1.6.2.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Οι τρεις μετα-αναλύσεις που έχουν δημοσιευτεί ως σήμερα δείχνουν ασθενή θετική συσχέτιση της παχυσαρκίας με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη. Ωστόσο τα δεδομένα των επιμέρους μελετών διαφέρουν σημαντικά με κάποιες να μη δείχνουν συσχέτιση, άλλες να δείχνουν την παχυσαρκία ως παράγοντα κινδύνου

και άλλες να υποστηρίζουν την προστατευτική δράση της παχυσαρκίας. Οι μελέτες αυτές διαφέρουν σημαντικά ως προς το μέγεθος του δείγματος τους οδηγώντας στα αντικρουόμενα αποτελέσματα. Είναι ενδιαφέρον ότι αναλύοντας τη γεωγραφική κατανομή του δείγματος, διαφορετικά αποτελέσματα προκύπτουν από την ανάλυση μελετών από την Αμερική σε σχέση με την Ευρώπη. Η εκτεταμένη χρήση του PSA για τον προσυμπτωματικό έλεγχο στην Αμερική οδηγεί σε διάγνωση σε πρωϊμότερα στάδια και είναι η πιθανότερη αιτία για την ασθενέστερη συσχέτιση σε σύγκριση με τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Είναι γνωστό ότι παχύσαρκοι ασθενείς έχουν χαμηλότερα επίπεδα PSA πιθανόν λόγω αυξημένου κυκλοφορούντος όγκου αίματος και αιμοαραίωσης, γεγονός το οποίο σε συνδυασμό με την δυσκολία εκτέλεσης δακτυλικής εξέτασης και το μεγαλύτερο μέγεθος του αδένου, οδηγεί σε μικρότερη συχνότητα διάγνωσης καρκίνου προστάτη (De Nunzio et al, 2012).

Μελέτες που εξετάζουν τη σχέση του συμπλέγματος διαταραχών στα πλαίσια μεταβολικού συνδρόμου με την εμφάνιση καρκίνου προστάτη οδηγούν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μελέτες από τη Φινλανδία δείχνουν 56% αυξημένο κίνδυνο σε ασθενείς με τουλάχιστον 3 από τις διαταραχές του ΜΣ ή 94% αυξημένο κίνδυνο σε άτομα με όλα τα χαρακτηριστικά (De Nunzio et al, 2012). Αντίθετα αρνητική συσχέτιση μεταξύ ΜΣ και καρκίνου προστάτη σημειώθηκε σε μια μεγάλη μελέτη από τις ΗΠΑ (Atherosclerosis Risk communities study) (Tande et al, 2006). Ωστόσο η αρνητική αυτή συσχέτιση δεν επιβεβαιώθηκε σε ΑφροΑμερικανούς που συμμετείχαν στη μελέτη Genes Environment Prostate Cancer (GECAP)(Beebe-Dimmer et al, 2009). Εξάλλου σε μεγάλο δείγμα Ιταλών ανδρών υπήρξε αυξημένη συχνότητα ΜΣ σε άνδρες με αυξημένο PSA ή παθολογική δακτυλική ενώ το ΜΣ συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα Gleason score ≥ 7 αλλά όχι και με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη (De Nunzio et al, 2011a).

Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι διαταραχές που συνιστούν το ΜΣ μπορεί να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πιο προχωρημένου καρκίνου προστάτη. Μια πρόσφατη προοπτική μελέτη έδειξε ότι λευκοί άνδρες με $\Delta\text{M}\Sigma > 35$ είχαν 2 με 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο αρνητικών ιστοπαθολογικών παραμέτρων στο παρασκεύασμα ριζικής προστατεκτομής (Gleason score ≥ 7 , θετικά χειρουργικά

όρια, εξωπροστατική επέκταση ή διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων). Η βιοχημική υποτροπή ήταν συχνότερη σε υπέρβαρους ή παχύσαρκους Καυκάσιους και ΑφροΑμερικανούς. Οι Hammarsten και συν. έδειξαν ότι τόσο το στάδιο όσο και το Gleason score του καρκίνου σχετίζεται σημαντικά με το ΔΜΣ, την περιφέρεια της μέσης, τα τριγλυκερίδια και τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και έμμεσα με τα επίπεδα HDL (Hammarsten & Hogstedt, 2004). Μία προοπτική μελέτη έδειξε ότι σημαντικά αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος μετρήθηκαν σε άνδρες που πέθαναν από καρκίνο προστάτη σε σχέση με όσους επιβίωσαν από την ασθένεια και επιπλέον η θνητότητα συσχετίστηκε με τις διαταραχές που απαρτίζουν το ΜΣ.

Από μεθοδολογικής άποψης, οι μελέτες συσχέτισης του ΜΣ με τον καρκίνο του προστάτη είναι προβληματικές καθώς οι συγκρίσεις μπορεί να επηρεάζονται από φυλετικές και εθνοτικές διαφορές στην επίπτωση παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου. Επίσης η άθροιση όλων των επιμέρους διαταραχών του ΜΣ δεν επιτρέπει την αναγνώριση της ανεξάρτητης επίδρασης καθεμιάς από αυτές.

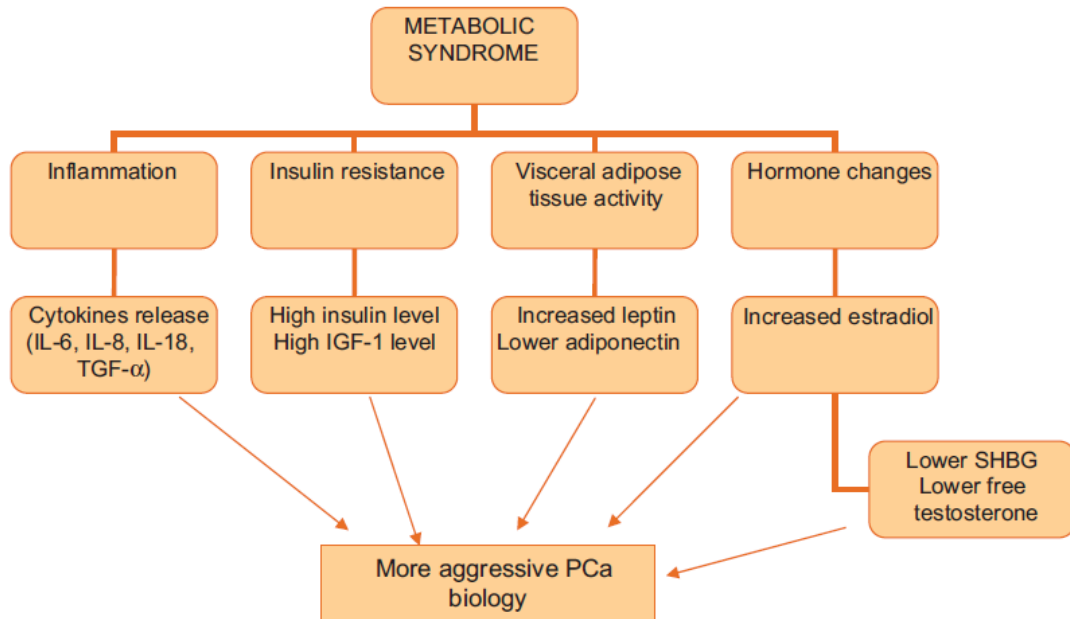
1.6.2.2 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί

Παρά την ύπαρξη αντικρουόμενων συμπερασμάτων, διάφοροι ερευνητές κατέληξαν ότι η συγκέντρωση ινσουλίνης ορού, τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και η ινσουλινοαντίσταση καθώς και πολυμορφισμοί στο DNA του γονιδίου της ινσουλίνης συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη (Buschemeyer & Freedland, 2007; Freedland, 2005). Ο σχετικός κίνδυνος φαίνεται να μειώνεται όσο μεγαλώνει η χρονική απόσταση από τη διάγνωση διαβήτη, υποδεικνύοντας το ρόλο της ινσουλίνης, τα επίπεδα της οποίας είναι γνωστό ότι ελαττώνονται με την πάροδο του χρόνου σαν αποτέλεσμα της καταστροφής των β-κυττάρων. Επίσης ο IGF 1, η συγκέντρωση του οποίου είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ινσουλινοαντίσταση είναι γνωστός μιτογόνος αυξητικός παράγοντας. Φαίνεται ότι ενεργοποιεί τόσο ανδρογονοεξαρτώμενες όσο και ανεξάρτητες κυτταρικές σειρές *in vitro*, ενώ σε ανθρώπους τα αυξημένα του επίπεδα συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου (Freedland, 2005).

Ένας άλλος μηχανισμός είναι η διαταραχή των ορμονών του φύλου στα πλαίσια παχυσαρκίας και ΜΣ. Παρότι ο ακριβής ρόλος των ανδρογόνων και των οιστρογόνων στην προστατική καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου είναι ακόμα αδιευκρίνιστος, έχει προταθεί η δράση της τεστοστερόνης που «επιλέγει» τα επιθετικά μη ευαίσθητα στα ανδρογόνα καρκινικά κύτταρα, τα οποία επιβιώνουν και επικρατούν στο εχθρικό περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης ανδρογόνων. Εξάλλου η ο ρόλος των οιστρογόνων στην επαγόμενη από την τεστοστερόνη καρκινογένεση με συνέπεια μεγαλύτερους σε μέγεθος και πιο επιθετικούς καρκίνους, ερευνάται σε διάφορες πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπους (De Marzo et al, 2007).

Η χρόνια ενεργοποιημένη προστατική φλεγμονή σε άνδρες με ΜΣ δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον πλούσιο σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μόρια μεσολαβητές της φλεγμονής και αυξητικούς παράγοντες, που οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων, που είναι έτσι πιο ευάλωτα στις μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην καρκινογένεση (De Marzo et al, 2007; De Nunzio et al, 2011b). Τα αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία κυτοκινών, όπως η λεπτίνη και η αντιπονεκτίνη, είχαν αρχικά συσχετιστεί με την καρκινογένεση στον προστάτη. Η λεπτίνη αποτελεί ερέθισμα για την ανάπτυξη ανδρογονοανεξάρτητων προστατικών κυττάρων *in vitro* ενώ αυξημένα επίπεδα λεπτίνης σχετίζονται με μεγαλύτερους και πιο επιθετικούς καρκίνους σε ανθρώπους. Η αντιπονεκτίνη έχει αντικαρκινική δράση μέσω αναστολής της αγγειογένεσης και χαμηλές συγκεντρώσεις αντιπονεκτίνης συνδέονται με υψηλού grade, πιο προχωρημένους καρκίνους (De Nunzio et al, 2012).

Η εικόνα 1.2 συνοψίζει τους πιθανούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που συνδέουν την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο με την εμφάνιση πιο επιθετικών μορφών καρκίνου του προστάτη.



IL = interleukin **TGF-a** = transforming growth factor-a **IGF-1** = insulinlike growth factor 1 **SHBG** = sex hormone-binding globulin **PCa** = prostate cancer

1.6.3 Συσχέτιση παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και στυτικής δυσλειτουργίας

1.6.3.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες ανέδειξαν τον αυξημένο κίνδυνο στυτικής δυσλειτουργίας κατά 70-95% σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικό σωματικό βάρος. Σε 513 άνδρες που συμμετείχαν στην προοπτική μελέτη Massachusetts Male Aging Study (MMAS) ο κίνδυνος εμφάνισης ΣΔ ήταν 1.96 φορές μεγαλύτερος στην ομάδα υπέρβαρων. Σε μεγαλύτερη μελέτη από τη Φινλανδία με 1130 συμμετέχοντες, που παρακολούθηθηκαν για 5 χρόνια ο σχετικός κίνδυνος ήταν 1,7 ενώ στη Rancho Bernardo Study που παρακολούθησε 570 άνδρες για 25 χρόνια, ο κίνδυνος ΣΔ ήταν κατά 90% μεγαλύτερος σε παχύσαρκους (OR 1,96). 5 μελέτες επιπολασμού από διάφορες χώρες με πληθυσμό μελέτης από 79 έως 31.742 άνδρες έδειξαν ότι η ΣΔ

εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά πιο συχνά σε άνδρες με $\Delta\text{M}\Sigma > 30\text{Kg/m}^2$ σε σύγκριση με άτομα χαμηλότερο $\Delta\text{M}\Sigma (< 25\text{Kg/m}^2)$.

Πέραν της παχυσαρκίας, άμεση συσχέτιση με άλλες διαταραχές του ΜΣ, όπως η υπέρταση, η υπερτριγλυκεριδαιμία και ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2, έχει αποδειχθεί. Οι Esposito και συν. έδειξαν ότι μεγαλύτερη συχνότητα Στ.Δ παρατηρείται όταν 3 ή περισσότερα από τα κριτήρια του ΜΣ πληρούνται. Άμεση σχέση επίσης μεταξύ της σοβαρότητας της Στ.Δ και του ΜΣ έχει καταγραφεί με μία μελέτη να υποδεικνύει θετική συσχέτιση της παρουσίας ΜΣ, Σ.Δ., αυξημένης αναλογίας περιφέρειας μέσης προς μήκος ισχίων (που συνιστά δείκτη κεντρικής παχυσαρκίας) και υπέρτασης με τη βαρύτητα της Στ.Δ.. Αντίθετα οι Aslan και συν κατέληξαν ότι μόνο η διάγνωση ΣαΔ αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου εμφάνισης σοβαρής ΣΔ.

1.6.3.2 Παθοφυσιολογικές συσχετίσεις παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και στυτικής δυσλειτουργίας

Η κεντρική παχυσαρκία έχει εκτεταμένα μελετηθεί ως κύριος παράγοντας υπεύθυνος για την πρόκληση στυτικής δυσλειτουργίας μέσω της ινσουλινοαντίστασης, της χρόνιας ενεργοποίησης του μηχανισμού της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Το σύμπλεγμα των διαταραχών αυτών εξάλλου φαίνεται να αυξάνει και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο μεταξύ των παχυσάρκων. Αυξανόμενη της κατανόησης της φυσιολογίας της στύσης και του αγγειακού μηχανισμού της στυτικής δυσλειτουργίας, που ομοιάζει με αυτόν της αθηρογένεσης, εδραιώνεται η αντίληψη ότι η διάγνωση της ΣτΔ θα πρέπει να οδηγεί σε προσυμπτωματικό έλεγχο στεφανιαίας νόσου. Είναι προφανές ότι στα μικρότερου μεγέθους αγγεία του δικτύου στο πέος σε σχέση με τα στεφανιαία, παρόμοιας έκτασης αθηρωματική βλάβη μπορεί να προκαλέσει πιο σημαντική απόφραξη. Εξάλλου η αθηροσκλήρωση πέρα από τη μειωμένη αιματική ροή μπορεί να προκαλέσει και βλάβες στην αρχιτεκτονική των σπραγγωδών σωμάτων, όπως η ατροφία και η ίνωση που παρατηρήθηκαν σε κουνέλια σαν αποτέλεσμα της

ισχαιμίας και της υπερχοληστερολαιμίας, οδηγώντας σε ΣτΔ (Gorbachinsky et al, 2010).

Ο υπογοναδισμός ως αποτέλεσμα της παχυσαρκίας και του ΜΣ έχουν συνδεθεί με τη σεξουαλική δυσλειτουργία και τη ΣΔ. Ο Corona και συν έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης σχετίζονται με σοβαρή ΣτΔ, μειωμένη libido, μειωμένες νυκτερινές στύσεις και μειωμένη συχνότητα επαφών, με πιο έντονη τη συσχέτιση σε άνδρες ηλικίας άνω των 62 ετών, υποδεικνύοντας σημαντική επίδραση σε μεγαλύτερους σε ηλικία άνδρες (Corona et al, 2009). Η ανδρική παχυσαρκία σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα ολικής τεστοστερόνης, φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης sex hormone binding globulin (SHBG) και αυξημένη μετατροπή της Τεστοστερόνης σε Οιστρογόνα στον λιπώδη ιστό, που είναι αυξημένος. Επειδή η τεστοστερόνη έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα nNOS mRNA στα σηραγγώδη σώματα, ο υπογοναδισμός εικάζεται ότι προκαλεί μειωμένη σύνθεση NO και κατ' επέκταση ΣτΔ.

Η διαταραχή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) στο ενδοθήλιο των οργάνων της πυέλου σαν αποτέλεσμα της αθηρωματικής νόσου και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και πιο συγκεκριμένα στο πέος επηρεάζει το στυτικό μηχανισμό. Σε πειραματόζωα με υπέρταση, ΣΔ ή χρόνια ισχαιμία στο πέος, ελαττώθηκε η έκφραση των ισομορφών της συνθετάσης nNOS (neuronal) και eNOS (endothelial) ενώ αυξήθηκε της επαγόμενης ισομορφής iNOS (inducible), εύρημα το οποίο επιβεβαιώθηκε σε βιοψίες σηραγγωδών σωμάτων από ασθενείς με ΣΔ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες και συνδέθηκε με μειωμένη χάλαση των λείων μυϊκών ινών (Yono et al, 2007). Η στυτική δυσλειτουργία συνδέεται άμεσα με τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, η οποία έχει συσχετιστεί με τη χρόνια ενεργοποιημένη συστηματική φλεγμονή στα πλαίσια του ΜΣ σε ανθρώπους.

Μία άλλη υπόθεση υποστηρίζει το ρόλο της υπερδραστηριότητας του αυτόνομου νευρικού συστήματος ως συνέπεια του μεταβολικού συνδρόμου στην ανάπτυξη ΣΔ. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα ελέγχει δια του συμπαθητικού συστήματος τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών του σηραγγώδους σώματος. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα η υπεργλυκαιμία συνδέεται με υπερδραστηριότητα του

αυτονόμου, η οποία στα πειραματόζωα προκαλεί ΣτΔ. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ασθενείς με μη οργανική ΣτΔ είχαν σημαντικά αυξημένη συμπαθητική καρδιακή δραστηριότητα σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Chen et al, 2009). Εξάλλου η χρήση α_1 -αδρενεργικών ανταγωνιστών για την αντιμετώπιση των LUTS οδήγησε σε βελτίωση της σεξουαλικής δυσλειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της ΣτΔ. Στα ποντίκια με υπέρταση η χορήγηση δοξαζοσίνης οδήγησε σε αύξηση της αιματικής ροής στα σηραγγώδη σώματα καθώς και της έκφρασης eNOS και nNOS σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία ή αυτή που έλαβε ανταγωνιστή διαύλων ασβεστίου (Yono et al, 2007). Το μεταβολικό σύνδρομο ως «πυροδοτητής» της υπερδραστηριότητας του αυτόνομου νευρικού συστήματος αποτελεί έναν προφανή συνεπώς μηχανισμό λόγω της τεκμηριωμένης επίπτωσής του στη στυτική λειτουργία.

Διαταραχές που συνιστούν το ΜΣ έχουν συνδεθεί με αυξημένη ενεργοποίηση της Rho-κινάσης, με αποτέλεσμα μείωση της χάλασης των λείων μυϊκών ινών και ΣτΔ. Η μεταβολή στη νεύρωση των λείων μυϊκών ινών των σηραγγωδών σωμάτων ως αποτέλεσμα νευρικής συμπίεσης είναι πιθανό να προκαλεί τροφικές μεταβολές που οδηγούν σε υπερέκφραση της SM-B ισομορφής της μυοσίνης, αυξημένη σύσπαση και μειωμένη χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Σε διαβητικούς επίμυες, η ΣΔ σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση στα σηραγγώδη σώματα ενός υποδοχέα ROK, του ROK1 και ενός ενεργοποιητή G protein του ROK, του RhoA, και σε μικρότερο βαθμό του υποδοχέα της ενδοθηλίνης A, που ενέχεται στη ρύθμιση της αγγειοσύσπασης. Η ενδοθηλίνη1 είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι ROK, ενώ αυξημένα επίπεδα ET1 έχουν βρεθεί τόσο σε ΣΔ όσο και σε ΣτΔ. Η σημασία της δράσης του ROK στο στυτικό μηχανισμό φαίνεται από ένα πείραμα που έδειξε ότι αναστολή του ROK οδήγησε σε ελαττωμένη σύσπαση των σηραγγωδών σωμάτων τόσο σε επίμυες όσο και σε ανθρώπους μετά ενεργοποίηση του α -υποδοχέα τους από τη φαινυλεφρίνη (Rees et al, 2001) . Σε επίμυες, το NO μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα του ROK, γεγονός που συνεισφέρει στην επαγόμενη από NO στύση (Mills et al, 2002). Επομένως οι διαταραχές του ΜΣ πιθανόν αυξάνουν τη δραστηριότητα του ROK, οδηγώντας σε ΣτΔ.

Η εικόνα 1.3 συνοψίζει τους κοινούς μηχανισμούς που συνδέουν το μεταβολικό σύνδρομο με την στυτική δυσλειτουργία και τα συμπτώματα από το κατώτερο ουροποιητικό.



1.6.4 Συσχέτιση παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και ορχικής δυσλειτουργίας – υπογονιμότητας

Μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι η παχυσαρκία επηρεάζει αρνητικά την ανδρική γονιμότητα όχι μόνο επηρεάζοντας την ποιότητα του σπέρματος αλλά τροποποιώντας τη φυσική και μοριακή δομή των γαμετών στον όρχι.

1.6.4.1 Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με γονιμότητα και συχνότητα εγκυμοσύνης

Παρότι η πλειοψηφία των παχύσαρκων ανδρών δεν είναι υπογόνιμοι και δεν παρουσιάζουν διαταραχές της σπερματογένεσης, είναι δυσανάλογα μεγάλος ο αριθμός των παχύσαρκων που στη σύγχρονη εποχή της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αναζητούν ιατρική βοήθεια για προβλήματα γονιμότητας. Ζευγάρια με υπέρβαρο ή παχύσαρκο άνδρα και φυσιολογικού ΔΜΣ γυναίκα έχουν αυξημένο σχετικό κίνδυνο (odds ratio) για παρατεταμένη χρονική περίοδο μέχρις ότου

συλλάβουν σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους. Σε ζευγάρια που υποβάλλονται σε τεχνικές τεχνητής γονιμοποίησης ενδείξεις υπάρχουν από μικρό αριθμό μελετών ότι μειωμένο ποσοστό εγκυμοσυνών και αυξημένος κίνδυνος αποβολών υπάρχει. Ανδρική παχυσαρκία κατά τη σύλληψη, επηρεάζει αρνητικά την υγεία του εμβρύου, μειώνοντας την πιθανότητα εμφύτευσης και ολοκληρωμένης κύησης τόσο σε ανθρώπινες μελέτες όσο και σε πειραματόζωα (Palmer et al, 2012).

Μία προοπτική μελέτη έδειξε ότι υπέρβαροι (ΔΜΣ 25-29) και παχύσαρκοι άνδρες (ΔΜΣ \geq 30) είχαν σημαντικά πιο μεγάλο κίνδυνο να εμφανίσουν υπογονιμότητα (OR, 1.19 και 1.36, αντίστοιχα) σε σύγκριση με αδύνατους άνδρες (ΔΜΣ 20-22.4)(Nguyen et al, 2007). Η συσχέτιση αυτή παραμένει ισχυρή ακόμα και μετά τον αποκλεισμό παραμέτρων όπως η ηλικία, ο ΔΜΣ της συζύγου και η συχνότητα επαφών. Μια προοπτική μελέτη από την Ιαπωνία έδειξε ότι άνδρες με υψηλότερο ΔΜΣ είχαν λιγότερες πιθανότητες να αποκτήσουν παιδί σε σύγκριση με χαμηλότερου ΔΜΣ άνδρες, ακόμα και μετά τη συνεκτίμηση παραγόντων όπως της ηλικίας, της αρτηριακή πίεσης, της LDL-χοληστερόλης, των Τριγλυκεριδίων και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης HbA_{1c} (Ohwaki et al, 2009). Σε μια μελέτη επιπολασμού από το Qatar, η ανδρική υπογονιμότητα συνδέθηκε με το ΣΔ (OR,1.958) και την αρτηριακή υπέρταση (OR, 2.558). Η πολυπαραγοντική ανάλυση περαιτέρω έδειξε ότι παχύσαρκοι άνδρες (ΔΜΣ \geq 30) με ΣΔ είχαν 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι υπογόνιμοι σε σύγκριση με πιο αδύνατους άνδρες (ΔΜΣ <25) (Bener et al, 2009).

1.6.4.2 Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα 15 από τις 23 πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες επί του θέματος, η παχυσαρκία μειώνει τη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (Palmer et al, 2012). Αντίθετα αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα όσον αφορά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (με 7/19 από τις μελέτες να αναφέρουν μειωμένη κινητικότητα) και τη μορφολογία (7/16 δείχνουν μειωμένο αριθμό

φυσιολογικών μορφών). Είναι συνεπώς ακόμα αδιευκρίνιστο εάν η παχυσαρκία επηρεάζει τις συμβατικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος. Η αντίφαση αυτή αιτιολογείται από διάφορες παραμέτρους των ερευνών όπως η έλλειψη στοιχείων ενδεικτικών της επίδρασης του τρόπου ζωής (κάπνισμα, αλκοόλ και συννοσηρότητες), η προέλευση των δεδομένων από κλινικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, με σαφή την υπεροχή υπογόνιμων ανδρών καθώς και ο σχεδιασμός τους που σε ορισμένες περιπτώσεις στηρίζεται σε υποκειμενική καταγραφή των δεδομένων.

Αυτός είναι ο λόγος σχεδιασμού μελετών σε πειραματόζωα που επιτρέπει πιο ασφαλή αξιολόγηση της περιβαλλοντικής επίδρασης. Σε ποντίκια που τράφηκαν με τροφή πλούσια σε λιπαρά ικανή να προκαλεί παχυσαρκία σημειώθηκε μειωμένη κινητικότητα και ποσοστό φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Ωστόσο στις μελέτες αυτές παρατηρήθηκε σαν αποτέλεσμα της διατροφής και της παχυσαρκίας ελάττωση των επιπέδων τεστοστερόνης και διαταραχής της ομοιόστασης της γλυκόζης. Η συνολική εντύπωση πάντως είναι ότι η παχυσαρκία επηρεάζει το σπερμοδιάγραμμα χωρίς ωστόσο να προκαλεί δραματικές μεταβολές.

1.6.4.3 Συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ με κατακερματισμό DNA

Η ακεραιότητα του DNA σπέρματος είναι σημαντική για την επιτυχή γονιμοποίηση και τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς αποδεικνύεται από τη συσχέτιση του κατακερματισμένου DNA με αυξημένη συχνότητα αποβολών. Επιπλέον, το οξειδωτικό stress στο σπέρμα σχετίζεται με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αυξημένη καταστροφή σπερματικού DNA, μειωμένη ακροσωμιακή αντίδραση και μειωμένη συχνότητα εμφύτευσης μετά τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Πολυάριθμες εργασίες σε ανθρώπους καθώς και μία σε πειραματόζωα, δείχνουν τη σχέση παχυσαρκίας με μειωμένη ακεραιότητα της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, παρά τη χρήση διαφορετικών τεχνικών για την αξιολόγηση της ακεραιότητας του DNA (TUNEL, COMET, SCSA κ.α.). Ωστόσο μόνο μία μελέτη σε ανθρώπους και μια σε πειραματόζωα κατέγραψε θετική

συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και του οξειδωτικού stress στο σπέρμα. Διαφορές λοιπόν στη μοριακή δομή του σπέρματος παρατηρούνται σε παχύσαρκους άνδρες, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων (Palmer et al, 2012).

1.6.4.4 Παθοφυσιολογική συσχέτιση παχυσαρκίας, ΜΣ και υπογονιμότητας

Η εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία της σπερματογένεσης βρίσκεται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο των ορμονών του φύλου, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζονται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τα κύτταρα Leydig και Sertoli. Παρότι παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει φυσιολογικά επίπεδα FSH και LH σε παχύσαρκους άνδρες, πιο πρόσφατες αναφέρουν μειωμένες συγκεντρώσεις FSH σε παχύσαρκους και δυσανάλογα χαμηλά επίπεδα LH σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, φυσιολογική συχνότητα έκκρισης LH αλλά χαμηλό εύρος του κύματος LH και περιοχή κάτω από την καμπύλη μειωμένη σε σύγκριση με αδύνατους συμμετέχοντες ενώ άλλοι ερευνητές έδειξαν μόνο σε ΔΜΣ > 40 kg/m² μειωμένη τιμή LH και εύρος των LH αιχμών.

Διάφορες έρευνες κατέγραψαν συσχέτιση του ΔΜΣ με ελαττωμένη συγκέντρωση στο πλάσμα SHBG και κατά συνέπεια τεστοστερόνης με επακόλουθη αύξηση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων. Σε μία μετα-ανάλυση 4 τυχαιοποιημένων μελετών, 13 μελετών επιπολασμού και 3 προοπτικών μελετών, άτομα με ΜΣ είχαν ελαττωμένη συγκέντρωση τεστοστερόνης σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Kasturi et al, 2008). Ο συνδυασμός ελαττωμένης τεστοστερόνης με αυξημένα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι συνδέεται με υπογονιμότητα διαταράσσοντας την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση (negative feedback loop) στον άξονα υποθαλάμου, υποφύσεως, γονάδων και γι αυτό ο λόγος Τεστοστερόνη/Οιστραδιόλη χρησιμοποιείται ως δείκτης υπογονιμότητας. Τα κύτταρα Sertoli παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς είναι τα μόνα σωματικά κύτταρα που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα προσφέροντας τόσο

φυσική όσο και τροφική υποστήριξη. Η συγκόλληση τους με τα γεννητικά κύτταρα είναι ανδρογονοεξαρτώμενη και τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης οδηγούν σε κατακράτηση και φαγοκυττάρωση των ώριμων σπερματίδων οδηγώντας σε χαμηλές συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων. Άλλες ορμόνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργικότητας των κυττάρων Sertoli και τη σπερματογένεση είναι η ινχιμπίνη Β, χαμηλά επίπεδα της οποίας έχουν μετρηθεί σε παχύσαρκους νέους άνδρες και η πρωτεΐνη SHBG. Συνεπώς οι χαμηλές συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων που παρατηρούνται σε παχύσαρκα άτομα πιθανό εν μέρει να οφείλονται σε αλλαγές του άξονα ΥΥΓ μέσω μεταβολών στην αναλογία τεστοστερόνης/οιστρογόνα και σε μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού καθώς και διαταραγμένη λειτουργία των κυττάρων Sertoli.

Η υπερινσουλιαιμία και η υπεργλυκαιμία έχουν ανασταλτική δράση στην ποσότητα του σπέρματος και την ποιότητα του. Τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης προτείνονται ως υπεύθυνος παράγοντας για την ελάττωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, αύξηση των τοξικών ελεύθερων ριζών οξυγόνου και βλάβης του σπερματικού DNA (Kasturi et al, 2008). Είναι γνωστό ότι η υπερινσουλιαιμία προκαλεί ελάττωση της παραγωγής από το ήπαρ SHBG επηρεάζοντας τα επίπεδα ελεύθερης τεστοστερόνης και οιστραδιόλης στο αίμα (La Vignera et al, 2012). Η υπεργλυκαιμία επίσης έχει βρεθεί ότι μειώνει σε πειραματόζωα την εκκρινόμενη ποσότητα LH από την υπόφυση.

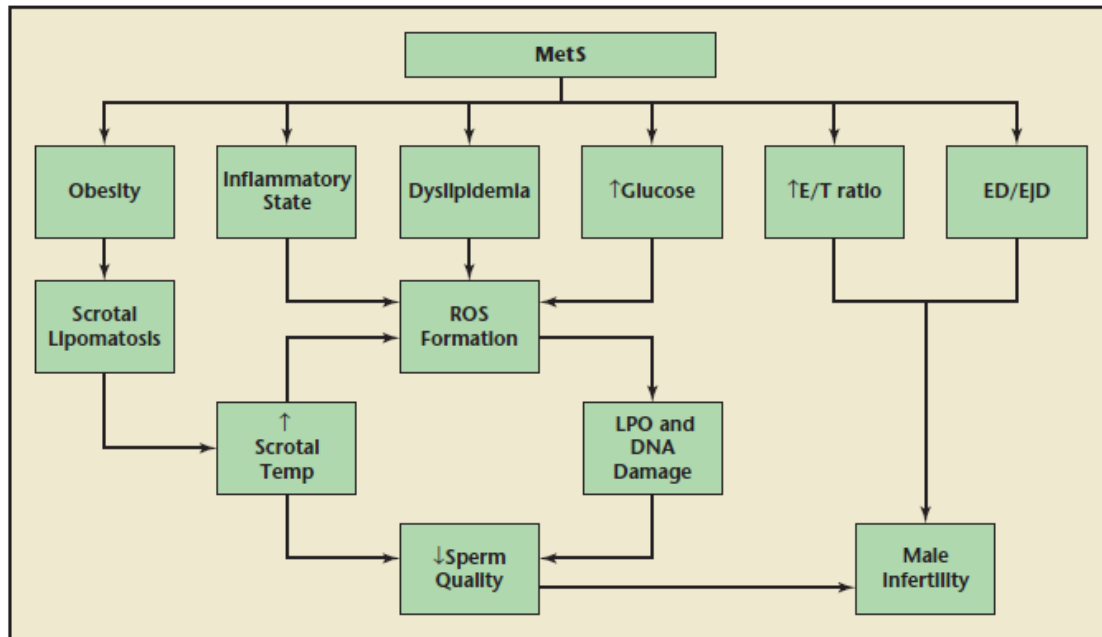
Πέρα από την επίδραση του υπερτροφικού λιπώδους ιστού στον άξονα ΥΥΓ, η έκκριση από αυτόν ορμονών όπως η λεπτίνη, η αντιγονεκτίνη ή η ρεζιστίνη φαίνεται να επηρεάζει τις φυλετικές ορμόνες. Η λεπτίνη έχει διττό ρόλο με τη συγκέντρωση της να είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης λίπους στο σώμα και σε φάσεις μεταβολής του βάρους η λεπτίνη να ενορχηστρώνει τα σήματα προς διατήρηση ενεργειακής ισορροπίας. Εμπλέκεται στη ρύθμιση έκκρισης της LH, που αναστέλλεται σε περιόδους νηστείας, επηρεάζοντας αρνητικά τη γονιμότητα. Στην περιφέρεια αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης σε παχύσαρκους άνδρες αναστέλλουν την παραγωγή από τα κύτταρα Leydig τεστοστερόνης. Τα επίπεδα λεπτίνης συσχετίζονται με την ολική και ελεύθερη τεστοστερόνη ακόμα και μετά τον αποκλεισμό της επίδρασης SHBG, LH και οιστραδιόλης (E₂). Ο ρόλος των υπολοίπων

λιποκινών δεν είναι ξεκάθαρος, ωστόσο η ορμονική επίδρασή τους στον όρχι φαίνεται να συνδέει την ενεργειακή ομοιόσταση με την αναπαραγωγή (Michalakis et al, 2013).

Η αύξηση της θερμοκρασίας στο όσχεο σαν αποτέλεσμα της παχυσαρκίας θα μπορούσε να συνεισφέρει στις παρατηρούμενες μεταβολές του σπέρματος. Η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι ιδιαίτερα ευάλωτη σε αλλαγές της θερμοκρασίας με το ιδανικό εύρος να κυμαίνεται από 34-35°C. Η τοπική αύξηση της θερμοκρασίας σαν συνέπεια τη συγκέντρωσης λίπους, σχετίζεται με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων, αυξημένο κατακερματισμό DNA και οξειδωτικό stress στο σπέρμα (Gorbachinsky et al, 2010).

Ενδιαφέρον προκαλεί τα τελευταία χρόνια η σύνδεση της παχυσαρκίας και του ΜΣ με το αυξημένο οξειδωτικό stress τόσο συνολικά στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της χρόνια ενεργοποιημένης φλεγμονής όσο και συγκεκριμένα στις γονάδες. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων και είναι ιδιαίτερα τοξικές για τα αναπτυσσόμενα σπερματοζωάρια, αναδεικνύοντας τη σημασία του οξειδωτικού stress στην υπογονιμότητα. Οι πλούσιες σε λιπίδια μεμβράνες των γεννητικών κυττάρων τις καθιστούν ιδιαίτερα ευάλωτες στη δράση των ελευθέρων ριζών (Kasturi et al, 2008).

Η εικόνα 1.4 συνοψίζει τους προτεινόμενους μηχανισμούς μέσω των οποίων η παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο φαίνεται να επηρεάζουν τη γονιμότητα.



Εικόνα 1.4 Η παχυσαρκία μπορεί να οδηγεί σε αυξημένη εναπόθεση λίπους και αυξημένη θερμοκρασία στο όσχεο, που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος. Η διαταραχή αυτή περαιτέρω ενισχύεται από τη δυσλιπιδαιμία, την υπεργλυκαιμία και την προφλεγμονώδη κατάσταση που συνεισφέρει στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και στη βλάβη στο σπέρμα. Αυξημένος λόγος οιστρογόνων/ τεστοστερόνη (E/T), στυτική δυσλειτουργία και διαταραχές της εκσπερμάτισης μπορεί να συμβάλουν επίσης στην υπογονιμότητα.

1.7 Συμβολή του διατροφικού λίπους στην εμφάνιση παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου

Η παρατηρούμενη αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας και διατροφικές συνήθειες. Συγκεκριμένα αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη, υψηλή ενεργειακή αποδοτικότητα, αυξημένη κατανάλωση υδατανθράκων και λίπους στη διατροφή έχουν αναφερθεί ότι οδηγούν στην παχυσαρκία (Moussavi et al, 2008). Ειδικότερα, η αύξηση στην ποσότητα του λίπους

στη διατροφή έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας ενώ η σύνδεση μεταξύ παχυσαρκίας και διατροφικού λίπους έχει αποτελέσει το αντικείμενο αρκετών μελετών. Μερικοί συγγραφείς πρότειναν ότι πλούσια σε λιπαρά διατροφή μπορεί να οδηγήσει σε παχυσαρκία, επειδή το λίπος είναι ένα ενεργειακά αποδοτικό θρεπτικό συστατικό. Επιπλέον, το διαιτητικό λίπος μπορεί να συμβάλλει στην παχυσαρκία μέσω παθητικής υπερκατανάλωσης, επειδή το θρεπτικό αυτό συστατικό επιφέρει σε μικρότερο βαθμό αίσθημα κορεσμού σε σύγκριση με τους υδατάνθρακες ή τις πρωτεΐνες (Melanson et al, 2009).

Μερικοί ερευνητές πρότειναν πρόσφατα ότι πέραν της αυξημένης ποσότητας λίπους, η προέλευση των λιπαρών οξέων θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα (Saturated fatty acids – SFA), πολυακόρεστα (Polyunsaturated fatty acids – PUFA) και μονοακόρεστα (Monounsaturated fatty acids – MUFA). Οι διαφορετικοί τύποι των λιπαρών οξέων εμφανίζουν διαφορετικές μεταβολικές συμπεριφορές, όπως την ευαισθησία στην οξείδωση και τη διαφορά στο ρυθμό εναπόθεσης τους, που μπορεί να συμβάλουν στην αύξηση του βάρους. Η δομή των διατροφικών λιπαρών οξέων, το μήκος της αλυσίδας, ο βαθμός μη κορεσμού, η θέση και η διαμόρφωση των διπλών δεσμών φαίνεται να επηρεάζουν τη μεταβολική τους τύχη. Κατά τη σύγκριση της πρόσληψης από τη διατροφή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) ή κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) στον άνθρωπο, τα αποτελέσματα έδειξαν μία μείωση στην εναπόθεση λίπους με μια διατροφή πλούσια σε MUFA (Christiansen et al, 1997). Από την άλλη πλευρά οι Coelho κ συν. ανέφεραν ότι η προσθήκη 30% φυσικέλαιου στη διατροφή (μία γνωστή πηγή MUFA) οδήγησε σε μία μικρή αλλά σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους (2,3 kg) σε υπέρβαρα άτομα μετά από 8 εβδομάδες, αλλά αυτή η αύξηση του σωματικού βάρους ήταν μικρότερη από αυτή που είχε προβλεφθεί θεωρητικά (Coelho et al, 2006). Συγχρονικές επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης PUFA, MUFA και SFA και του κινδύνου της παχυσαρκίας. Παρ' όλα αυτά, μερικοί ερευνητές δεν βρήκαν καμία σχέση μεταξύ της κατανάλωσης PUFA, MUFA, ή SFA και του κινδύνου της παχυσαρκίας (Moussavi et al, 2008). Τα αποτελέσματα από επιδημιολογικές μελέτες

είναι αμφιλεγόμενα, όταν εξετάζουν τη σχέση μεταξύ των διαφόρων τύπων των λιπαρών οξέων και της επίδρασης στο σωματικό βάρος.

Η συντριπτική πλειοψηφία των συγχρονικών μελετών επιπολασμού που έχουν πραγματοποιηθεί με μια ποικιλία μεθοδολογιών, σε πολλές χώρες και σε διάφορες ηλικιακές ομάδες κατά τη διάρκεια των τελευταίων 15 χρόνων δείχνουν μια συσχέτιση μεταξύ της υψηλότερης πρόσληψης λίπους (συνήθως αναφέρεται ως ποσοστό των θερμίδων πρόσληψης, αλλά άλλοτε και ως συνολική πρόσληψη λίπους) και της αύξησης του βάρους. Μεγαλύτερης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες και προοπτικές μελέτες κοόρτης δε δείχνουν σαφή θετική συσχέτιση μεταξύ διατροφικής πρόσληψης λίπους και αύξησης του σωματικού βάρους (Moussavi et al, 2008).

Πολλές μικρότερες μελέτες παρέμβασης που εξετάζουν την επίδραση της σύνθεσης της δίαιτας για την απώλεια βάρους, έχουν διαπιστώσει ότι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και υψηλότερης σε λιπαρά δίαιτες (με βάση την δίαιτα Atkins που έχει σχεδιαστεί σχετικά με τον περιορισμό των διατροφικών υδατανθράκων) συχνά οδηγούν σε μεγαλύτερη απώλεια βάρους από ότι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε λιπαρά ή πιο παραδοσιακές δίαιτες απώλειας βάρους (Bravata et al, 2003). Οι διαφορές ως προς άλλα μακροθρεπτικά συστατικά των διατροφικών προτύπων που δεν είναι γνωστές και η υψηλή συχνότητα απόσυρσης από τις μελέτες περιορίζουν την αξία των αποτελεσμάτων. Μεγαλύτερες μελέτες παρέμβασης δείχνουν ότι η ελάττωση της διατροφικής πρόσληψης λίπους σχετίζεται με απώλεια βάρους (Avenell et al, 2004). Ωστόσο, οι μελέτες δεν σχεδιάστηκαν ειδικά για να εξετάσουν το ρόλο του διατροφικού λίπους στο σωματικό βάρος, και κατά συνέπεια διαφορές στην εφαρμοζόμενη παρέμβαση καθιστούν αδύνατη την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων από τα αποτελέσματα αυτά. Συστηματικές μετααναλύσεις των ερευνών υποδηλώνουν ότι χαμηλότερης περιεκτικότητας σε λιπαρά ολιγοθερμιδικές δίαιτες συνδέονται με μεγαλύτερη απώλεια βάρους, αν και τα αποτελέσματα αυτά ομοίως περιορίζονται από το σχεδιασμό των μελετών που περιλαμβάνονται ενώ τα δεδομένα σχετικά με τη διατήρηση του βάρους είναι πολύ περιορισμένα.

1.7.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα (Saturated fatty acids – SFA)

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα περιέχουν το μέγιστο αριθμό ατόμων υδρογόνου που μπορούν να συγκρατήσουν και κανέναν διπλό δεσμό (ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς). Στη φύση συναντάμε αρκετά είδη κορεσμένων λιπαρών οξέων και η μόνη διαφορά μεταξύ τους είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα που υπάρχουν στην αλυσίδα τους. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα εμφανίζονται σε διαφορετικές αναλογίες μεταξύ των ομάδων τροφίμων. Το λαυρικό και μυριστικό οξύ βρίσκονται συνήθως σε "τροπικά" έλαια (π.χ., φοινικέλαιο, έλαιο καρύδας) και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το κορεσμένο λίπος στο κρέας, τα αυγά, τη σοκολάτα, και τα καρύδια είναι πρωτίστως τα τριγλυκερίδια του παλμιτικού και στεατικού οξέος.

Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση της παχυσαρκίας με την αύξηση της πρόσληψης SFA χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξαχθεί από αυτές αιτιώδης συσχέτιση. Σε προοπτικές μελέτες η αναλογία ενεργειακής προέλευσης από τα SFA επηρεάζει την επακόλουθη μεταβολή του βάρους. Επεμβατικές μελέτες αργότερα έδειξαν ότι μείωση της κατανάλωσης SFA βοήθησε στην πρόληψη αύξησης του σωματικού βάρους κατά την εμμηνόπαυση, στα πλαίσια μιας πολυπαραγοντικής παρέμβασης χωρίς να μπορεί να εκτιμηθεί ξεχωριστά η επίδρασή τους (Field et al, 2007). Μια θετική συσχέτιση μεταξύ της αντίστασης στην ινσουλίνη και των διατροφικών SFA ανεξάρτητη της παχυσαρκίας στους άνδρες με στεφανιαία νόσο καταγράφηκε από τον Maron κ.α. (Maron et al, 1991). Μικρές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αντικατάσταση των SFA με n-6 PUFA βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Heine et al, 1989; Summers et al, 2002). Σε ασθενείς με ΣΔ, 6 εβδομάδων διατροφή πλούσια σε SFA αυξάνει την υπερινσουλιαιμία χωρίς αλλαγές στο σωματικό βάρος ή το γλυκαιμικό έλεγχο σε σύγκριση με πλούσια σε MUFA δίαιτα (Christiansen et al, 1997)

Εν ολίγοις, όπως όλα τα στοιχεία δείχνουν, μία αρνητική συσχέτιση των SFA με το σωματικό βάρος και την αντίσταση στην ινσουλίνη υπάρχει, και ως εκ τούτου θα πρέπει να περιορίζεται η πρόσληψη των βλαβερών αυτών λιπαρών. Μια μεγάλη,

καλά ελεγχόμενη τυχαιοποιημένη μελέτη θα χρειαστεί βέβαια για την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων.

1.7.2 Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated fatty acids – MUFA)

Οι κύριες διατροφικές πηγές μονοακόρεστων λιπαρών οξέων είναι τα φυτικά έλαια (όπως το ελαιόλαδο, το έλαιο canola, φυσικέλαιο, ηλιέλαιο και σησαμέλαιο), το αβοκάντο, οι ξηροί καρποί και σπόροι. Το κυριότερο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό οξύ που έχει 18 άτομα άνθρακα και ένα διπλό δεσμό στο 9^ο άτομο. Αυξημένη πρόσληψη MUFA από τη διατροφή αυξάνει τη θερμογένεση που προκαλείται από τη διατροφή και τη διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο άλλη μελέτη 24ωρης καταγραφής θερμοδομετρίας δεν αναδεικνύει διαφορά μεταξύ υψηλής περιεκτικότητας σε MUFA ή χαμηλής σε λιπαρά διατροφής ως προς την κατανάλωση ενέργειας (Rasmussen et al, 2006). Το ενδιαφέρον για την προστατευτική δράση από μια δίαιτα πλούσια σε MUFA προήλθε από μελέτες που κατέδειξαν ότι σε περιοχές με υψηλή πρόσληψη MUFA παρατηρούνταν χαμηλά ποσοστά θανάτου από στεφανιαία νόσο (Keys et al, 1986). Στις μελέτες αυτές αποδείχτηκε ότι οι πληθυσμοί που καταναλώνουν μια δίαιτα πλούσια σε MUFA είχαν χαμηλά επίπεδα της χοληστερόλης, παρά το αυξημένο ολικό λίπος (33-40% των συνολικών θερμίδων), αλλά τη χαμηλή πρόσληψη SFA (7-8% των θερμίδων). Αν και οι μηχανισμοί δεν είναι απολύτως σαφείς, πιστεύεται ότι το ελαϊκό έλαιο παρέχει προστασία κατά της στεφανιαίας νόσου μέσω της επίδρασης στο λιπιδαιμικό προφίλ ή των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων αλλά τα στοιχεία δείχνουν επίσης ότι τα MUFAs μειώνουν τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (Sirtori et al, 1986) και αυξάνουν την ινωδολύση.

Ανεπαρκή είναι τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση των MUFA συνολικά στο σωματικό βάρος. Μεταξύ των συγχρονικών μελετών, ορισμένες έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης MUFA και του κινδύνου της παχυσαρκίας (Doucet et al, 1998), ενώ άλλες δεν κατέληξαν σε συσχέτιση (Bes-Rastrollo et al, 2006; Sanchez-

Villegas et al, 2006; Trichoroulou et al, 2002; Trichoroulou et al, 2000). Μελέτες για τις επιπτώσεις της αύξησης της κατανάλωσης MUFA στο σωματικό βάρος είναι λίγες και έχουν αποφέρει ανάμεικτα αποτελέσματα. Σε μια πρόσφατη καλά σχεδιασμένη μελέτη με την περιορισμένης ενεργειακής αξίας με βάση το Μεσογειακό πρότυπο διατροφή που περιελάμβανε MUFA, τόσο η Μεσογειακή όσο και υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά διατροφή οδήγησαν σε μεγαλύτερη απώλεια βάρους σε σχέση με διατροφή πτωχή σε λιπαρά (Shai et al, 2008). Αντίθετα, μια άλλη πρόσφατη μελέτη δεν έδειξε διαφορές στην ανάκτηση βάρους ή λίπους μεταξύ μιας διατροφής πλούσιας σε MUFA, μιας διατροφής χαμηλής σε λιπαρά και μιας φυσιολογικής δίαιτας ελέγχου σε χρονικό διάστημα άνω των 6 μηνών (Due et al, 2008). Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι μια διατροφή πλούσια σε MUFA οδηγεί σε πιο περιορισμένη εναπόθεση λίπους σε σύγκριση με μια διατροφή πλούσια σε SFA (Soares et al, 2004), αλλά αυτό το εύρημα δεν επιβεβαιώνεται από όλες τις σχετικές μελέτες. Υπάρχουν επίσης κάποιες ενδείξεις ότι μια διατροφή πλούσια σε MUFA διατηρεί μυϊκή μάζα όταν περιορίζεται η πρόσληψη ενέργειας (Clifton et al, 2004) αλλά και πάλι, άλλες μελέτες δεν βρίσκουν διαφορές (Due et al, 2008). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η ποσότητα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και των n-3 λιπαρών οξέων σχετίζεται αντίστροφα με την κεντρική παχυσαρκία στον άνθρωπο, ενώ η συσχέτιση με τα PUFAs είναι θετική (Garaulet et al, 2001).

Υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή ευεργετική επίδραση της υψηλής πρόσληψης MUFA στις διάφορες συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου. Αρκετές μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης MUFA και του κινδύνου στεφανιαίας νόσου (Trichoroulou et al, 2003) και ισχαιμικού επεισοδίου (Trichoroulou et al, 2003). Επιπλέον, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δίαιτες πλούσιες σε MUFA συνδέονται με χαμηλότερη αρτηριακή πίεση σε σύγκριση με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δίαιτες (Shah et al, 2007). Εξάλλου η αντικατάσταση των SFA με MUFA (κυρίως με τη μορφή του ελαιολάδου) στη διατροφή μειώνει την LDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, τη μεταγευματική λιπαιμία, την αρτηριακή πίεση, ενώ βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ελαττώνει τους δείκτες φλεγμονής. Όσον αφορά την HDL χοληστερόλη τα

αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα, με μερικές μελέτες να δείχνουν αύξηση σε περίπτωση υποκατάστασης των MUFA με SFA στη διατροφή ενώ σε άλλες δε φαίνεται να επηρεάζονται. Εξάλλου οι Shai κ συν. (Shai et al, 2008), έδειξαν ότι σε ασθενείς με ΣΔ, η χορήγηση δίαιτας περιορισμένης θερμιδικής αξίας μεσογειακού τύπου επέφερε πιο ευνοϊκές αλλαγές στη γλυκόζη νηστείας, την ινσουλίνη νηστείας και την αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη χρήση του προτύπου HOMA σε σύγκριση με ισοθερμιδικές χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά ή υδατάνθρακες δίαιτες.

1.7.3 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids – PUFA)

Οι κύριες κατηγορίες των διατροφικών n-3 PUFA είναι τα μακράς αλύσου λιπαρά οξέα (εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το docosahexaenoic οξύ (DHA) που προέρχονται από ψάρια κρύου νερού (π.χ. σολομός, σκουμπρί) και το μικρότερης αλυσίδας λινοϊκό οξύ (ALA) που προέρχεται από φυτικές πηγές (π.χ. το λιναρόσπορο και τους ξηρούς καρπούς καρύδια, συμπεριλαμβανομένων και των αμύγδαλων). Η καρδιοπροστατευτική δράση των n-3 PUFA πιστεύεται ότι προέρχεται από την αντι-αρρυθμική τους ιδιότητα, αντι-θρομβωτικές, αντι-υπερτασικές και αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις. Πιστεύεται επίσης ότι βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία, μειώνουν τα τριγλυκερίδια, και, ενδεχομένως, να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των αθηροσκληρωτικών πλακών. Υπάρχουν ανεπαρκή στοιχεία σχετικά με την επίδραση τους το σωματικό βάρος ή την αντίσταση στην ινσουλίνη με λίγες μόνο έρευνες που αξιολογούν την επίδραση της εισαγωγής στη διατροφή ιχθυελαίων με θετικά αποτελέσματα.

Όσον αφορά τα n-6 PUFAs, κύρια πηγή τους είναι το σησαμέλαιο και το ηλιέλαιο. Το λινοϊκό οξύ είναι ο κύριος εκπρόσωπός τους. Μόνο μία πρόσφατη μελέτη έδειξε αύξηση του σωματικού βάρους σε άτομα με αυξημένη πρόσληψη n-6 PUFAs ενώ άλλες δείχνουν ότι αντικατάσταση των SFAs με PUFAs βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ των συμμετεχόντων.

1.8 Διατροφικά λιπαρά οξέα και ουροποιητικό σύστημα

Προστάτης

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση SFA (παλμιτικό οξύ, στεατικό οξύ), που συνήθως περιλαμβάνονται στο κρέας, το γάλα, τα αυγά, το φοινικέλαιο και λάδι καρύδας, συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου προστάτη και μειωμένη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Park et al, 2009; Strom et al, 2008; Whittemore et al, 1995). Ωστόσο, άλλοι δεν αναφέρουν σημαντική σύνδεση (Crowe et al, 2008; Jackson et al, 2012). Οι προκλινικές μελέτες σε ζώα έδωσαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, καθώς ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι μια διατροφή πλούσια σε SFA δεν μπορεί να επάγει την ανάπτυξη του καρκίνου προστάτη ή να μειώσει την σχετιζόμενη με τον καρκίνο επιβίωση σε ποντίκια (Lloyd et al, 2010) ενώ άλλοι υποστηρίζουν το αντίθετο. Οι Escobar και συν. σύγκριναν ισοθερμιδικές δίαιτες με 7% λίπος μόνο, και ανακάλυψαν ότι σε επίμυες με διατροφή πλούσια σε λαρδί εμφανίζεται σημαντικά αυξημένο βάρος του προστάτη, της τεστοστερόνης, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της έκφρασης ανδρογονικού υποδοχέα (AR) σε σύγκριση με αρουραίους που έλαβαν τροφή που περιλαμβάνει λιπαρά που προέρχονται από έλαιο λιναρόσπορου (Escobar et al, 2009). Έτσι το λαρδί, το οποίο είναι πλούσιο σε παλμιτικό οξύ και ελαϊκό οξύ φαίνεται να έχει καρκινογόνο δράση σε σύγκριση με δίαιτα πλούσια σε ω-3 PUFA .

Πρώιμες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν μία χαμηλότερη συχνότητα ορισμένων μορφών καρκίνου σε Μεσογειακές περιοχές, όπου οι άνθρωποι καταναλώνουν μια διατροφή πλούσια σε ελαιόλαδο, της οποίας κύριο συστατικό είναι το ελαϊκό οξύ (MUFA). Ωστόσο η επίδραση των διατροφικών MUFAs στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου προστάτη εξακολουθεί να είναι ασαφής, δεδομένου ότι εκτός των διατροφικών MUFAs άλλα συστατικά τη μεσογειακής διατροφής μπορεί να συμβάλλουν, όπως οι ντομάτες, το λυκοπένιο, η resveratrol, η αυξημένη πρόσληψη ψαριών και η μειωμένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος, τα οποία έχουν όλα συσχετιστεί με την ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου .

Είναι γενικά κατανοητό ότι η αύξηση των ω-6 PUFA στην διατροφή αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και προάγει την εξέλιξη της νόσου ενώ τα ω-3 PUFA εμφανίζουν μια μοναδική, προστατευτική επίδραση. Ενώ η διάκριση μεταξύ των ευνοϊκών και των βλαβερών PUFA είναι ακόμη υπό συζήτηση, καμία μελέτη δεν έχει αντικρούσει τα οφέλη μιας ισορροπημένης διατροφής σε PUFA. Προς στήριξη των επιδημιολογικών δεδομένων, αρκετές μελέτες σε ζώα έχουν περιγράψει ένα αντικαρκινικό όφελος από τη διατροφή που περιέχει μικρή αναλογία ω-6/ ω-3 PUFA, η οποία είναι σε αντίθεση με τον υψηλό 30:1 λόγο της τυπικής Δυτικής διατροφής. Συνολικά, η βιβλιογραφία φαίνεται να προτείνει το ρόλο των διατροφικών PUFA στον έλεγχο της βιολογίας του καρκίνου του προστάτη αλλά περαιτέρω έρευνες απαιτούνται για την αναγνώριση των μοριακών μηχανισμών.

Όσον αφορά την ΚΥΠ, πειράματα σε ζωικά πρότυπα έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης λιπαρών από τη διατροφή και αλλαγών στη δομή και τη λειτουργία του προστάτη (Cai et al, 2001; Kozlowski et al, 2001; Rahman et al, 2007). Τα δεδομένα για την επίδραση των διατροφικών λιπαρών οξέων στις ορμόνες του φύλου είναι αντικρουόμενα. Στους ανθρώπους, η πλούσια σε λιπαρά, χαμηλής περιεκτικότητας σε ίνες διατροφή δεν επηρεάζει τις ορμόνες του φύλου (εκτός από το κλάσμα της τεστοστερόνης που δεσμεύεται από τη φυλοδεσμευτική σφαιρίνη SHBG το οποίο είναι σημαντικά αυξημένο) ενώ φαίνεται να τροποποιεί τον μεταβολισμό των ενδογενώς παραγόμενων στεροειδών αφού η ημερήσια ολική απέκκριση τεστοστερόνης στα ούρα είναι υψηλότερη, σε αντίθεση με τη χαμηλότερη απέκκριση οιστραδιόλης και οιστριόνης (Dorgan et al, 1996). Στους αρουραίους η πλούσια σε λιπαρά διατροφή δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα των ανδρογόνων στον ορρό ή εντός του προστάτη ενώ η έκφραση των ανδρογονοεξαρτώμενων γονιδίων δεν μεταβλήθηκε. Ωστόσο άλλοι ερευνητές έδειξαν διαταραχή της λειτουργίας των όρχεων και χαμηλότερα επίπεδα ανδρογόνων στο πλάσμα αρουραίων με υπερχοληστερολαιμία που προκλήθηκε σαν αποτέλεσμα της διατροφής (Gromadzka-Ostrowska et al, 2002; Tanaka et al, 2001).

Τα αποτελέσματα της επίδρασης του διατροφικού λίπους στην ιστολογική εικόνα του προστάτη ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του πειραματοζώου που

χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη και τη σύνθεση της τροφής. Έτσι σε άλλες μελέτες δε φαίνεται να επηρεάζεται η αρχιτεκτονική του αδένου, σε μία μελέτη αυξάνεται το συνολικό βάρος του προστάτη και εμφανίζονται υπερπλαστικές αλλοιώσεις ενώ σε πρόσφατη μελέτη από την ομάδα Μητρόπουλου κ συν. (Ploumidou et al, 2010) έδειξε θηλώδεις προσεκβολές στον αυλό των αδενίων, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων και σχηματισμό ενδοκυτταροπλασματικών κενотоπίων στα οποία αποθηκεύονται λιπίδια, ιστολογικές αλλοιώσεις που ομοιάζουν προς την ανθρώπινη καλοήγη υπερπλασία.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση των λιπαρών οξέων της διατροφής με την προστατική υπερπλασία. Έχει φανεί ότι αυξημένη πρόσληψη πρωτεϊνών και ορισμένων PUFA αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΥΠ (Suzuki et al, 2002). Η αυξημένη πρόσληψη ζωικών λιπαρών έχει προταθεί ως ένας από τους λόγους που η σύγχρονη δυτική διατροφή αυξάνει τον κίνδυνο της ΚΥΠ (Rohrmann et al, 2007).

Όρχεις –Σπέρμα

Δεδομένα από πειραματόζωα υποστηρίζουν ότι τα διατροφικά λιπαρά μπορεί να επηρεάσουν την ανδρική γονιμότητα (Blesbois et al, 2004; Bongalhardo et al, 2009; Roqueta-Rivera et al, 2010). Μελέτες σε ανθρώπους και ζώα έχουν συσχετίσει συγκεκριμένη αναλογία λιπαρών οξέων στο σπέρμα με την ποιότητα του σπέρματος (Safarinejad et al, 2010; Tavilani et al, 2006). Ωστόσο, ο δυνητικός ρόλος των προσλαμβανόμενων από τη διατροφή λιπαρών οξέων στην ποιότητα του σπέρματος δεν έχει αποτελέσει αντικείμενο ιδιαίτερης έρευνας.

Σε ένα δείγμα νέων ανδρών που εξετάστηκαν σε κλινική υπογονιμότητας, βρέθηκε ότι διατροφή πλούσια σε PUFAs και φτωχή σε SFA συσχετίστηκε με ευνοϊκότερες παραμέτρους στην ανάλυση του σπέρματος (Attaman et al, 2012). Η ολική πρόσληψη λίπους είχε αρνητική συσχέτιση με το συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων και τις συγκεντρώσεις τους. Οι συσχετίσεις αυτές φαίνεται να επηρεάζονται κυρίως από την πρόσληψη SFA. Αντίστοιχα, η πρόσληψη ω-3 PUFAs

συσχετίστηκε θετικά με φυσιολογική μορφολογία των σπερματοζωαρίων. Τα προσλαμβανόμενα από τη διατροφή λιπαρά οξέα δεν συσχετίστηκαν με τα επίπεδα στο σπέρμα ή στο σπερματικό πλάσμα των λιπαρών οξέων. Είναι γνωστό ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν ενδογενώς από το acetyl CoA και συνεπώς η συγκέντρωσή τους σε κυτταρικό επίπεδο αντανακλά τόσο τη de novo λιπογένεση όσο και την ενζυματική δραστηριότητα. Αντίθετα τα PUFAs δεν συντίθενται ενδογενώς από τα θηλαστικά και γι αυτό θα πρέπει να προσληφθούν από την τροφή, είτε από ψάρια κρύων νερών ή από το λιναρόσπορο, ξηρούς καρπούς ή συμπληρώματα διατροφής. Αυξημένος τοπικός μεταβολισμός των PUFA στον όρχι καθώς και αυξημένη έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των PUFA και τη de novo λιπογένεση έχει παρατηρηθεί στα κύτταρα Sertoli. Επομένως τα επίπεδα των διαφόρων λιπαρών οξέων στο σπέρμα και το σπερματικό πλάσμα είναι αποτέλεσμα τόσο της πρόσληψης από τη διατροφή όσο και του τοπικού μεταβολισμού κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων. Παλαιότερες μελέτες είχαν δείξει αυξημένη συγκέντρωση SFA στο σπέρμα ασθενοζωοσπερμικών ανδρών (Aksoy et al, 2006; Tavilani et al, 2006) και ολιγοσπερμικών όταν αυτοί συγκρίθηκαν με νορμοσπερμικούς άνδρες (Aksoy et al, 2006). Παρομοίως, η συγκέντρωση ω-3 PUFAs στο σπέρμα και το σπερματικό υγρό συσχετίστηκαν θετικά με την ολική συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων και την κινητικότητα τους.

2. ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS): ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ, ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ – ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

2.1. Βιοχημεία γλυκοζυλίωσης και σχηματισμού AGEs

Τα AGEs σχηματίζονται μη ενζυμικά από την αντίδραση γλυκόζης ή λιπιδίων, που έχουν αναχθεί, με πρωτεΐνες, αλλά και λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Αυτή η αντίδραση περιγράφηκε πρώτη φορά το 1912 από τον Louis Camille Maillard , ο οποίος παρατήρησε ότι όταν τα σάκχαρα υφίστανται θερμική επεξεργασία με αμινοξέα, κατά την προετοιμασία φαγητών σε υψηλές θερμοκρασίες πραγματοποιείται μία μη ενζυμική διαδικασία, που καταλήγει στην μεταβολή του χρώματος των τροφίμων. Η αντίδραση ονομάζεται αντίδραση Maillard ή “browning” εξαιτίας του κίτρινο-καφέ χρώματος των προϊόντων και αποτελεί το κλασικό μονοπάτι που οδηγεί στο σχηματισμό των AGEs. Αρχικά, οι αντιδράσεις της μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης απασχόλησαν τους επιστήμονες που ασχολούνταν με την βιοχημεία των τροφίμων, καθώς διαπιστώθηκε ότι η συγκεκριμένη αντίδραση σχετίζεται με το χρώμα, την γεύση και την βιολογική αξία των τροφίμων (Monnier, 2003).

Η αντίδραση Maillard στην πραγματικότητα δεν είναι μόνο μια αντίδραση αλλά μια σειρά μη ενζυμικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την αντίδραση καρβονυλικών ομάδων σακχάρων, όπως της γλυκόζης ή κάποιας άλλης δραστικής αλδεϋδης, που έχει αναχθεί, με αμινομάδες πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων ή φωσφολιπιδίων. Η πρώιμη γλυκοζυλίωση πραγματοποιείται μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων μόνο ωρών και οδηγεί στο γρήγορο σχηματισμό ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων, που λέγονται βάσεις του Schiff. Οι βάσεις Schiff υφίστανται διάφορες ανακατατάξεις, που διαρκούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (εντός εβδομάδων) και οξειδωτικές τροποποιήσεις (γλυκοξειδώσεις), που επάγονται από την επίδραση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και καταλήγουν σε πιο σταθερά προϊόντα,

τα προϊόντα Amadori, όπως η αιμοσφαιρίνη HbA1c. Τα πρώιμα αυτά παράγωγα υπόκεινται σε αργές, πολύπλοκες μοριακές μεταβολές (αφυδάτωση, συμπύκνωση και σχηματισμός διασταυρούμενων δεσμών – crosslinking) οι οποίες μη αναστρέψιμα οδηγούν στο σχηματισμό των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) (Forbes et al, 2005).

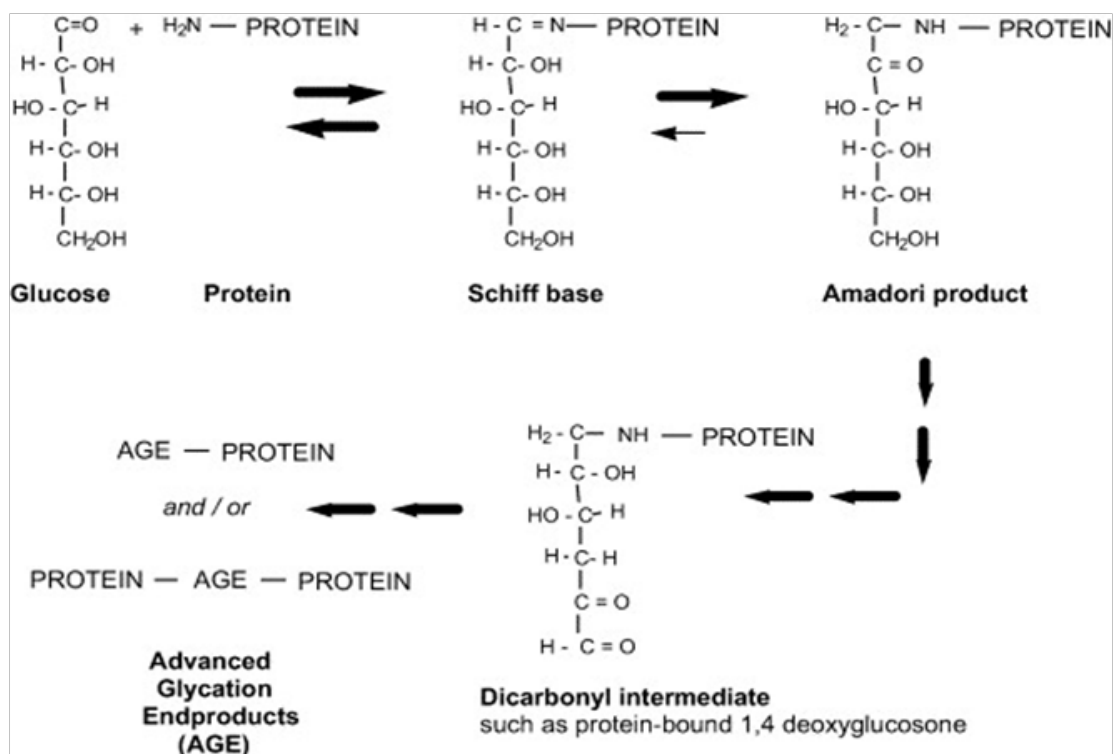
Το στάδιο μετατροπής των προϊόντων Amadori σε AGEs είναι μια μη αντιστρεπτή αντίδραση και έχει μεγάλη χρονική διάρκεια, από μήνες έως χρόνια. Γι' αυτόν τον λόγο τα μακρομόρια στα οποία παρατηρούνται αυτού του είδους οι μετατροπές είναι εκείνα με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, όπως το κολλαγόνο του αγγειακού τοιχώματος. Στις εικόνες 2.1 και 2.2 φαίνονται τα διάφορα στάδια και η χρονική εξέλιξη των αντιδράσεων της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης μέχρι τον τελικό σχηματισμό των AGEs

Ο όρος γλυκοζυλίωση δεν αναφέρεται σε καταλυόμενη από ένζυμα βιοχημική αντίδραση καθώς τροποποιεί τη δράση βιολογικών μακρομορίων σε πλήρη αντίθεση με την ενζυματική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, η οποία λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το δίκτυο Golgi με στόχο τη λειτουργική ενεργοποίηση των γλυκοπρωτεϊνών.

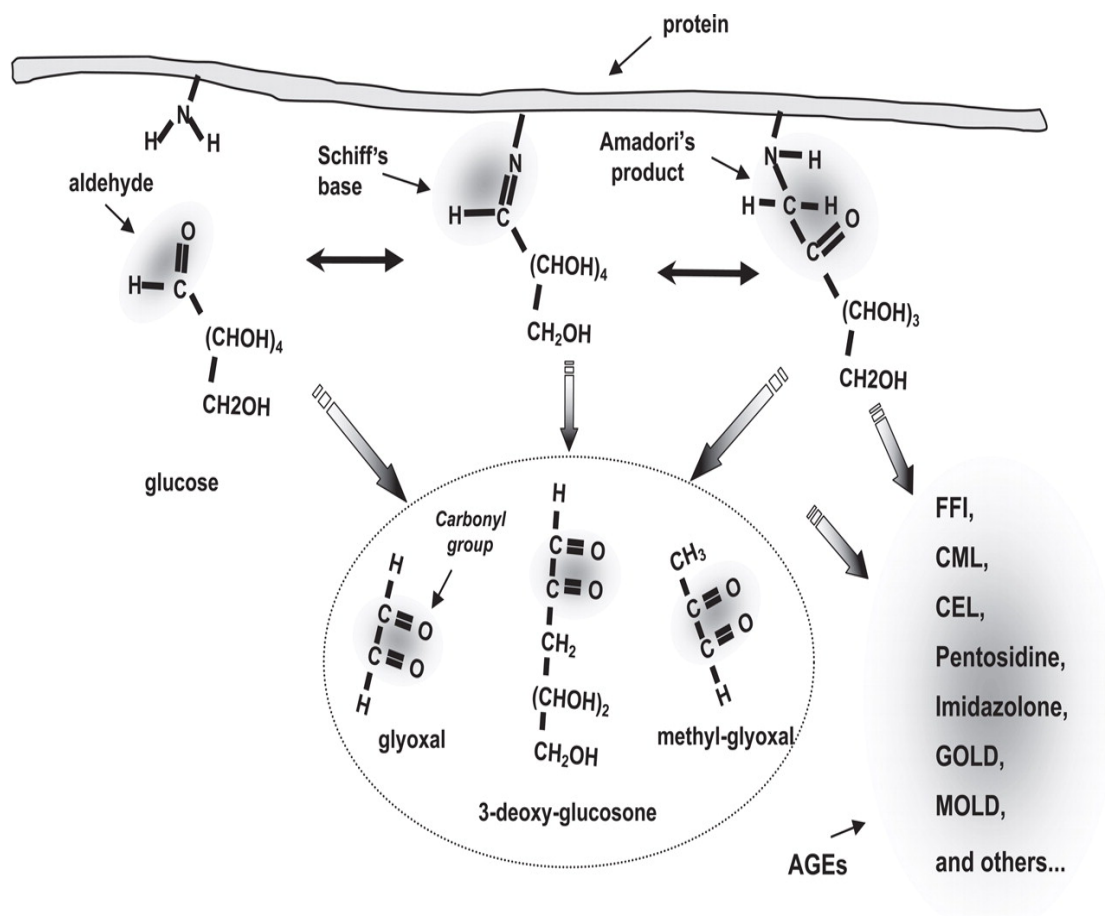
Τα AGEs αποτελούν μια ομάδα πολύπλοκων και ετερογενών ενώσεων χωρίς κοινά δομικά χαρακτηριστικά και βιολογικές δράσεις. Πολλά είναι φθορίζουσες ουσίες και τα περισσότερα δημιουργούν ομοιοπολικές διασυνδέσεις με πρωτεΐνες του οργανισμού. Η κλασική άποψη ότι τα AGEs σχηματίζονται μόνο σε εξωκυττάρια πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, δηλαδή μακράς διάρκειας ζωής σταθερά δομικά μακρομόρια όπως το κολλαγόνο, έχει αρχίσει πλέον να αναθεωρείται. Σήμερα επικρατεί η άποψη ότι τροποποιούνται από τα AGEs ακόμα και ενδοκυττάρια μόρια με μικρό χρόνο ζωής όπως κυτταροκίνες, κυτταρικές πρωτεΐνες και γενωμικό DNA ή μεμβρανικά φωσφολιπίδια (Forbes et al, 2005).

2.2 Πιθανά μονοπάτια σχηματισμού AGEs

Όπως προαναφέρθηκε η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί το κλασικό μονοπάτι σχηματισμού των AGEs και ξεκινάει με μια πυρηνόφιλη αντίδραση προσθήκης ανάμεσα σε μια ελεύθερη αμινομάδα και την καρβονυλική ομάδα ενός σακχάρου για να σχηματιστεί μια αναστρέψιμη Schiff βάση μέσα σε περίοδο ωρών. Η τελευταία μέσα από μια σειρά αναδιευθετήσεων μπορεί να μετατραπεί σε μια πιο σταθερή κετοαμίνη ή προϊόν Amadori μέσα σε περίοδο ημερών. Το προϊόν Amadori, από τη στιγμή που σχηματίζεται, είναι πρακτικά μη αναστρέψιμο. Η πρωτεϊνική μη ενζυμική γλυκοζυλίωση είναι μια αυθόρμητη αντίδραση που εξαρτάται *in vivo* από το βαθμό και τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας, το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης και τη διαπερατότητα του ιστού στην ελεύθερη γλυκόζη (Forbes et al, 2005; Peyroux & Sternberg, 2006). Το προϊόν Amadori μπορεί να μετασχηματιστεί σε μια περίοδο εβδομάδων σε δραστικά δικαρβονυλικά ενδιάμεσα προϊόντα, όπως γλουκοσόνες (π.χ. 1,4-δεοξυγλουκοσόνη, πρόδρομο της γλουκοζεπάνης) για να σχηματιστούν τελικά τα AGEs, όπως η γλουκοζεπάνη. Αυτό είναι το κλασικό μονοπάτι σχηματισμού των AGEs (Εικόνα 2.1)(Peyroux & Sternberg, 2006).



Εικόνα 2.1: Το κλασικό μονοπάτι της μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης που οδηγεί στο σχηματισμό των AGEs μέσω των προϊόντων Amadori. Η αρχική αντίδραση ανάμεσα στη γλυκόζη και την αμινομάδα μιας πρωτεΐνης σχηματίζει μια αναστρέψιμη Schiff βάση, η οποία μετατρέπεται σε ομάδα φρουκτοζαμίνης ή προϊόν Amadori. Με το χρόνο τα προϊόντα αυτά μπορεί να σχηματίσουν τα AGEs μέσω δραστικών δικαρβονυλικών ενδιάμεσων προϊόντων, όπως της συνδεόμενης με πρωτεΐνη 1,4-δεοξυγλουκοζόνης.



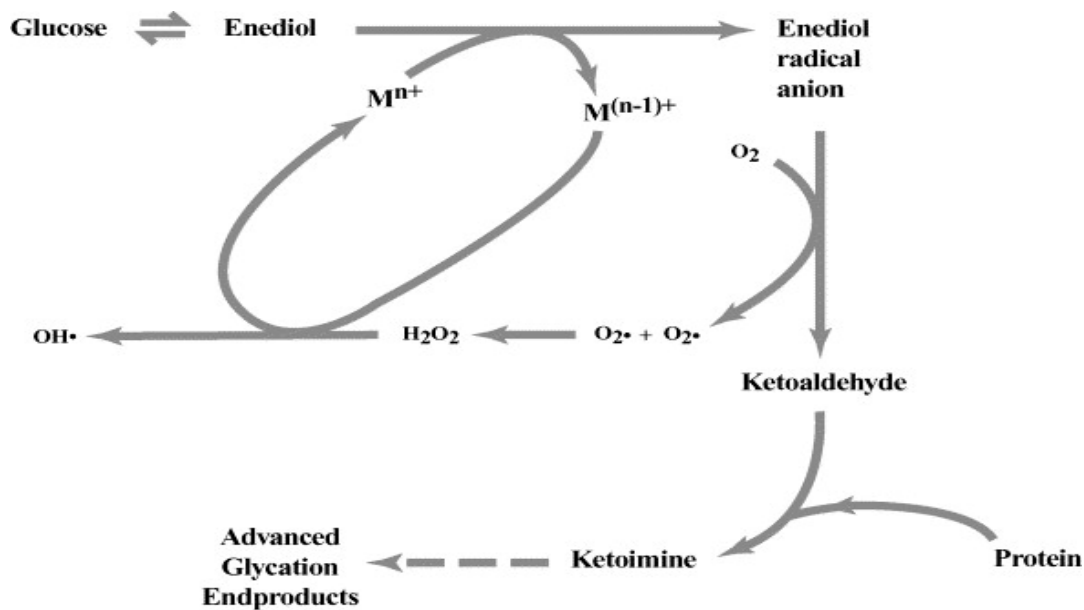
Εικόνα 2.2: Πιθανά μονοπάτια σχηματισμού AGEs.

Παράλληλα με τη διαδικασία δημιουργίας των AGEs επάγεται το μονοπάτι του "καρβονυλικού stress" (carbonyl stress). Συγκεκριμένα, η αυτο-οξειδωση των βάσεων Schiff και των προϊόντων Amadori προκαλεί τη δημιουργία ενδιάμεσων ενεργών δικαρβονυλικών ενώσεων, οι οποίες ονομάζονται α-δικαρβονύλια ή

οξοαλδεΐδες και παράγωγα αυτών είναι οι 3-δεοξυ-γλυκοσόνη, γλυοξάλη και μεθυλ-γλυοξάλη. Τα ενδιάμεσα αυτά προϊόντα διατηρούν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών, τροποποιώντας αφενός τη λειτουργικότητα τους και συνεισφέροντας αφετέρου στο σχηματισμό των AGEs (Εικόνα 2.2). Τα προϊόντα Amadori γενικά είναι περισσότερο σταθερά προϊόντα από τις βάσεις Schiff και πρακτικά μη αναστρέψιμα. Μέσα από πολύπλοκες αντιδράσεις, όπως αφυδάτωση και συμπύκνωση, σχηματίζονται τα AGEs, που είναι τα τελικά μη αναστρέψιμα προϊόντα. Τα προϊόντα Amadori μπορούν επίσης να διασπαστούν με οξείδωση (γλυκοξειδωση) για να παραχθούν AGEs, όπως η καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (carboxymethyl-lysine: CML) (Peyroux & Sternberg, 2006).

Η μεθυλογλυοξάλη έχει αναγνωριστεί ως κύριο ενδοκυττάριο δραστικό δικαρβονυλικό ενδιάμεσο, που προέρχεται από τη γλυκόλυση. Η αυθόρμητη αποφωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και της φωσφορικής διϋδροξυακετόνης στο στάδιο της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της μεθυλογλυοξάλης. Επιπρόσθετα, το ασκορβικό οξύ, η θρεονίνη και η αμινοακετόνη είναι πρόδρομες ουσίες της μεθυλογλυοξάλης. Η μεθυλογλυοξάλη αντιδρά με ελεύθερες ομάδες λυσίνης για τον σχηματισμό των AGEs, όπως της καρβοξυαιθυλυσίνης (carboxyethyl-lysine, CEL) ή του διμερούς της μεθυλογλυοξαλικής λυσίνης (methylglyoxal lysine dimmer, MOLD). Αντιδρά επίσης με την αργινίνη για τον σχηματισμό των υδροϊμιδαζολονών. Η μεθυλογλυοξάλη μπορεί να καταβολιστεί από τις ενδοκυττάρια γλυοξαλάσες (Ahmed, 2005).

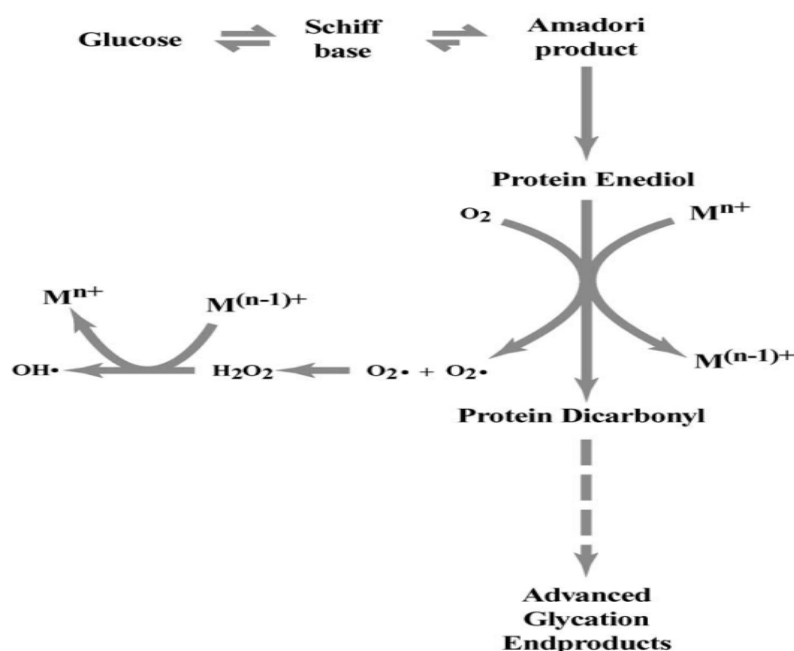
Η γλυκόζη μπορεί άμεσα να οξειδωθεί με την παρουσία καταλυτικών μετάλλων και οξυγόνου (αυτο-οξείδωση). Πιο συγκεκριμένα, μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη, βρίσκονται σε ισορροπία με την «ενεδιόλη» τους, η οποία μπορεί να υποστεί αυτο-οξείδωση με την παρουσία μετάλλων μετάβασης και να σχηματιστεί η ρίζα ενεδιόλης. Αυτή η ρίζα ανάγει το μοριακό οξυγόνο για να παραχθεί ρίζα υπεροξειδίου (O₂⁻) κι έτσι, οξειδώνεται σε δικαρβονυλική κετοαλδεΐδη, η οποία αντιδρά με αμινομάδες πρωτεϊνών σχηματίζοντας την κετοϊμίνη (Ahmed, 2005). Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως «μη ενζυμική γλυκοζυλίωση αυτο-οξείδωσης» (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Μη ενζυμική γλυκοζυλίωση αυτο-οξειδωσης, όπου η γλυκόζη μετατρέπεται σε δικαρβονυλική κετοαλδεΐδη μέσω της ρίζας ενεδιόλης. Αυτή η κετοαλδεΐδη μπορεί να αντιδράσει με μια αμινο-ομάδα πρωτεΐνης για να σχηματιστεί μια κετοϊμίνη ικανή να σχηματίσει AGEs. Αυτά τα στάδια καταλύονται από μέταλλα μετάβασης (M) και η ρίζα υπεροξειδίου που παράγεται μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton.

Οι κετοϊμίνες είναι παρόμοιες, αν και πιο δραστικές από τα προϊόντα Amadori, και συμμετέχουν στο σχηματισμό AGEs. Η καταλύομενη από μέταλλα αυτο-οξειδωση της γλυκόζης μπορεί να είναι σημαντική στους ασθενείς με ΣΔ1 και νεφρική ανεπάρκεια ή/ και αθηροσκλήρωση. Μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό γλυοξάλης, ενός σημαντικού δραστικού δικαρβονυλικού ενδιάμεσου προϊόντος και αραβινόζης. Η τελευταία πεντόζη μπορεί να αντιδράσει με πρωτεΐνες και να σχηματίσει AGEs, όπως την πεντοσιδίνη (Peyroux & Sternberg, 2006). Οι αντιδράσεις οξειδωσης, επίσης, συμμετέχουν στο σχηματισμό των AGEs, ο οποίος επιταχύνεται με την παρουσία οξυγόνου και επιβραδύνεται σε αναερόβιες συνθήκες. Ο όρος «γλυκοξείδωση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αυτο-οξειδωση των προϊόντων Amadori προς AGEs (Εικόνα 2.4). Παρουσία μετάλλων μετάβασης και μοριακού οξυγόνου, τα προϊόντα Amadori μετατρέπονται σε δικαρβονυλικές πρωτεϊνικές ενώσεις μέσω μίας ενεδιόλης πρωτεΐνης που παράγει

τη ρίζα υπεροξειδίου. Οι πρωτεϊνικές δικαρβονυλικές ενώσεις μπορεί να συμμετέχουν στον σχηματισμό AGEs και αναφέρονται ως προϊόντα γλυκοξείδωσης. Από τη στιγμή που σχηματίζονται, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορεί να μετατραπούν σε υψηλά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot) μέσω της αντίδρασης Fenton (Ahmed, 2005).



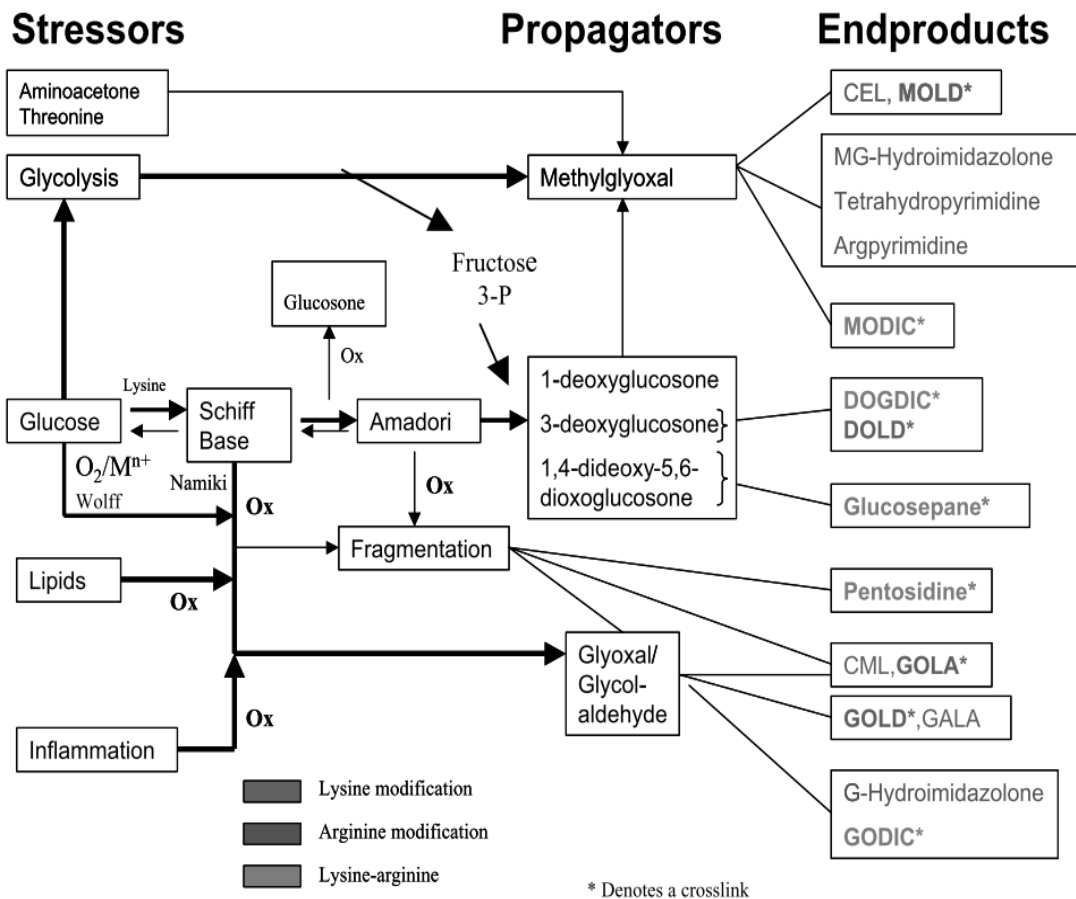
Εικόνα 2.4: Η γλυκοξείδωση όπου οι κετοαμίνες μετατρέπονται σε πρωτεϊνικές δικαρβονυλικές ενώσεις ικανές να σχηματίζουν AGEs. Αυτά τα στάδια καταλύονται από μέταλλα μετάβασης (M) και η ρίζα υπεροξειδίου που παράγεται μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. Οι αμινοομάδες των βάσεων αδενίνης και γουανίνης στο DNA είναι επίσης ευαίσθητες στη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση και το σχηματισμό AGEs, πιθανότατα λόγω των δραστικών ενδοκυττάρων σακχάρων. Τα AGEs μπορούν, επίσης, να σχηματιστούν και από τα φωσφολιπίδια και να προκαλέσουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων μέσω μιας άμεσης αντίδρασης ανάμεσα στη γλυκόζη και τις αμινοομάδες των φωσφολιπιδίων, όπως τα κατάλοιπα φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοσερίνης.

Επιπρόσθετα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων παράγει μερικά δραστικά δικαρβονυλικά ενδιάμεσα, τα οποία είναι παρόμοια με αυτά που σχηματίζονται

κατά τις αντιδράσεις γλυκοξείδωσης, συμπεριλαμβανομένων της γλυοξάλης και της μεθυλογλυοξάλης, τα οποία είναι πρόδρομες ενώσεις των κυριότερων AGEs, όπως του CML, της CEL, των ιμιδαζολονών της αργινίνης και της αργιπιριμιδίνης. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι η οξειδωτική αποδόμηση των λιπιδίων και ιδιαίτερα, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου «κλέβουν» ηλεκτρόνια από τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, προκαλώντας κυτταρική βλάβη. Η αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, πιθανότατα επαγόμενη από την υπεργλυκαιμία και το οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τον αυξημένο σχηματισμό των τελικών προϊόντων προχωρημένης λιποοξείδωσης (Advanced Lipoxidation End-products, ALEs), μπορεί να είναι ο μηχανισμός που συνδέει τη δυσλιπιδαιμία με τις διαβητικές επιπλοκές (Januszewski et al, 2003).

Έχει βρεθεί, επίσης, ένα *in vitro* μονοπάτι σχηματισμού των AGEs μη εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ή τα λιπίδια αλλά από τα αμινοξέα. Αυτοί οι μηχανισμοί ενεργοποιούνται στα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα κύτταρα μέσω της δράσης του ενζύμου της μυελοπεροξειδάσης. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών σε καταστάσεις/εστίες φλεγμονής προκαλεί την επαγωγή της δράσης του ενζύμου, το οποίο συμμετέχει στην παραγωγή υποχλωρικού οξέος (HOCl) από H₂O₂ και χλώριο. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής σχετίζεται με την παραγωγή ενεργών αλδευδών από ελεύθερα αμινοξέα (οξείδωση αμινοξέων) καθώς και AGEs από πρωτεϊνικά μόρια, επί παρουσίας ελεύθερων αμινοξέων (Anderson & Heinecke, 2003). Η σύνθεση των AGEs από τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα ενισχύει την άποψη για στενή σχέση μεταξύ των διαδικασιών της φλεγμονής, των AGEs και πιθανόν των επιπλοκών του ΣΔ.

Η αντίδραση Maillard συνολικά αποτελείται από τρία κινητικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν α) τους στρεσογόνους παράγοντες ή ερεθίσματα (*stressors*), δηλαδή την πηγή των καρβονυλικών παραγόντων που οδηγούν την αντίδραση, β) τα μέσα διάδοσης (*propagators*), δηλαδή τους δραστικούς καρβονυλικούς παράγοντες που προέρχονται από τους *stressors* και γ) τα τελικά προϊόντα (*end-products*), που ολοκληρώνουν τη διαδικασία της μοριακής γήρανσης και είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης Maillard (Monnier, 2003) (Εικόνα 2.5).



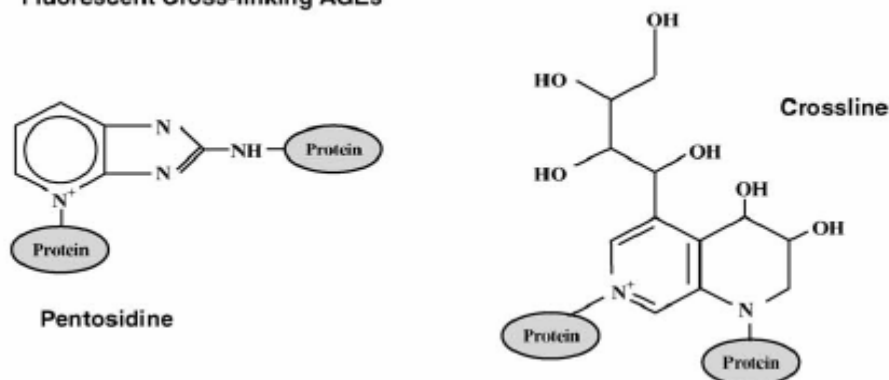
Εικόνα 2.5: Επιλεκτικά χημικά μονοπάτια και AGEs σχετιζόμενα με την αντίδραση Maillard *in vivo*.

2.3. Ταξινόμηση των τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης

Τα AGEs είναι μία ετερογενής ομάδα ουσιών και ανάλογα με τις πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχονται, διαθέτουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Μία χαρακτηριστική ιδιότητα, που έχουν ορισμένα AGEs, είναι η ικανότητα του φθορισμού, ενώ κάποια άλλα έχουν την ιδιότητα να προκαλούν διασύνδεση των πρωτεϊνών. Η διασύνδεση έχει την έννοια της δημιουργίας σταθερών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών, που είναι γνωστές ως διακλαδώσεις (cross-links). Με βάση λοιπόν την ιδιότητα του φθορισμού και την δημιουργία των διακλαδώσεων, τα AGEs ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

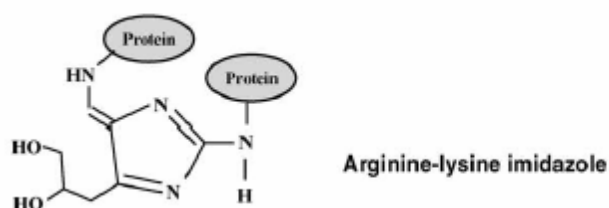
Τα φθορίζοντα διασυνδεδεμένα AGEs, όπως η πεντοσιδίνη και η crossline. Η πεντοσιδίνη σχηματίζεται μεταξύ των υπολειμμάτων αργινίνης και λυσίνης και τα επίπεδά της αυξάνονται στον ΣΔ. Η crossline ανακαλύφθηκε αρχικά στους νεφρούς διαβητικών αρουραίων και μπορεί να σχηματιστεί τόσο in vitro, όσο και in vivo.

(a) **Fluorescent Cross-linking AGEs**



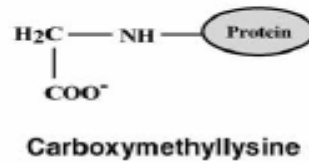
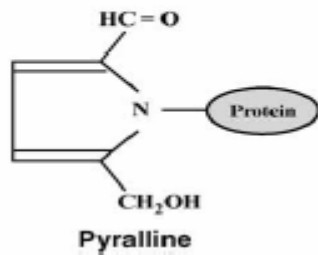
Τα μη φθορίζοντα διασυνδεδεμένα AGEs, όπως η ιμιδαζόλη της αργινίνης- λυσίνης (ALI). Το ALI, που έχει πρόσφατα απομονωθεί, είναι ένα ενδοκυττάριο μόριο.

(b) **Non-Fluorescent Cross-linking AGEs**



Τα μη διασυνδεδεμένα AGEs, όπως η πυραλίνη και η N-καρβοξυ-μεθυλο- λυσίνη (CML). Η CML σχηματίζεται από την οξειδωτική διάσπαση των προϊόντων Amadori και κατά την διάρκεια της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσία πρωτεϊνών. Είναι ένα από τα κυριότερα AGEs in vivo και τα επίπεδά του αυξάνονται στο κολλαγόνο του δέρματος των διαβητικών.

(c) **Non-Cross-linking AGEs**



Class	Characteristics	Subclass	Structures
Pre-melanoidins	Uncoloured	AGE-precursors	Glyoxal (GO)
	Non-fluorescent		Methylglyoxal (MGO)
	Non-cross-linking	AGEs	Pyrraline
Melanoidins			Carboxyethyllysine (CEL)
			Carboxymethyllysine (CML)
	Coloured (yellow to brown)	Fluorescent	Pentosidine
	Fluorescent or non-fluorescent		Crossline
	Cross-linking	Non-fluorescent	Glyoxal lysine dimer (GOLD)
			Methylglyoxal lysine dimer (MOLD)
			Alkyl formyl glycosyl pyrroles (AFGP)
		Arginine-lysine imidazole (ALI)	

Το χαρακτηριστικό φάσμα φθορισμού των AGEs στα 440 nm μετά από εκπομπή στα 370 nm έχει χρησιμοποιηθεί κλασικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των AGEs στους ιστούς. Με βιοχημικές και ανοσοχημικές μεθόδους μπορούν να μετρηθούν φθορίζοντα AGEs, όπως η πεντοσιδίνη και μη-φθορίζοντα AGEs, όπως η καρβοξυλομεθυλ-λυσίνη (CML). Η πολυπλοκότητα, το κόστος και η έλλειψη επαναληψιμότητας συνέβαλαν στον περιορισμό της ευρύτερης χρήσης αυτών των μεθόδων. Πρόσφατα, η διαδοχική φασματοσκοπία μάζας έχει διευκολύνει σημαντικά τη χρήση και έχει βελτιώσει την επαναληψιμότητα της μεθόδου για διάφορα AGEs (Meerwaldt et al, 2008).

2.4. Εξωγενείς πηγές

Εκτός των ενδογενών AGEs, τα προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης έχουν βρεθεί να απορροφώνται στον οργανισμό και από εξωγενείς πηγές, όπως ο καπνός του τσιγάρου και η διατροφή. Στην βιομηχανία των τροφίμων η θερμότητα χρησιμοποιείται ευρέως για τη βελτίωση της ασφάλειας, της βιοδιαθεσιμότητας και της γεύσης των τροφίμων. Ωστόσο, εκτός των ευεργετικών επιπτώσεων η θέρμανση τροφίμων μπορεί να προκαλέσει αποδόμηση πρωτεϊνών και άλλες καταβολικές αντιδράσεις (Faist & Erbersdobler, 2001). Η θέρμανση τροφίμων σε υψηλές θερμοκρασίες προάγει την αντίδραση Maillard, η οποία προσδίδει το επιθυμητό χρώμα, γεύση και άρωμα. Για παράδειγμα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στην παραγωγή καραμέλας, στο άρωμα του καφέ και στο ψήσιμο του ψωμιού. Κάποια από τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard προστίθενται για να συντηρηθούν προϊόντα όπως αναψυκτικά και χυμοί (O'Brien & Morrissey, 1989).

Σε έλεγχο 250 κοινών χρησιμοποιούμενων τροφίμων για την περιεκτικότητα τους σε AGEs βρέθηκε πως η ομάδα που υπερτερεί είναι αυτή των τροφίμων πλούσιων σε λιπαρά (τυριά, κρέμες, βούτυρα), σε ζωικά προϊόντα και σε επεξεργασμένα ψωμιά, γεύματα και δημητριακά. Επίσης, υψηλή περιεκτικότητα σε AGEs βρέθηκε στην ομάδα των κρεάτων και των υποκατάστατων αυτών. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση των AGEs εμπεριείχε η ομάδα των υδατανθράκων, φρέσκα φρούτα και ωμά λαχανικά. Σημαντικό ρόλο στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε AGEs θεωρείται πως παίζει ο τρόπος μαγειρέματος τους (θερμοκρασία και διάρκεια μαγειρέματος, ύπαρξη υγρασίας). Όσο μεγαλύτερη είναι η επεξεργασία που υφίστανται οι τροφές κατά την παρασκευή τους (βρασμός, ψήσιμο, τηγάνισμα), τόσο μεγαλύτερη και η περιεκτικότητά τους σε AGEs. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως το ψήσιμο στη σχάρα (225 °C) και το τηγάνισμα (177 °C) συνδέονται με συσσώρευση μεγάλων ποσών AGEs στις τροφές. Ακολουθεί το ψήσιμο στο φούρνο (177 °C) ενώ, η μικρότερη περιεκτικότητα σε AGEs εντοπίστηκε σε τρόφιμα που είχαν βραστεί (110 °C) (Goldberg et al, 2004).

Σημαντική επίσης είναι και η περιεκτικότητα των AGEs στον καπνό από το τσιγάρο (Forbes et al, 2005). Η επεξεργασία των φύλλων καπνού γίνεται σε

συνθήκες ευνοϊκές για το σχηματισμό προϊόντων γλυκοζυλίωσης και οξειδωτικών παραγώγων. Οι βλαβερές αυτές ουσίες απορροφώνται από τους πνεύμονες και σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες του ορρού, όπως οι λιποπρωτεΐνες.

Οι τροποποιημένες από AGEs πρωτεΐνες είναι ανθεκτικές στην πρωτεόλυση και η διατροφική τους αξία είναι χαμηλή εξαιτίας της ελαττωμένης απορρόφησής τους. Μόνο 10% των διατροφικών AGEs απορροφώνται από τα εντερικά κύτταρα και από αυτά 30% απεκκρίνονται από τους νεφρούς ενώ 70% εναποτίθεται στους ιστούς. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα AGEs που απορροφώνται στην κυκλοφορία διαθέτουν τις ίδιες προ-οξειδωτικές και προ-φλεγμονώδεις ιδιότητες με τα ενδογενώς συντιθέμενα AGEs (Cai et al, 2002) για το λόγο αυτό θεωρείται πως συσχετίζονται με την ανάπτυξη χρονίων φλεγμονωδών καταστάσεων σε κατά τα άλλα υγιή άτομα (Uribarri et al, 2005). Επίσης, έχει βρεθεί πως η υπέρμετρη εισαγωγή στη διατροφή θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων μπορεί να επιφέρει στον οργανισμό διαβητογόνα και νεφροτοξικά αποτελέσματα, ήπια φλεγμονώδη αντίδραση και επαγωγή της αθηροσκλήρωσης ενώ σε άτομα με νεφρική ανεπάρκεια, όπου η κάθαρση τους είναι διαταραγμένη, διαπιστώνεται αθροιστικά τοξική επίδραση των προσλαμβανόμενων AGEs (Sebekova & Somoza, 2007). Έτσι αν και η επίδραση των εξωγενών AGEs στον οργανισμό δεν έχει ακόμα απόλυτα διευκρινιστεί πλέον δίνονται κατευθυντήριες οδηγίες ώστε να μειώνεται η περιεκτικότητα της διατροφής σε AGEs και να προλαμβάνονται έτσι οι μακροχρόνιες βλαπτικές τους επιδράσεις (Uribarri et al, 2010).

2.5 Αμυντικοί μηχανισμοί κατά της γλυκοζυλίωσης και των AGEs

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης για τον περιορισμό της συσσώρευσης των AGEs (Negre-Salvayre et al, 2009):

1. Η χαμηλή ταχύτητα γλυκοζυλίωσης της γλυκόζης: Η χημική ιδιότητα της γλυκόζης, ως κύριου σακχάρου του μεταβολισμού των έμβιων όντων να είναι λιγότερο δραστική με τις αμίνες σε σύγκριση με τα άλλα σάκχαρα.

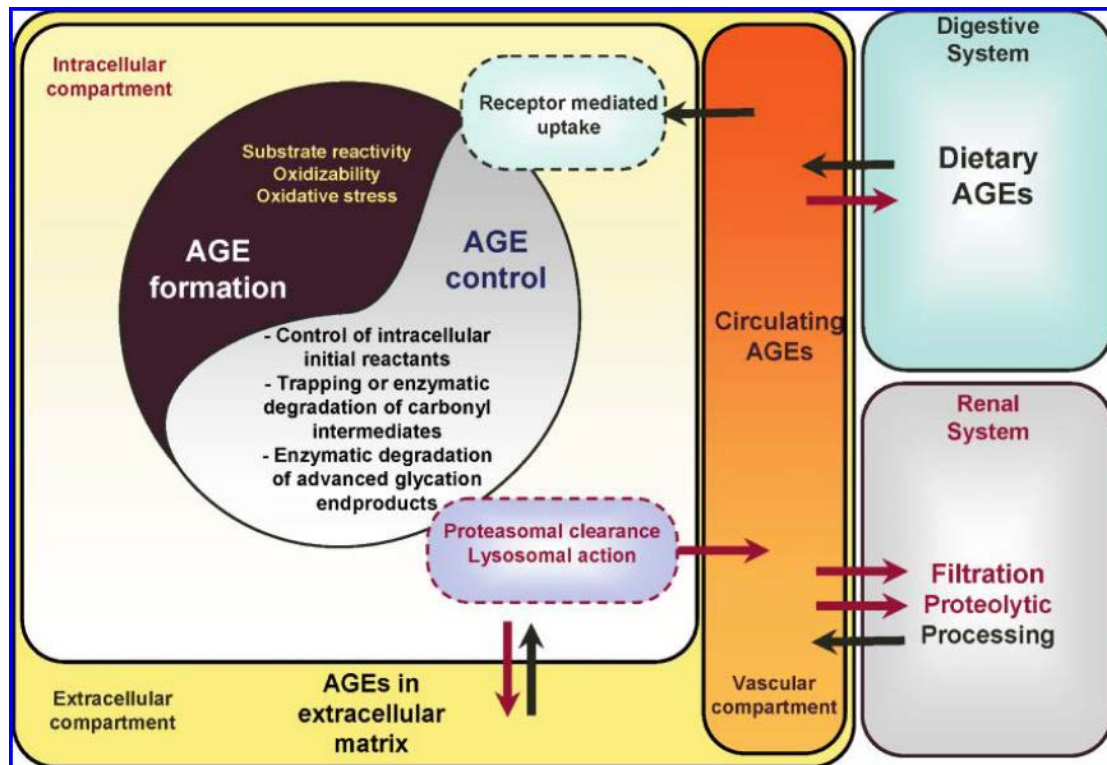
2. Ο “φραγμός” του εντέρου: Η πέψη περιορίζει την απορρόφηση των προερχόμενων από τη διατροφή AGEs, η οποία έχει υπολογιστεί σε 10-30% των περιλαμβανομένων στην διατροφή AGEs. Η βιοδιαθεσιμότητα των διατροφικών AGEs εξαρτάται συνεπώς από την απορρόφησή τους αλλά έστω και μικρά ποσά συνεισφέρουν στο καρβονυλικό stress στο πλαίσιο διαταραχών μειωμένης κάθαρσης.

3. Κυτταρικοί μηχανισμοί άμυνας:

- Χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες: Ανηγγμένη γλουταθειόνη, Carbon Monoxide, Χολερυθρίνη και αναγωγή της χολοπρασίνης, Ουρικό οξύ, Βιταμίνες
- Κυτταρικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί: Δισμουτάση του υπεροξειδίου, Καταλάση, Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης, Αναγωγή της Γλουταθειόνης και Οξυγενάση της αίμης, Θειορεδοξίνες
- Κυτταρικοί μηχανισμοί κατά της γλυκοζυλίωσης: Amadoriases, Σύστημα της γλυοξαλάσης
- Πρωτεολυτική αποδόμηση από το πρωτεάσωμα

4. Ρόλος του νεφρού και του ήπατος στην απομάκρυνση των AGEs. Τα κυκλοφορούντα στον ορό AGEs μπορούν να αποβληθούν είτε μέσω της νεφρικής ή της ηπατικής κάθαρσης. Στο νεφρό τα προϊόντα γλυκοζυλίωσης αμινοξέων και πρωτεϊνών διηθούνται από το σπείραμα. Τα αμινοξέα αποβάλλονται στα ούρα ενώ οι πρωτεΐνες μερικώς αποβάλλονται και μερικώς επαναρροφώνται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο. Τα πιο συχνά AGEs (CML and CEL) αποβάλλονται από το νεφρό. Η νεφρική ανεπάρκεια ωστόσο οδηγεί στη συσσώρευση AGEs, που είναι τοξικά για το νεφρό και προκαλούν ιστικές βλάβες.

Η πρόσληψη από το ήπαρ της τροποποιημένης από AGEs αλβουμίνης ορού διαμεσολαβείται από υποδοχείς κάθαρσης-scavenger, ενώ ο ηπατικός μεταβολισμός AGEs πρωτεϊνών ή αμινοξέων δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί



Εικόνα 2.6 Ο μεταβολισμός των AGEs και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ομοιοστάση τους και τη συγκέντρωσή τους στα διάφορα μέρη του οργανισμού (Negre-Salvayre et al, 2009)

2.6. Δράσεις των AGEs

A. Εξωκυττάρια δράσεις των AGEs

Τα AGEs επηρεάζουν τις φυσικοχημικές, λειτουργικές και δομικές ιδιότητες διαφόρων συστατικών της θεμέλιας ουσίας, όπως τα λιπίδια, το κολλαγόνο, η λαμίνη, η ελαστίνη και η βιτρονεκτίνη (Charonis et al, 1990; Hammes et al, 1996; Tanaka et al, 1988). Το κολλαγόνο, που είναι μία πρωτεΐνη με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής και αποτελεί βασικό συστατικό του αγγειακού τοιχώματος, συχνά υφίσταται μη ενζυμική γλυκοζυλίωση. Ο σχηματισμός των AGEs στο κολλαγόνο ευθύνεται για την δημιουργία των διασταυρούμενων διασυνδέσεων μεταξύ των ινιδίων του με συνεπακόλουθο την ελάττωση της ευενδοτότητας και την αύξηση της

αρτηριακής δυσκαμψίας. Η δομική διαταραχή της ΕΚΟ, ο πολλαπλασιασμός της μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα του (TGF)- β (transforming growth factor- β) και η συνοδός αντίσταση της στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων [παρεμπόδιση των φυσιολογικών διεργασιών της ιστικής αποκατάστασης (tissue remodeling)] οδηγεί σε ακαμψία αυτής και συνεπακόλουθη κυτταρική δυσλειτουργία (Kass et al, 2001). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός συνδέεται με την παθοφυσιολογία της αρτηριακής υπέρτασης και της διαστολικής καρδιακής ανεπάρκειας καθώς διαπιστώθηκε από μελέτες ότι η χορήγηση φαρμάκων που διασπούν τα cross-links (AGEs cross-links breakers) βελτιώνει την αρτηριακή ευενδοτότητα. Επίσης, επηρεάζεται η δομή και η λειτουργία της βασικής μεμβράνης των αγγείων, γεγονός που οδηγεί στη διαταραγμένη διαπερατότητά τους, αλλοίωση που παρατηρείται στο ΣΔ.

Όπως επίσης αναφέρθηκε, τα AGEs, εκτός από τα δομικά συστατικά της ΕΚΟ αλληλεπιδρούν και με τα λιπίδια. Η LDL χοληστερόλη αποτελεί υπόστρωμα για τη μη ενζυματική σύνδεση της γλυκόζης και το σχηματισμό των AGEs. Αποτελεί και πρόσφορο έδαφος για τη δράση ήδη σχηματισμένων AGEs σε αυτό (Bucala et al, 1994; Bucala et al, 1995) μέσω της αυξημένης οξειδωτικής τροποποίησης της LDL (oxLDL) που επάγει τον περαιτέρω σχηματισμό AGEs. Εξάλλου η γλυκοζυλιωμένη LDL είναι γνωστό ότι πυροδοτεί προ-φλεγμονώδη, προ-αποπτωτική και προ-θρομβωτική σηματοδότηση, παίζοντας ενεργό ρόλο στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Επίσης, η γλυκοζυλιωμένη LDL μειώνει τη σύνθεση του οξειδίου του αζώτου (NO) επηρεάζοντας τους φυσιολογικούς μηχανισμούς της αγγειοδιαστολής / αγγειοσύσπασης και επιβαρύνοντας περαιτέρω την αγγειακή δυσλειτουργία (Posch et al, 1999). Τέλος, παρατηρείται καταστολή της πρόσληψης και εκκαθάρισης της γλυκοζυλιωμένης LDL (σύμπλοκο AGE-LDL) από τον υποδοχέα της στα ενδοθηλιακά κύτταρα και παράταση της βλαπτικής της δράσης στις αθηρωματικές βλάβες των αγγείων (Gempel et al, 1993).

Έτσι, σε αντίθεση με την ταχεία άνοδο και πτώση των επιπέδων γλυκόζης, τα AGEs από τη στιγμή που σχηματίζονται μπορεί να ασκήσουν μακροπρόθεσμες επιδράσεις στα εξωκυττάρια μόρια μακράς διάρκειας ζωής με βλαβερές επιπτώσεις.

Παράλληλα δεδομένα υπάρχουν για τη δράση των AGEs στις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες (Forbes et al, 2005). Η γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης μέσω της αντίδρασης Maillard οδηγεί στο σχηματισμό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης A1c(HbA1c), η οποία συνιστά αξιόπιστο δείκτη για την παρακολούθηση του γλυκαιμικού ελέγχου. Η γλυκοζυλίωση της ινσουλίνης αδρανοποιεί τη δράση της. Η γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη πυροδοτεί ένα προφλεγμονώδες μονοπάτι σηματοδότησης οδηγώντας σε οξειδωτικό stress και ενεργοποίηση του NF-κΒ και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και πάχυνση της σπειραματικής μεμβράνης σε διαβητικούς ασθενείς. Η σπειραματοπάθεια στο ΣΔ βελτιώνεται από τη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης ενώ φαρμακευτική αναστολή της γλυκοζυλίωσης αναστέλλει την υπερέκφραση του VEGF και του TGF-β και την επακόλουθη σύνθεση φιβρονεκτίνης και κολλαγόνου τύπου IV, τα οποία εμπλέκονται στην αύξηση της ενδιάμεσης θεμέλιας ουσίας στην παθογένεια της διαβητικής νεφροπάθειας.

B. Ενδοκυττάριας δράσεις

Οι ενδοκυττάριας δράσεις των AGEs αναπτύσσονται είτε λόγω της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης ενδοκυττάρων μορίων (ενδοκυττάρια σύνθεση AGEs), ή έπειτα από τη σύνδεση κυκλοφορούντων AGEs με ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα και την ενεργοποίησή του.

Όσον αφορά στον ενδοκυττάρια σχηματισμό των AGEs, έχει συσχετισθεί με τη διαταραχή σε ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών οι οποίες είναι σημαντικές για την αγγειακή ομοιόσταση (Negre-Salvayre et al, 2009). Παράδειγμα αυτής της λειτουργίας των AGEs είναι η γλυκοζυλίωση του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor) η οποία οδηγεί σε σημαντική (70%) μείωση της μιτογόνου δραστηριότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ανάπτυξη αγγειακής δυσλειτουργίας. Ο ενδοκυττάριας σχηματισμός AGE επίσης μειώνει την έκφραση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS) μέσω αυξημένης αποδόμησης του eNOS mRNA. Τα AGEs ανταγωνίζονται επίσης το NO και

οδηγούν έτσι σε άμεση απενεργοποίηση του. Η μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου eNOS και η απενεργοποίηση του NO από τα AGEs παίζει σημαντικό ρόλο στη διαταραχή των αγγειοδιασταλτικών μηχανισμών στα πλαίσια του ΣΔ (Soro-Raavonen et al., 2010). Τα AGEs επίσης αναστέλλουν την αντι-πολλαπλασιαστική δράση του NO στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, συνεισφέροντας περαιτέρω στην αθηροσκλήρωση. Οι επαγόμενες από το MGO, μια μορφή AGE τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων, παρατηρούνται παράλληλα με την αύξηση της [παραγωγής δραστικών ριζών O₂ από αυτά στο νεφρό διαβητικών επίμυων. Επιπρόσθετα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης υφίστανται τη δράση του MGO στη δομή τους συμβάλλοντας στο οξειδωτικό stress (Wu and Juurlink 2002). Άλλα σημαντικά ένζυμα όπως η GAPDH, τροποποιούνται από το MGO, οδηγώντας σε αναστολή της δραστηριότητάς του. Επίσης το MGO προκαλεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων και κυτταρικές λειτουργίες. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η βλαπτική δράση του MGO σε μείζονες πρωτεΐνες του πρωτεασώματος διαταράσσει τη λειτουργία του. Επίσης η υπερέκφραση της γλυοξαλάσης (glyoxalase) -1 σε διαβητικούς επίμυες με διαταραχή της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής μεσολαβείται από τα αυξημένα επίπεδα MGO στα πλαίσια ενός μονοπατιού που εξαρτάται από το οξειδωτικό stress (Brouwers et al. 2010)

Γ. Μεσολαβούμενες από υποδοχείς

Τα κυκλοφορούντα AGEs μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και να προκαλέσουν ενδοκυττάρια βλάβες. Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά πρωτεϊνικά μόρια με ιδιότητες υποδοχέα των AGEs. Οι λειτουργίες που επάγονται από την ενεργοποίηση κάθε υποδοχέα διαφέρουν, δεδομένου ότι ορισμένοι υποδοχείς συμβάλλουν στη βλαπτική δράση των AGEs (φλεγμονώδης απάντηση, κυτταρική δυσλειτουργία) ενώ κάποιοι άλλοι συνεισφέρουν στην απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία και την μείωση της

προ-οξειδωτικής τους δράσης (Negre-Salvayre et al, 2009; Singh et al, 2001). Οι υποδοχείς των AGEs περιλαμβάνουν τους εξής:

- **AGER1 ή ολιγοσακχαρυλική τρανσφεράση-48 (OST-48):** Θεωρείται αρνητικός ρυθμιστής του οξειδωτικού stress που επάγουν τα AGEs καθώς και των φλεγμονωδών διεργασιών που εκλύονται από αυτά. Η υπερέκφραση του υποδοχέα σε μεσαγγειακά νεφρικά κύτταρα φάνηκε να ενισχύει τη σύνδεση και αποδόμηση των AGEs ενώ, συνοδεύτηκε με αναστολή στην ενεργοποίηση του RAGE και επιβράδυνση στην ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας. Το γεγονός επίσης ότι, σε διαβητικούς ασθενείς με εγκατεστημένες επιπλοκές έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση του AGE-R1 στα μονοκύτταρα του περιφερικού τους αίματος και αυξημένα επίπεδα AGEs στον ορό, ενισχύει την άποψη για τον προστατευτικό ρόλο που διαδραματίζει ο AGE-R1 έναντι των βλαπτικών ιδιοτήτων των AGEs.
- **AGE-R2 (AGE receptor-2) ή 80K-H ή PRKCSH:** Αποτελεί πρωτεΐνη υπόστρωμα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)[167] και συνδέει το μεταγωγικό μονοπάτι του FGFR3 (fibroblast growth factor receptor-3) με αυτό των MAP κινασών (Ras/MAPK μονοπάτι). Πιστεύεται πως σχετίζεται με τη μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα RAGE, συνεπώς και με τις φλεγμονώδεις δράσεις των AGEs.
- **AGE-R3 (AGE receptor-3) ή γαλεκτίνη-3:** Αποτελεί υποδοχέα με πολλαπλές λειτουργίες όπως ρύθμιση της προσκόλλησης των κυττάρων, του κυτταρικού κύκλου καθώς και της λειτουργίας του ματίσματος του mRNA. Στα μακροφάγα, τα αστροκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τα AGEs ενώ δεν εκφράζεται ιδιαίτερα στους ιστού-στόχους των διαβητικών επιπλοκών όπως το μεσάγγειο και το ενδοθήλιο. Η έκφραση του υποδοχέα όμως αυξάνεται σε αυτούς τους ιστούς κατά τη γήρανση και σε διαβητικό περιβάλλον. Αρχικά, αυτή η υπερέκφραση του AGE-R3 στο νεφρικό ιστό θεωρήθηκε πως ενισχύει την ιστική αναδιάρθρωση που ευθύνεται για την ανάπτυξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Επίσης, παρατηρώντας την εμφάνιση εντονότερων ιστικών αλλοιώσεων σε διαβητικό περιβάλλον σε AGE-R3 (-) ποντίκια σε σχέση με τα φυσιολογικά εδραιώθηκε η άποψη της προστατευτικής δράσης του υποδοχέα έναντι της AGE-επαγώμενης ιστικής βλάβης.

- **Υποδοχείς κάθαρσης (Scavenger receptor)**
 - υποδοχείς-κάθαρσης των μακροφάγων τύπου I και τύπου II (macrophage scavenger receptors type I and type II, MSR)
 - λυσοζύμη, λακτοφερρίνη
 - CD-36 (Cluster of Differentiation 36)
 - LOX-1(Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1)
 - FEEL-1(fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1) & FEEL-2

- **RAGE (Receptor for AGEs)**, ο καλύτερα μελετημένος υποδοχέας των AGEs. Σχετίζεται με την ανάπτυξη των προ-φλεγμονωδών και προ-οξειδωτικών δράσεων των AGE.

2.7 Υποδοχέας RAGE

2.7.1 Δομή του RAGE

Ο RAGE ανακαλύφθηκε και κλωνοποιήθηκε το 1992 και αρχικά θεωρήθηκε ότι λειτουργεί ως ένας υποδοχέας εκκαθαριστής (scavenger), συμβάλλοντας στην απομάκρυνση-κάθαρση των AGEs από τον οργανισμό. Σύντομα η αρχική αυτή αντίληψη εγκαταλείφθηκε και την θέση της πήρε η άποψη ότι ο RAGE είναι ένας υποδοχέας μετάδοσης σήματος, μέσω διαφόρων οδών (Yan et al, 2008).

Ο RAGE είναι ένας κυτταρικός υποδοχέας επιφανείας και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Το γονίδιο του RAGE εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια τάξης I και III του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Διαθέτει εξωκυττάριο τμήμα, αποτελούμενο από μία μεταβλητή (V-type) και από δύο σταθερές περιοχές (C-type), διαμεμβρανική περιοχή και ενδοκυττάρια κυτταροπλασματική ουρά. Η V και C1 δομές δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους και μάλιστα αποτελούν μια ενιαία δομική μονάδα. Αντίθετα, η C2 είναι πλήρως ανεξάρτητη δομή και συνδέεται με τη V-C1

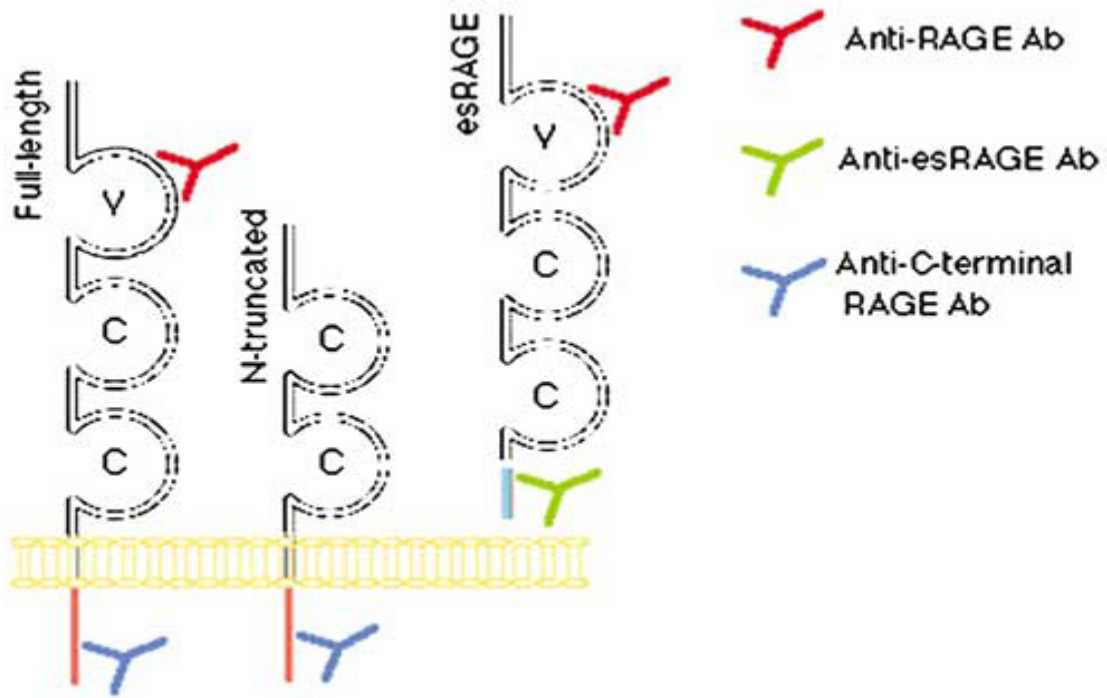
μέσω ενός εύκαμπτου συνδέτη. Η μεταβλητή περιοχή χρησιμεύει για την σύνδεση του υποδοχέα με τα διάφορα μόρια, κυρίως όμως με τα AGEs, ενώ οι σταθερές περιοχές συμβάλλουν στην σταθεροποίηση της μεταβλητής περιοχής.

Οι υποδοχείς RAGE εντοπίζονται σε διάφορα κύτταρα, όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στις λείες μυϊκές ίνες, στα λεμφοκύτταρα, στα μονοκύτταρα / μακροφάγα, στους ινοβλάστες, στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού και στους νευρώνες. Εξάιρεση αποτελεί ο πνεύμονας, στον οποίο ο RAGE εμφανίζει σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με άλλους ιστούς. Η έκφραση του υποδοχέα αυξάνεται σε καταστάσεις που σχετίζονται με τις διαδικασίες της φλεγμονής όπως οι αγγειακές νόσοι, ο καρκίνος, η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Εξάλλου σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στον ΣΔ, λόγω της επίμονης υπεργλυκαιμίας συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες τα AGEs, γεγονός που προκαλεί υπερέκφραση του RAGE. Εκτός από την αυξημένη έκφραση παρατηρείται και μια ρύθμιση του υποδοχέα προς τα πάνω (upregulation) (Ramasamy et al, 2012).

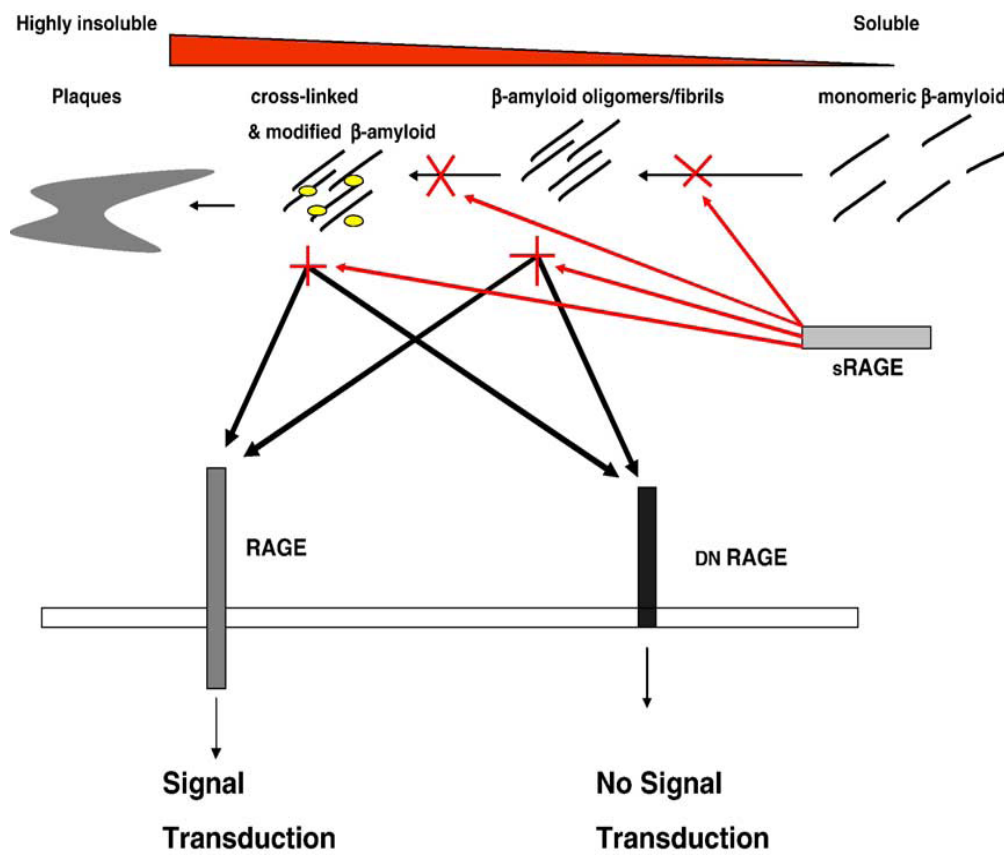
2.7.2 Ισομορφές του RAGE

Σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν διάφορες ισομορφές του RAGE, που προκύπτουν από το διαφορετικό μάτισμα (splicing) του mRNA του RAGE. Τρεις είναι οι κύριες ισομορφές: η πλήρους μήκους (full-length) RAGE, η κυρίαρχη αρνητική (dominant negative, DN-RAGE) και η εκκριτική διαλυτή (secretory-soluble RAGE, sRAGE). Υπάρχουν ωστόσο και άλλες ισομορφές λιγότερο μελετημένες. Οι τρεις κύριες ισομορφές του RAGE διαθέτουν όλες τη μία μεταβλητή και δύο σταθερές περιοχές, που περιγράψαμε ενώ διαφέρουν ως προς την διαμεμβρανική περιοχή και την ενδοκυττάρια κυτταροπλασματική ουρά (Bierhaus et al, 2005).

Στις εικόνες 2.7 και 2.8 απεικονίζονται οι ισομορφές του RAGE καθώς και η κατασταλτική επίδραση των δύο κύριων ισομορφών (sRAGE, DN-RAGE) στην μετάδοση του σήματος μέσω του full-length RAGE.



Εικόνα 2.7. Ισομορφές του RAGE



Εικόνα 2.8. Αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών κύριων ισομορφών του RAGE. Ο sRAGE και DNRAGE παγιδεύοντας τις ουσίες που ενεργοποιούν τον RAGE (στην συγκεκριμένη περίπτωση το β αμυλοειδές) καταστέλλουν την μετάδοση του σήματος.

Οι διαλυτές μορφές του RAGE μπορούν να προκύψουν είτε από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου RAGE (esRAGE) ή από ενζυμικό κόψιμο του εξωκυτταρίου τμήματος του υποδοχέα (sRAGE). Ο όρος sRAGE (soluble RAGE) χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό όλων των υδατοδιαλυτών μορφών του RAGE (προερχόμενων από εναλλακτικό μάτισμα & από ενζυμικό κόψιμο πλήρους υποδοχέα).

Το sRAGE, στο σύνολο του (esRAGE + sRAGE), μετά την έκκριση του στο εξωκυττάριο περιβάλλον, συνδέεται με τους προσδέτες του RAGE και τους απομακρύνει από την κυκλοφορία μέσω αποδόμησης τους στο σπλήνα και το ήπαρ. Η ίδια λειτουργία επιτελείται και όσον αφορά τα κυκλοφορούντα AGEs. Συγκεκριμένα, το sRAGE οδηγώντας τα AGEs προς αποδόμηση, εμποδίζει την ενεργοποίηση και την επαγωγή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης τόσο του RAGE όσο και των λοιπών μεμβρανικών υποδοχέων των AGEs, αποτρέποντας την ανάπτυξη κυτταρικής δυσλειτουργίας (Vazzana et al, 2009). Έχει βρεθεί πως τα επίπεδα του sRAGE σχετίζονται με τα επίπεδα των κυκλοφορούντων AGEs (Nakamura et al, 2007) και πως αποτελούν έμμεσο δείκτη (αντιστρόφως ανάλογο) της ενεργότητας και της παθογένειας του RAGE (Santilli et al, 2009). Επίσης, μειωμένα επίπεδα του sRAGE έχουν συσχετισθεί με πρώιμη και εντονότερη εμφάνιση των επιπλοκών του διαβήτη ενώ, χορήγηση sRAGE σε πειραματικά μοντέλα έχει δείξει επιβράδυνση έως και αναστολή της εμφάνισης των διαβητικών επιπλοκών (Santilli et al, 2009; Yan et al, 2010). Βάσει των ανωτέρων δεδομένων, οι διαλυτές μορφές του RAGE, λειτουργώντας ανταγωνιστικά ως προς τη βλαπτική δράση του υποδοχέα, αποτελούν πιθανόν μελλοντικό θεραπευτικό όπλο έναντι των διαβητικών επιπλοκών (Yan et al, 2010).

2.7.3. Ο πολυσυνδεδετικός υποδοχέας RAGE

Ο RAGE έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τάξεις μορίων και όχι μεμονωμένους προσδέτες εξαιτίας της ιδιομορφίας της V-C1 δομής του. Συγκεκριμένα, η V-C1 δομή λόγω της ευκαμψίας της σε σχέση με τη C2-δομή, έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με διαφορετικά μόρια στα οποία αναγνωρίζει μόνο την τριτοταγή και όχι την πρωτοταγή δομή. Συνεπώς, υπάρχει πλήθος προσδετών που συνδέονται στον RAGE και η αλληλεπίδραση τους με αυτόν σχετίζεται με ποικίλες κλινικές οντότητες (Bierhaus et al, 2005).

Εκτός από τα AGEs, συνδέεται με πεπτίδια β-αμυλοειδούς, που συσσωρεύονται στη νόσο Alzheimer και το αμυλοειδές-α, το οποίο συναθροίζεται στη συστηματική αμυλοείδωση. Επιπρόσθετα, συνδέτες του RAGE είναι οι S100/καλγκρανουλίνες, μια οικογένεια στενά σχετιζόμενων και συνδεόμενων με Ca^{2+} πολυπεπτιδίων, που συσσωρεύονται εξωκυττάρια σε περιοχές χρόνιας φλεγμονής. Ένας άλλος φλεγμονώδης συνδέτης του RAGE είναι η DNA-συνδεόμενη πρωτεΐνη HMGB1 (high mobility group box-1) ή αμφοτερίνη, η οποία απελευθερώνεται από κύτταρα που υφίστανται νέκρωση. Εκτός από τους συνδέτες αυτούς που συμμετέχουν ενεργά στη φλεγμονή και σε ανοσολογικές αντιδράσεις, ο RAGE επίσης αλληλεπιδρά με επιφανειακά μόρια στα βακτήρια και τα λευκοκύτταρα (Negre-Salvayre et al, 2009).

Από αυτούς τους ξεχωριστούς συνδέτες του RAGE, ο πρώτος που αναγνωρίστηκε ήταν τα AGEs. Βάσει των διαθέσιμων ενδείξεων, είναι πιθανό ότι τα AGEs και ειδικά πεπτίδια AGEs συνδέονται με τον RAGE μέσω της περιοχής V τύπου. Επιπρόσθετα με τα AGEs, τα προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (AOPPs: advanced oxidation protein products) επίσης συνδέονται με τον RAGE και πυροδοτούν την μεταγωγή σήματος. Οι συγκεκριμένες περιοχές στις οποίες συνδέονται στο εξωκυττάριο τμήμα του RAGE μένει ακόμα να διευκρινιστούν (Yan et al, 2010).

Το αμυλοειδές συνδεόμενο με τον υποδοχέα RAGE επάγει οξειδωτικό stress, φλεγμονή και την αμυλοείδωση. Στο πάγκρεας το νησιδιακό αμυλοειδές (islet

amyloid polypeptide (IAPP)) ενοχοποιείται για τη βαθμιαία καταστροφή των β κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη και τη δυσλειτουργία τους. Είναι σημαντικό ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί γλυκοζυλίωση του tau και του αμυλοειδούς β, η οποία και επάγει σημαντικά τη συσσώρευσή του. Συμμετέχει έτσι ο υποδοχέας RAGE στην παθοφυσιολογία χρόνιων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, ιδιαίτερα της νόσου Alzheimer ενισχύοντας τη νευροτοξική δράση του αμυλοειδούς στη μικρογλοία, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τους νευρώνες.

Οι S100/calgranulins είναι μία οικογένεια αποτελούμενη από περίπου είκοσι ομόλογες πρωτεΐνες, που συνδέονται με το ασβέστιο, και απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και τα μονοπύρρηνα μακροφάγα. Τα μέλη αυτής της οικογένειας συγκεντρώνονται στον εξωκυττάριο χώρο σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής. Ο RAGE συνδέεται με διάφορα μέλη της οικογένειας, όπως με την S100A12, την S100B, την S100A1, την S100A4 και την S100P. Η αλληλεπίδραση του RAGE με τις S100/calgranulins καταλήγει στην κυτταρική ενεργοποίηση και δυσλειτουργία του αγγειακού τοιχώματος.

Μία άλλη κατηγορία μορίων που αλληλεπιδρούν με τον RAGE είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (High mobility group protein-1, HMGP-1). Πρόκειται για μια ομάδα πρωτεϊνών του πυρήνα που διευκολύνουν την μεταγραφή των γονιδίων, σταθεροποιώντας τον σχηματισμό του νουκλεοσώματος. Εκτός από πυρηνικές πρωτεΐνες, φαίνεται να συμμετέχουν στην κυτταρική μετανάστευση, την διήθηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η συγκεκριμένη δράση πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσής της με τον RAGE και αναστέλλεται από την εξωκυττάρια διαλυτή μορφή του RAGE. Επίσης ο άξονας HMGP-RAGE συμμετέχει και στην ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων.

Η σύνδεση των προσδετών στο RAGE δεν οδηγεί σε κάθαρση ή αποδόμηση τους αλλά σε ενεργοποίηση ενός πλήθους ενδοκυττάρων διεργασιών οι οποίες πυροδοτούνται μέσω της ενδοκυττάριας ουράς του υποδοχέα και καταλήγουν στην παραγωγή προ-οξειδωτικών και προ-φλεγμονωδών παραγόντων.

Πιο αναλυτικά, η ενεργοποίηση του υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση μορίων που ανήκουν σε διαφορετικά μεταγωγικά μονοπάτια μεταξύ των οποίων είναι το μονοπάτι των MAP κινασών [mitogen activated protein kinases (MAPK)] και τα μόρια (ERK)-1/2 (extracellular regulated kinase), p38 και c-Jun N-terminal kinase (JNK), Jak/STATs, phosphoinositol 3-kinase (PI3K) καθώς και το μονοπάτι της Rho GTPase και τα μόρια Cdc42 και Rac-1. Επιπλέον όμως, η ενεργοποίηση του RAGE επάγει το σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) μέσω της ενεργοποίησης της NAD(P)H οξειδάσης και άλλων ενδοκυττάρων πηγών ROS, όπως η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τελικό αποτέλεσμα της κινητοποίησης αυτών των μεταγωγικών μορίων/μονοπατιών είναι η ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κB (nuclear growth factor-κB), και η μεταβολή στην έκφραση πλήθους γονιδίων. Ο NF-κB εμπλέκεται στην έκφραση των γονιδίων για την ενδοθηλίνη-1, τον ιστικό παράγοντα (Tissue Factor TF), τη θρομβομοδουλίνη, τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1α (IL-1α), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου-α (Tumor Necrosis Factor-α TNF-α) καθώς και των μορίων προσκόλλησης όπως το ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης -1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1 VCAM-1) και το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1 ICAM-1) (Lin et al, 2009; Riehl et al, 2009).

Συμπερασματικά ο RAGE είναι ένας πολυσυνδεδεικτός υποδοχέας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων.

2.7.4 Μετάδοση του σήματος μέσω ενεργοποίησης του RAGE από τα AGEs

Η σύνδεση του RAGE με τα AGEs σηματοδοτεί το σημείο έναρξης ενός καταρράκτη αντιδράσεων μέσω διαφόρων οδών με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης. Δύο είναι τα κομβικά σημεία στις αντιδράσεις μετάδοσης του σήματος μέσω του RAGE: η αύξηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού stress (OS)

καθώς και η ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Ott et al, 2014).

Η αλληλεπίδραση του RAGE με τα AGEs καταστέλλει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού μέσω της οξειδάσης του NADPH, με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρου οξειδωτικού stress. Σε φυσιολογικές συνθήκες ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή μορφή του συνδεδεμένος με το ανασταλτικό μόριο IκBa. Μετά την ενεργοποίηση του RAGE ο IκBa φωσφορυλιώνεται, αποδεσμεύεται από τον NF-κB και προκαλεί την μετάθεσή του στον πυρήνα. Στην συνέχεια ο NF-κB επάγει την μετάφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, του RAGE καθώς και την de novo σύνθεση του ενεργοποιημένου NF-κB (NF-κBp65). Δημιουργείται επομένως ένας φαύλος κύκλος κατά τον οποίο ο RAGE ενεργοποιεί τον NF-κB, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του RAGE και όλη η διαδικασία καταλήγει στην προς τα πάνω ρύθμιση του υποδοχέα (up regulation).

Η αλληλεπίδραση του RAGE με τα AGEs ενισχύει τη δραστικότητα της NADPH-οξειδάσης οδηγώντας σε ενεργοποίηση του NF-κB, η οποία ακολουθείται από αυξημένη έκφραση της iNOS συνθετάσης και αυξημένη παραγωγή ONOO⁻. Η διασύνδεση των AGE με το φορτίο νιτρικών ενώσεων (nitrosative stress) κυρίως οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών O₂ και τοξικών παραγώγων του NO και το μειωμένο αντιοξειδωτικό δυναμικό των κυττάρων. Η ανισορροπία που προκύπτει μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της επαγόμενης από τις δραστικές ρίζες O₂ σύνθεση AGE επάγει την περαιτέρω παραγωγή ελευθέρων ριζών O₂ και νιτρωδών, όπως το peroxynitrite, με συνέπεια ένα φαύλο κύκλο nitrosative stress και περαιτέρω πρωτεϊνικής βλάβης.

Ο NF-κB τροποποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες, που σχετίζονται με τη φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση, όπως την ενδοθηλίνη-1, τον VEGF, τον TGF β, τον ιστικό παράγοντα (tissue factor), διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες, κυρίως IL- 1α, IL-6 και TNF-α. Υπάρχει επίσης αυξημένη έκφραση προσκολλητικών μορίων, όπως αγγειακού κυτταρικού προσκολλητικού μορίου (Vascular Cell Adhesion Molecule: VCAM-1), διακυτταρικού προσκολλητικού μορίου (Intercellular adhesion molecule: ICAM-1, εξωκυττάρων πρωτεϊνών, όπως

λαμινίνης και κολλαγόνου τύπου IV, επιπρόσθετα με άλλες επιδράσεις, όπως αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα ή αγγειογένεση (Schmidt et al, 1999). Εξάλλου ρόλος της αλληλεπίδρασης των AGEs με το RAGE στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες στα πλαίσια διαβητικής νεφροπάθειας και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, στην επαγωγή παραγωγής διαφόρων προθρομβωτικών μορίων, στην απόπτωση διαφορετικών τύπων κυττάρων και στην επαγωγή μηχανισμών τόσο εγγενών όσο και προσαρμοστικών ανοσιακών μηχανισμών.

Λίγα είναι γνωστά για τα άμεσα σηματοδοτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά τη δέσμευση των AGEs στον RAGE και την ενεργοποίηση του NF-κΒ αλλά φαίνεται να περιλαμβάνουν την κινάση p21ras, την ERK½ (p44- p42), την p38 και SAPK-JNK, τις rho GTPases, τη src, την PI-3 κινάση και το μονοπάτι JAK/STAT. Πιθανός ρόλος των Toll-like receptor (TLR) έχει υποτεθεί λόγω της αλληλεπίδρασης του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (interleukin 1 -receptor cytosolic domain - TIR) των TLRs με την κυτταροπλασματική ουρά του RAGE, που ακολουθείται από ολιγομερισμό με τις ενδοκυττάρια προσδετικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν TIR. Οι αντιδράσεις αυτές πυροδοτούν το σχηματισμό του IKK σώματος μετάδοσης μηνύματος και την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Ωστόσο άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του RAGE και μορίων μεσολαβητών σηματοδοτικών μονοπατιών με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ δεν αποκλείεται (Negre-Salvayre et al, 2009).

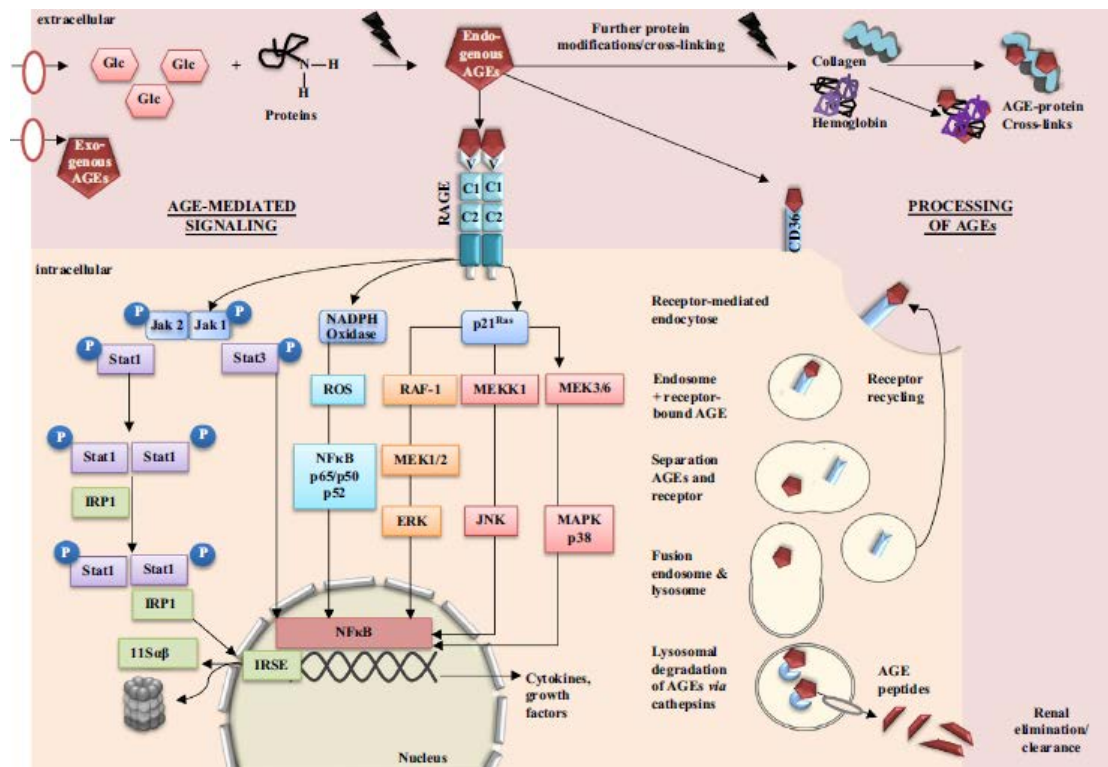
Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO και η ενεργοποίηση του NF-κΒ προάγει μια φλεγμονώδη διεργασία στο ενδοθήλιο, η οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση σελεκτινών, όπως τα μόρια προσκολλησεως VCAM-1 και ICAM-1 και την επακόλουθη προσκόλληση λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων και παραγωγή του MCP-1. Εξάλλου η σύνδεση των AGE στον RAGE οδηγεί στο σχηματισμό ενδοθηλίνης -1.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι υπόλοιποι υποδοχείς που αλληλεπιδρούν με τα AGE μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την έκφραση και τη λειτουργία του RAGE. Ο AGER1 εξουδετερώνει τη σηματοδότηση από την ενεργοποίηση του RAGE

προκαλώντας την ελάττωση του οξειδωτικού στρες. Βρέθηκε ότι η χορήγηση AGEs ή CML στην κυτταρική σειρά HEK293 αύξησε τη φωσφορυλίωση της Akt περίπου τρεις φορές με έναν εξαρτώμενο από το οξειδωτικό στρες τρόπο. Η καταστολή του p66shc έδειξε ότι οι επαγόμενες από τα AGEs επιδράσεις απαιτούν τη φωσφορυλίωση της σερίνης-36 (Ser-36) των p66shc. Οι προ-οξειδωτικές αυτές αποκρίσεις κατεστάλησαν σε κύτταρα που υπερέκφραζαν τον AGER1 και επανεμφανίστηκαν όταν η έκφραση του AGER1 ελαττώθηκε από μικρά παρεμβατικά μόρια RNA.

Παρότι οι υποδοχείς AGE-R1 και AGE-R3/galectin3 έχουν την ικανότητα να ελαττώνουν την μεσολαβούμενη από AGEs παραγωγή ROS και την προκύπτουσα ενεργοποίηση του RAGE, η έκφραση τους και η λειτουργία τους μειώνεται με τη γήρανση και σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress. Έχει δειχθεί ότι η συσσώρευση AGE/ALE και η μειωμένη δραστηριότητα του AGE-R3/galectin3 προκάλεσε διαταραχή της αγγειακής αβεστοποίησης που προκύπτει ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης AGE-RAGE. Εκτός της αναστολής της έκφρασης του AGE-R1, τα επίπεδα της εξαρτώμενης από NAD⁺ deacetylase και του survival factor 1(SIRT1) ήταν επίσης ελαττωμένα σε αυξημένο οξειδωτικό stress. Ο SIRT1 είναι υπεύθυνος για την μεταγωγή φλεγμονωδών σημάτων και την αποτελεσματική σηματοδότηση που πυροδοτείται από την ινσουλίνη. Αύξηση των δραστικών ROS που προκύπτει από τη σύνδεση AGE-RAGE, μπορεί να προκαλέσει ελάττωση του AGE-R1 και του SIRT1, με αποτέλεσμα προφλεγμονώδη σηματοδότηση και διαταραχή του μονοπατιού της ινσουλίνης. Αυξημένη πρόσληψη AGE συνεπώς προάγει το σχηματισμό δραστικών ριζών ROS, η οποία ακολουθείται από ελάττωση της έκφρασης και λειτουργίας των AGE-R1,AGE-R3/galectin3 και SIRT1,που πιθανόν εμπλέκονται στην παθογένεια χρόνιων νοσημάτων (Vlassara et al, 2009).

Όπως γίνεται αντιληπτό, η πυροδότηση των φλεγμονωδών μηχανισμών (παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών και έκφραση προσκολλητικών μορίων) που διαμεσολαβούνται από την αλληλεπίδραση AGE-RAGE περιλαμβάνει ποικίλα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, (p21ras, MAP-κινασών, PI3K, cdc42/rac, JAK/STAT, της NAD(P)H οξειδάσης) τα οποία τελικά συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του NF-κB (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση AGE-RAGE.

2.8 Σχέση AGEs με οξειδωτικό stress

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αμφίπλευρη σχέση των AGEs με το οξειδωτικό stress και την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου. Σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού stress, αυξάνεται η παραγωγή AGEs in vivo και διευκολύνεται η διασύνδεση τους με ιστικές πρωτεΐνες (Noi & King, 2007). Σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, το οξειδωτικό stress επάγεται από την περίσσεια προοξειδωτικών ουσιών και την επακόλουθη οξείδωση των υποστρωμάτων όπως τα σάκχαρα, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν αυτοοξείδωση της γλυκόζης και ελάττωση τόσο της συγκέντρωσης όσο και της δραστηριότητας αρκετών ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η γλουταθειόνη και η καταλάση. Σε διαβητικούς επίμυες βρέθηκε ότι ο καλός γλυκαιμικός έλεγχος μειώνει την άθροιση AGEs στο κολλαγόνο των αγγείων, ενώ η χορήγηση ισχυρών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως το υδροξυτολουένιο μείωσαν τη

συγκέντρωση των AGEs σε νεφρικά κύτταρα ποντικών (Ha et al, 2008). Από την άλλη, τα AGEs προάγουν άμεσα την παραγωγή ROS, τόσο μέσω μείωσης της συγκέντρωσης και δραστικότητας αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η γλουταθειόνη και η καταλάση, όσο και με απευθείας αύξηση της έκλυσης ριζών υπεροξειδίου, μετά από αυτό-οξείδωση των AGEs στα μονοπύρρηνα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Li et al, 2007). Μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών σε επίμυες στους οποίους δόθηκε ενδοφλέβια AGE-αλβουμίνη μείωσε το προκαλούμενο οξειδωτικό stress και την έκφραση του NF-κB στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Baynes, 1991). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ο σχηματισμός AGEs από τα προϊόντα Amadori απαιτεί την παρουσία μοριακού O₂, καταλύεται από μεταβατικά μέταλλα και ιόντα και αναστέλλεται από αναγωγικές ουσίες, υποδεικνύοντας την άμεση συμβολή του σχηματισμού AGE στη δημιουργία δραστικών ριζών O₂.

Η σύνδεση των AGEs με τον RAGE των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγει τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που οδηγούν στην ενεργοποίηση του συστήματος NADPH-οξειδάσης. Στη συνέχεια οι ROS διεγείρουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος αποτελεί πλειοτροπικό ρυθμιστή πολλών γονιδίων που ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις κυτταρικής βλάβης και συμμετέχουν στη διαδικασία φλεγμονής και απόπτωσης (Wolff, 1993). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα γονίδια του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α, TNF-β), της ιντερλευκίνης 1,6 και 8, της ιντερφερόνης-γ και πολλών μορίων προσκόλλησης των κυττάρων. Η ενεργοποίηση των ανωτέρω μορίων οδηγεί στην επαγωγή και άλλων ενδοκυττάρων βιοχημικών οδών, όπως της MAP κινάσης, του JaK/STAT και του ογκογονιδίου p21ras.

Εκτός των ROS, η επίδραση των ελεύθερων νιτρικών ριζών active nitrogen species (RNS) έχει μελετηθεί (Ott et al, 2014), οι οποίες προκύπτουν από την επίδραση των ROS, οι οποίες παράγονται από τη δράση της NADPH οξειδάσης στο NO, που σχηματίζεται από την NO συνθετάση. Ενώ η δραστικότητα της iNOS ρυθμίζεται από κυτταροκίνες, η ενεργότητα της NADPH-οξειδάσης επάγεται από την αλληλεπίδραση των AGEs με τον υποδοχέα RAGE. Η αύξηση του NO και του O₂ οδηγεί στο σχηματισμό περοξυνιτρίτη (ONOO⁻), που συμμετέχει στο σχηματισμό

νιτρωδών και οξειδωτικών προϊόντων και οδηγεί στην απενεργοποίηση λειτουργικών πρωτεϊνών. Η αύξηση των ROS όπως προαναφέρθηκε επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ, που με τη σειρά του οδηγεί σε υπερέκφραση της iNOS και περαιτέρω επαγωγή nitrosative stress και αύξηση της παραγωγής peroxy-nitrite. Επιπλέον οι Nagai κ συν. (Nagai et al, 2007) έδειξαν ότι οι RNS συμμετέχουν στη δημιουργία AGEs. Μία διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της επαγόμενης από τις ROS δημιουργίας AGEs προάγει περαιτέρω το σχηματισμό ROS και RNS, όπως το peroxy-nitrite και οδηγεί σε ένα φαύλο κύκλο nitrosative stress και περαιτέρω πρωτεϊνικής βλάβης.

Όσον αφορά συγκεκριμένα τη Methylglyoxal, τροποποιημένες από την επίδρασή της πρωτεΐνες έχουν επίσης συσχετιστεί με το σχηματισμό ROS. Μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη από την MG δημιουργία δραστικών ριζών έχει σα συνέπεια απόπτωση εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων (stem cells) (Hsu et al, 2005). Η χορήγηση MG σε καλλιέργειες οστεοβλαστών αύξησε τον κατακερματισμό του DNA και τον ενδοκυττάριο σχηματισμό ROS παράλληλα με την παρατηρούμενη σημαντική ελάττωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού (Chan et al, 2007). Η έκθεση των μυοκυττάρων σε προερχόμενα από τη methylglyoxal AGEs (MG-AGE) οδήγησε σε σημαντική ενεργοποίηση της ERK 1/2 και p38 MAPK, και συνεπώς πιστεύεται ότι η επαγόμενη από τα AGEs παραγωγή ROS και η επακόλουθη απόπτωση πιθανόν συσχετίζονται με ενεργοποίηση του καταρράκτη των MAP κινασών (Li et al, 2007).

2.9 AGEs και απόπτωση

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα AGEs επάγουν απόπτωση παραμένει υπό διερεύνηση. Βάσει πειραματικών δεδομένων, τα AGEs οδηγούν σε απόπτωση μέσω είτε άμεσης ενεργοποίησης της λειτουργικότητας των κασπασών ή εμμέσως, μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες και της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων/πρωτεϊνών (κυτοκινών) που ρυθμίζουν την απόπτωση. Έχει παρατηρηθεί ότι τα AGEs επάγουν απόπτωση των μεσαγγειακών κυττάρων (mesangial cells)

μέσω αυξημένης έκφρασης και συσσώρευσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, p53 και Bax. Επίσης επάγουν απόπτωση πνευμονικών επιθηλιακών κυττάρων μέσω Bax και ενεργοποιημένης caspase-3 ενώ επιδρούν στον συνδετικό ιστό και στα οστά διαβητικών προάγοντας την απόπτωση κυττάρων σχηματισμού της θεμέλιας ουσίας (Alikhani et al, 2007a; Franke et al, 2009; Wang et al, 2009). Πειράματα in vivo, έδειξαν ότι τα AGEs προωθούν την απόπτωση σε ινοβλάστες δέρματος επίμυων, η οποία μεσολαβείται μέσω του υποδοχέα RAGE και εξαρτάται από την ενεργοποίηση των caspase-3, -8, -9, ενώ in vitro μελέτες έδειξαν ότι τα AGEs έχουν μια πιο σφαιρική επιρροή στην απόπτωση με το να ενισχύουν τα επίπεδα του mRNA προ-αποπτωτικών γονιδίων, περιλαμβάνοντας διάφορες κατηγορίες μορίων όπως προσδέτες, υποδοχείς, προσαρμοστικά μόρια, μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κ.α. (Alikhani et al, 2005).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα AGEs ενεργοποιούν τον NF-κB, ο οποίος είναι αντι-αποπτωτικός στα περισσότερα κύτταρα. Επομένως τα AGEs και άλλα προ-αποπτωτικά μόρια, όπως ο TNF διεγείρουν τόσο αντι- όσο και προ-αποπτωτικούς παράγοντες και το καθαρό αποτέλεσμα αντανακλά την ολική ισορροπία μεταξύ τους. Αυτή η ισορροπία μπορεί να επηρεάζεται από μέλη των μεταγραφικών παραγόντων forkhead transcription factors, όπως ο winged-helix-forkhead box class O1 (FOXO1) μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος γενικά επάγει την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων και αποτελεί ένα μηχανισμό υπερπήδησης της αντι-αποπτωτικής δράσης του NF-κB (Alikhani et al, 2007b).

2.10 AGEs και αναπαραγωγικό σύστημα Θηλέων

Ο ωοθηκικός ιστός, μεταξύ άλλων, αποτελεί στόχο εναπόθεσης και συσσώρευσης τόσο των ενδογενώς όσο και των εξωγενώς παραγόμενων AGEs (Merhi, 2014). Τα δεδομένα αυτά αποτέλεσαν την αφορμή για τη διερεύνηση της παρουσίας και του ρόλου των AGE και του υποδοχέα τους RAGE στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρρένων, όπου τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι πιο περιορισμένα.

Συγκεκριμένα σε ότι αφορά την επίδραση εξωγενών AGEs στον ωθητικό ιστό, απεδείχθη η άμεση εναπόθεση των γλυκοτοξινών AGEs και του υποδοχέα τους RAGE στα στρώματα της ωθητικής θήλεων επιμύων όταν χορηγήθηκε τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs για 6 μήνες, σε αντίθεση με ομάδα επιμύων που έλαβε τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε AGEs (Diamanti-Kandarakis et al, 2007a). Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης, ινσουλίνης και τεστοστερόνης στον ορό των επιμύων που έλαβαν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs γεγονός που επιβεβαιώνει την επίδραση των τοξικών αυτών μορίων στο αναπαραγωγικό και μεταβολικό προφίλ των πειραματόζων.

Μελέτη της ομάδας μας παρουσίασε για πρώτη φορά τον εντοπισμό των AGEs, του RAGE καθώς και του NF-κB σε ανθρώπινο φυσιολογικό και πολυκυστικό ωθητικό ιστό (Diamanti-Kandarakis et al, 2007b) και αποτέλεσε την απαρχή της διερεύνησης του ρόλου των AGEs στο αναπαραγωγικό σύστημα και τα συνέδεσε με την παθοφυσιολογία του Σύνδρομου Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια διαφορετική ποιοτική κατανομή των AGE, RAGE και του ενεργοποιημένου NF-κB σε γυναίκες με ΣΠΩ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, ενώ εντοπισμός των AGE και RAGE υπήρξε ισχυρότερος στη στιβάδα των κοκκιοκυττάρων των ΣΠΩ ωοθηκών (Diamanti-Kandarakis et al, 2007b). Ήδη βέβαια και πάλι από την ομάδα μας, είχαν εντοπιστεί αυξημένα επίπεδα AGEs στον ορό αδύνατων, νορμογλυκαιμικών γυναικών με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ) (Diamanti-Kandarakis et al, 2005). Η θετική συσχέτιση των επιπέδων AGEs στον ορό με την τεστοστερόνη (Diamanti-Kandarakis et al, 2010) και την anti-mullerian ορμόνη (Diamanti-Kandarakis et al, 2009) σε γυναίκες με ΣΠΩ σε συνδυασμό με την *in vitro* και *in vivo* ανίχνευση AGEs στον πολυκυστικό ωθητικό ιστό υπογραμμίζει περαιτέρω τη συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου.

Όσον αφορά τα λειτουργικά αποτελέσματα της αυξημένης εναπόθεσης AGE στις ωθήκες, η ενεργοποίηση της οξειδάσης της λυσίνης (lysyl-oxidase) συνεπάγεται εναπόθεση περίσσειας κολλαγόνου (Parachroni et al, 2010). Επίσης η αυξημένη συγκέντρωση AGE οδηγεί σε καταστολή του ενζύμου γλυοξαλάση-I (glyoxalase-I) που βοηθά στην κάθαρση των AGE, δημιουργώντας έναν κύκλο

αυτοανάδρασης. Σε μία κυτταρική σειρά ανθρώπινων κοκκιωδών κυττάρων ωοθήκης [human granulosa cell line model (KGN)], τα AGEs αλληλεπιδρούν με την LH και οδηγούν σε χρόνια ενεργοποίηση του συμπλόκου ERK1/2 *in vitro*, που συνδέεται με διαταραχή της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Περαιτέρω μελέτη σε κυτταρικές σειρές κυττάρων θήκης ωοθήκης υποδεικνύουν το ρόλο των AGE στη μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, η οποία και επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Merhi, 2014).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν πως το οξειδωτικό φορτίο που επάγει η παρατεταμένη συσσώρευση και εναπόθεση τόσο των ενδογενών όσο και των εξωγενών AGEs, καθώς και η επίδρασή τους στους μηχανισμούς σηματοδότησης και ενεργοποίησης παραγόντων φλεγμονής, είτε λόγω της διαδικασίας γήρανσης ή στα πλαίσια άλλων παθολογικών καταστάσεων μπορεί να διαταράσσει τους διαθέσιμους ενεργειακούς μηχανισμούς και κατ' επέκταση την αναπαραγωγική λειτουργία και ικανότητα του συστήματος (Tatone & Amicarelli, 2013).

2.11 AGEs και RAGE στο ουροποιογεννητικό σύστημα αρρένων

1. Ουροδόχος κύστη

Τα πρώτα έμμεσα στοιχεία για την εναπόθεση AGEs στην ουροδόχο κύστη προέρχονται από τα πειράματα του Eika κ συν. (Eika et al, 1992), οι οποίοι παρουσίασαν αυξημένο ανοσοφθορισμό του ιστού που προέρχεται από επίμυες διαβητικούς σαν αποτέλεσμα της επίδρασης της στρεπτοζοτοκίνης. Επίσης ιστός ουροδόχου κύστεως από διαβητικά ζώα ήταν πιο ανθεκτικός στην ενζυματική πρωτεόλυση του κολλαγόνου του, υποδεικνύοντας αυξημένες διασταυρούμενες συνδέσεις (cross-linking) του κολλαγόνου ως συνέπεια της αυξημένης γλυκοζυλίωσης.

Στο ίδιο πειραματικό μοντέλο του επαγόμενου από το χημειοθεραπευτικό στρεπτοζοτοκίνη σακχαρώδη διαβήτη ο Daneshgari και συν. (Firouz Daneshgari,

2004), ανίχνευσαν ποικίλες μορφές AGEs στον εξωστήρα μυ της κύστης, τα οποία ήταν αυξημένα σε διαβητικά ζώα. 5 με 6 φορές σημαντικότερη αύξηση της τροποποίησης αδιάλυτων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τις διαλυτές παρατηρήθηκε, αποδεικνύοντας ότι η γλυκοζυλίωση πρωτίστως επηρεάζει δομικές πρωτεΐνες μακράς διάρκειας ζωής. Παρουσιάζει ενδιαφέρον ωστόσο η παρατήρηση ότι η συγκέντρωση καρβοξυμεθυλισίνης (CEL), που αποτελεί δείκτη των επιπέδων μεθυλογλυοξάλης (methylglyoxal) ήταν υψηλότερη στα διαλυτά κλάσματα σε σχέση με τα αδιάλυτα, απεικονίζοντας υψηλότερες ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις μεθυλογλυοξάλης. Επεκτείνοντας τις παρατηρήσεις τους στο πειραματικό μοντέλο των θήλεων επίμυων με διαβήτη (ως συνέπεια της στρεπτοζοτοκίνης) και ακράτεια από προσπάθεια που προκαλείται από κάκωση του αιδοϊκού νεύρου, αυξημένα επίπεδα φουροσίνης (furosine) και καρβοξυμεθυλισίνης (CML) στην κύστη, την ουρήθρα και τον κόλπο καταγράφηκαν σε σύγκριση με φυσιολογικούς επίμυες ή ζώα στα οποία προκλήθηκε διούρηση με τη χορήγηση 5% σουκρόζης αντί νερού (Hui Q. Pan, 2007).

Σε ανθρώπους, AGEs ανιχνεύθηκαν στο συνδετικό ιστό της κύστης μεταξύ των μυϊκών ινών και νευρικών απολήξεων σε τμήματα φυσιολογικού ιστού ασθενών που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή (Matsumoto et al, 2009; Matsumoto K. , 2002). Αποτέλεσμα της εναπόθεσης στο στρώμα του κυστικού τοιχώματος είναι η δημιουργία ομοιοπολικών διασυνδέσεων στις πρωτεΐνες της ΕΘΟ, που τροποποιούν τις μηχανικές ιδιότητες της κύστης, αυξάνοντας την ακαμψία, και μειώνοντας τη διατασιμότητα του εξωστήρα, επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργικότητα (Furber, 2006). Όταν οι ιστοί μελετήθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι των μακροφάγων, CML ανοσοδραστικά κύτταρα παρουσίασαν διασταυρούμενη αντίδραση με το συγκεκριμένο αντίσωμα. Υποτέθηκε από τους συγγραφείς ότι τα AGEs φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και ακολούθως είτε αλληλεπιδρώντας με υποδοχείς ή αλλοιώνοντας ενδοκυττάριας πρωτεΐνες προκαλώντας κυτταρική δυσλειτουργία, ασκούν τις βλαπτικές τους δράσεις (Matsumoto et al, 2009).

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των AGEs στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς της κύστης σε ένα *in vitro* μοντέλο, ινοβλάστες που απομονώθηκαν

από ουροδόχο κύστη επίμυων καλλιεργήθηκαν (Chang IH, 2001). Η AGE-BSA με δοσοεξαρτώμενο τρόπο επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διατήρηση των κυττάρων. Η έκφραση του mRNA του υποδοχέα RAGE ανιχνεύθηκε στις καλλιέργειες των ινοβλαστών. Τα επίπεδα έκφρασης προκολλαγόνου τύπου I και TGF-β2 mRNA αυξήθηκαν από την υψηλή συγκέντρωση AGEs στο καλλιεργητικό μέσο, ενώ τα επίπεδα TGF-β3 mRNA levels μειώθηκαν. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στην ανάδειξη του ρόλου των AGEs στην αναδιαμόρφωση της κύστης (remodelling) λόγω τροποποίησης των δομικών σχέσεων μεταξύ των τριών κύριων συστατικών της με την επικράτηση του άκαμπτου συνδετικού ιστού.

Ο πιθανός ρόλος των AGEs στο νευρικό έλεγχο της ουροδόχου κύστεως προκύπτει έμμεσα από δεδομένα για τη συμμετοχή τους στην παθογένεση της διαβητικής νευροπάθειας (Sugimoto et al, 2008; Wada & Yagihashi, 2005). Ο σχηματισμός και η συσσώρευση των προϊόντων γλυκοζυλίωσης που παρατηρείται στα περιφερικά νεύρα έχει τοξική επίδραση, αλλάζοντας τη σύσταση και τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε ατροφία των νευραξόνων και αποδόμησή τους και διαταραχή της μεταγωγής του δυναμικού κατά μήκος τους καθώς επίσης και ελαττωμένη αναγέννησή τους είτε με άμεση επίδραση στα κυτταρικά συστατικά ή με διασύνδεση με τους υποδοχείς. Εναπόθεση AGEs έχει δείξει στο αιδοϊκό νεύρο διαβητικών θήλεων πειραματόζων, που παρουσίαζαν ακράτεια stress μετά την πειραματικά προκαλούμενη βλάβη του νεύρου. Η καταστροφή των νευρικών κυττάρων του αυτονόμου συστήματος από τις δράσεις των AGEs ή η δυσλειτουργία τους έχει θεωρηθεί ότι συνεισφέρει στην νευρογενή διαταραχή της λειτουργίας της ουροδόχου.

2. Προστάτης

Αρχικές μελέτες που κατέγραψαν την παρουσία και το ρόλο του υποδοχέα RAGE στην λειτουργία του προστάτη οδήγησαν σε περαιτέρω προσπάθειες αξιολόγησης της αλληλεπίδρασης με πληθώρα συνδετών συμπεριλαμβανομένων

των AGEs, που συνδέονται με τον υποδοχέα και συμβάλλουν στην ανάπτυξη, την ομοιοστασία, τη φλεγμονή και την καρκινογένεση.

Σε μία συστηματική ανάλυση της έκφρασης της διαλυτής ισομορφής του υποδοχέα, sRAGE, σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς και όργανα με τεχνική ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarray technique) (Cheng et al, 2005), υπερπυρηνική στικτή κοκκιώδης χρώση στην πλευρά του προστατικού επιθηλιακού κυττάρου που επενδύει τον αυλό των αδενίων. Η συγκεκριμένη ανοσοεντόπιση στα αδενικά επιθηλιακά κύτταρα αντικατοπτρίζει τη συμμετοχή του sRAGE στην εξωκρινή λειτουργία του προστάτη. Διάχυτη και έντονη χρώση παρατηρήθηκε στο αδενικό έκκριμα του προστάτη. Η ανοσοδραστικότητα ενός αντισώματος εναντίον του τμήματος V του υποδοχέα ήταν παρόμοια της κατανομής του sRAGE, σε αντίθεση με την ιδιαίτερα περιορισμένη και ασθενή χρώση ενός αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού ενδοκυττάρου άκρου της πρωτεΐνης-υποδοχέα. Η ανακολουθία των δεδομένων οδήγησε τους συγγραφείς να υποθέσουν ότι η ισομορφή sRAGE λόγω του μακρού χρόνου ημιζωής είναι ευκολότερο να ανιχνευθεί σε σύγκριση με τις άλλες ισομορφές.

Είναι ενδιαφέρον ότι ποσοτική real-time PCR κατέγραψε έκφραση RAGE mRNA τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε προστατικό ιστό ανθρώπων με ΚΥΠ ή καρκίνο σε παρασκευάσματα ριζικής προστατεκτομής (Ishiguro et al, 2005). Σε μια κυτταρική σειρά ορμονοανεξάρτητων προστατικών κυττάρων, η DU145, σε προστατικό καρκίνο πριν τη λήψη θεραπείας και σε κύτταρα ορμονοάντοχου καρκίνου η έκφραση RAGE mRNA ήταν υψηλότερη σε σύγκριση φυσιολογικές προστατικές κυτταρικές σειρές ή φυσιολογικό προστατικό ιστό. Ωστόσο το παθολογοανατομικό grade ή το κλινικό στάδιο του καρκίνου δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του mRNA του υποδοχέα.

Η ανοσοιστοχημική εντόπιση της έκφρασης του RAGE στον καρκίνο προστάτη στον άνθρωπο κατέγραψε αυξημένη έκφραση σε μεταστατικό καρκίνο σε σύγκριση με μη μεταστατικό (Kuniyasu et al, 2003). Τα κύτταρα του προστατικού στρώματος δεν παρουσιάζουν καμία ανοσοαντίδραση. Σε μια άλλη μελέτη (Hermani et al, 2005), έντονη χρώση RAGE σε καρκινικό προστατικό ιστό που διηθεί το

στρώμα ή εγγύς του συνδετικού ιστού της κάψας του προστάτη καθώς επίσης και σε καρκινικές βλάβες που περιβάλλουν τις νευρικές ίνες. Ο υποδοχέας ανιχνεύεται στο αδενοκαρκίνωμα διαφορετικών σταδίων με ασθενή τάση αυξημένης έκφρασης σε υψηλού grade καρκίνους.

Αν και οι προηγούμενες μελέτες καταγράφουν την παρουσία του RAGE στον καρκίνο του προστάτη και τη συσχέτισή του με την εξέλιξη της νόσου, ο ρόλος των AGEs στην ενεργοποίηση του υποδοχέα στον προστάτη είναι εν πολλοίς αδιευκρίνιστος. Οι Ishiguro και συν. (Ishiguro et al, 2005) έδειξαν ότι ο πολλαπλασιασμός και η βιωσιμότητα κυττάρων της σειράς DU145, τα οποία παρουσιάζουν την υψηλότερη έκφραση RAGE mRNA μεταξύ 3 κυτταρικών σειρών προστατικού καρκίνου, ενισχύθηκαν σημαντικά από την ενεργοποίηση από AGE-BSA στο καλλιεργητικό υλικό. Σε σύγκριση με τη BSA, η AGE-BSA είχε σαν συνέπεια ισχυρότερη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, όπως αυτή αξιολογήθηκε από *in vitro* δοκιμασίες διήθησης και από την υψηλότερη έκφραση του mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας MMP-1 and MMP-9 mRNA καθώς και την ισχυρότερη ενεργοποίηση του συμπλέγματος p44/p42 MAPκινάσων. Επιπλέον παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση κυτταροκινών οι PDGFβ and EGF, οι οποίες διαδραματίζουν ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους συγγραφείς να υποθέσουν ότι η αλληλεπίδραση των AGEs με τον υποδοχέα RAGE συμβάλλει στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη, είτε άμεσα ευνοώντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ή έμμεσα μέσω ενεργοποίησης έκκρισης κυτταροκινών ή αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με πιο επιθετικούς φαινότυπους ή αυξημένη διηθητική ικανότητα. Η αυξημένη παραγωγή RAGE που προκύπτει από την δράση των ανωτέρω μορίων – διαμεσολαβητών και η επακόλουθη αλληλεπίδραση με τα AGEs, τροφοδοτεί ένα κύκλο θετικής ανάδρασης σημαντικό στη βιολογία του καρκίνου.

Πιο πρόσφατα οι Allmen και συν. (Allmen et al, 2008) παρατήρησαν ότι τόσο ορμονοάντοχα και διηθητικά καρκινικά προστατικά κύτταρα όσο και μη διηθητικά ορμονοευαίσθητα κύτταρα αλληλεπιδρούν ισχυρά με τον διαλυτό υποδοχέα sRAGE. Η περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι το τμήμα V της πρωτεΐνης του υποδοχέα RAGE

είναι αυτό που αντιδρά με τις τροποποιημένες από τα AGEs πρωτεΐνες στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Ο διαλυτός υποδοχέας RAGE ήταν ικανός να αναστείλει την προσκόλληση των προστατικών καρκινικών κυττάρων με τον υποδοχέα RAGE, αναδεικνύοντας την πιθανή του θεραπευτική χρησιμότητα στην καταστολή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται από τη σύνδεση AGE-RAGE.

3. Όρχεις

Η ανίχνευση των AGEs στους όρχεις τόσο πειραματόζων όσο και ανθρώπων έγινε είτε με ανοσοϊστοχημεία ή με χημικές μεθόδους. Ανοσοαντίδραση για τέσσερα μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικές μορφές AGE αναγνωρίστηκε στα σπερματικά κύτταρα και τα κύτταρα Leydig επίμυων (Ling et al, 1998). Αυξημένη εναπόθεση AGE στα κύτταρα Leydig του διαμέσου ιστού σε διαβητικούς αρουραίους σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ίδιας ηλικίας παρατηρήθηκε καθώς και μείωση του συνολικού αριθμού τους. Η μείωση αυτή του πληθυσμού των στεροειδογόνων κυττάρων των όρχεων, των οποίων ο ρόλος στην υπογονιμότητα στα πλαίσια ΣΔ είναι γνωστός, αποδόθηκε από τους συγγραφείς στην τοξική δράση των AGEs. Παρομοίως σε πειραματόζωα με νεφρική ανεπάρκεια και ουραιμία, οι οποίες ευνοούν το σχηματισμό AGE, η μέτρηση του 5-HMF στους όρχεις κατέγραψε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Koksal et al, 2003) συσχετιζόμενα θετικά με την έκφραση της iNOS συνθετάσης, η οποία κυρίως εντοπίζεται στα κύτταρα Leydig. Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο διάλυμα της περιτοναϊκής πλύσης φαίνεται να αυξάνει την εναπόθεση των AGE στους όρχεις. Επιπρόσθετα η εξωγενής χορήγηση τεστοστερόνης σε ενήλικους αρσενικούς επίμυες προκάλεσε ελάττωσε την αντιοξειδωτική άμυνα οδηγώντας σε αύξηση των AGE στον όρχι.

Σε ανθρώπους, η ανοσοϊστοχημική εντόπιση του CML, μιας από τις κυρίαρχες μορφές AGE και του υποδοχέα the RAGE περιγράφηκε από τον Mallidis κ συν. σε βιοψίες όρχεως από νορμογοναδοτροφικούς άνδρες, που διερευνούνταν

για αζωοσπερμία (Mallidis et al, 2007; Mallidis et al, 2008). Σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς του σπερματικού επιθηλίου, διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση τόσο για τα AGEs όσο και για τον υποδοχέα RAGE παρατηρήθηκε. Σημαντική διαφορά στην ένταση της χρώσης για τα AGE σε διατομές των σπερματικών σωληναρίων κοντά στη βασική μεμβράνη ή απώτερα, με πιο έντονη χρώση στα πρώιμα στάδια σπερματογένεσης και έλλειψη ανοσοδραστικότητας στον αυλό των σωληναρίων. Παρά την εντόπιση του RAGE στα περισωληναριακά κύτταρα και τους άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς του διαμέσου ιστού, δεν αναγνωρίστηκε δραστικότητα για τη CML. Κοκκιώδης χρώση στον πυρήνα των γεννητικών κυττάρων που υποδηλώνει εναπόθεση CML εντός του πυρήνα σημειώθηκε ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έντασης της χρώσης σε πιο ώριμες μορφές σπερματοκυττάρων και απουσιάζει από τις επιμηκυσμένες σπερματίδες. Αντίθετα ανοσοδραστικότητα για τον υποδοχέα RAGE σημειώθηκε μόνο στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων των τροφοφόρων αγγείων. Επίσης κοντά στη βασική μεμβράνη των σπερματικών σωληναρίων σε άτομα με έντονη κυτταροπλασματική χρώση RAGE, ασθενής εντόπιση στον πυρήνα μικρού αριθμού σπερματογονίων σημειώθηκε.

Σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση γονιδίων, που είτε έμμεσα ρυθμίζονται από το σύστημα AGE/RAGE ή συμμετέχουν στην προστασία από τη γλυκοζυλίωση παρατηρήθηκε στον όρχι σε διαβητικά πειραματόζωα (O'Neill et al, 2010). Η εντόπιση της CML στον όρχι ποντικών οι οποίοι εκδήλωσαν ΣΔ σαν αποτέλεσμα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης (streptozotocin), ένα κοινά χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο ΣΔ διέφερε σημαντικά από αυτή μη διαβητικών ή των ποντικών *Ins2Akita mice*, που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ομοιότητα προς τα ευρήματα από τις μελέτες σε ανθρώπους. Επιπλέον η παρατηρούμενη ίδια ένταση στη χρώση πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας για το ΣΔ στα ποντίκια μετά την έκθεση σε στρεπτοζοτοκίνης, καθώς και η απουσία κατακερματισμού του πυρηνικού DNA υποδηλώνει ότι το μικροπεριβάλλον στον όρχι δεν είναι πλούσιο σε AGE όπως στον άνθρωπο ενώ δεν σημειώνεται περαιτέρω επιδείνωση με την επέλευση του ΣΔ, η οποία και μεταφράζεται σε διαταραγμένη

σπερματογένεση. Ωστόσο έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η επίδραση της στρεπτοζοτοκίνης είναι διαφορετική στον αρουραίο από τον ποντικό.

Ενδιαφέρον είναι ότι περαιτέρω μελέτες της ίδιας ομάδας σε κονίκλους που εκδήλωσαν μεταβολικό σύνδρομο σαν αποτέλεσμα διατροφής πλούσιας σε λιπαρά, επέτρεψε την ανίχνευση AGE και RAGE στους όρχεις (Mallidis et al, 2011). Η πιο ήπια συστηματική διαταραχή που δημιουργείται στα πειραματόζωα σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στο ΣΔ, είναι πιθανότατα υπεύθυνη για την περιορισμένη παρουσία τους σε σύγκριση με τα προαναφερθέντα πειράματα ΣΔ και κατ' επέκταση την απουσία διαταραχής του σπερματικού DNA. Την υπόθεση αυτή επιβεβαιώνει άλλη πειραματική μελέτη σε αρουραίους, οι οποίοι τράφηκαν με υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά τροφή για 10 εβδομάδες και παρά το αυξημένο οξειδωτικό stress που παρουσίασαν και τα μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης, αυτά δεν ήταν αρκετά ώστε να προκαλέσουν αξιοσημείωτη διαταραχή της σπερματογένεσης (Erdemir et al, 2012). Παρότι λοιπόν χρήσιμα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από πειραματικές μελέτες όπως αυτές, η αδυναμία εκδήλωσης όλου του εύρους πολύπλοκων διαταραχών που παρατηρούνται στον άνθρωπο σαν αποτέλεσμα της παχυσαρκίας στα πλαίσια του ΜΣ καθιστά δύσκολη την ανεύρεση ζωικών προτύπων για την μελέτη των επιπλοκών τους στο αναπαραγωγικό σύστημα.

4. Επιδιδυμίδα

Σε τομές απαγωγών σωληναρίων / κεφαλής επιδιδυμίδας σε άνδρες με φυσιολογική σπερματογένεση, συσσώρευση AGEs και έκφραση RAGE αναγνωρίστηκε (Mallidis et al, 2007; Mallidis et al, 2008). Στα επιθηλιακά κύτταρα η πιο έντονη CML χρώση παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα που περιβάλλει τον πυρήνα των βασικών κυττάρων, στον πυρήνα των υψηλών κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων και στην κορυφαία κυτταροπλασματική επιφάνεια τους που επενδύει τον αυλό των πόρων. Η ενδοκυττάρια εντόπιση RAGE ακολουθεί την κατανομή του CML με ισχυρή χρώση στα κυλινδρικά κύτταρα πέριξ του αυλού των

πόρων και ασθενέστερη χρώση κοντά στη βασική μεμβράνη. Οι μυϊκές ίνες που περιβάλλουν τα σωληνάκια ήταν εντόνως θετικές τόσο για τα AGEs όσο και για το RAGE με πυρηνική εντόπιση για το RAGE αλλά όχι για το CML μυοειδών κυρίως κυττάρων αλλά πιθανός και των ινοβλαστών. Ο πυκνός συνδετικός ιστός του τοιχώματος της επιδιδυμίδας δεν παρουσίασε καμία ανοσοδραστικότητα AGEs ή RAGE.

Στα ζωικά πρότυπα ΣΔ (O'Neill et al, 2010) τα πειράματα έδειξαν ισχυρή ανοσοδραστικότητα CML στην πλευρά του κυτταροπλάσματος των κυλινδρικών κυττάρων εγγύς του αυλού των πόρων της επιδιδυμίδας σε μη διαβητικά και Ins 2Akita ποντίκια με διακύμανση της χρώσης κοντά στη βασική μεμβράνη ή τους πυρήνες ενώ έντονη χρώση παρατηρήθηκε στο μυϊκό τοίχωμα του οργάνου. Αντίθετα έντονη αντίδραση παρουσιάστηκε στο σύνολο των STZ διαβητικών ποντικών πέριξ του αυλού με ασθενή χρώση στο υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Δεν παρατηρήθηκε αντίδραση για το αντίσωμα έναντι του RAGE πέραν περιορισμένου αριθμού ζώων με ΣΔ, ενώ διάχυτη χρώση στο περιεχόμενο του αυλού σημειώθηκε. Στους κονίκλους με ΜΣ (Mallidis et al, 2011) διάχυτη χρώση AGE στο διάμεσο ιστό της επιδιδυμίδας με κύρια εντόπιση στα μυοειδή κύτταρα καταγράφηκε. Έντονη αντίδραση για τη CML ανιχνεύθηκε στους πυρήνες των κυλινδρικών κυττάρων, το προσαύλιο τμήμα του κυτταροπλάσματος και το διάμεσο ιστό με αυξημένη ένταση στην κεφαλή της επιδιδυμίδας στα υπογοναδικά ζώα σε σύγκριση με την ουρά και ισχυρότερη χρώση στα παχύσαρκα ζώα. Σπάνια ανιχνεύθηκε RAGE στις τομές επιδιδυμίδας και μόνο στα υπογοναδικά πειραματόζωα στην κορυφαία περιοχή των κυλινδρικών κυττάρων.

5. Σπέρμα

Σε δείγματα που ελήφθησαν τόσο από διαβητικούς όσο και από υγιείς άνδρες (Mallidis et al, 2007; Mallidis et al, 2008), η ανοσοιστοχημεία ανέδειξε σπικτικό πρότυπο χρώσης για τα AGEs στην ουρά και την μεσότητα των σπερματοζωαρίων ενώ ο υποδοχέας RAGE κυρίως ανιχνεύθηκε στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Σε

διαβητικούς άνδρες ιδιαίτερα έντονη χρώση τόσο CML όσο και RAGE παρατηρήθηκε στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων, σε περιοχή που αντιστοιχεί στο ακρόσωμα, σε αντίθεση με ασθενέστερη εντόπιση σε μη διαβητικούς. Η «ισημερινή» περιοχή των σπερματοζωαρίων ακριβώς κάτω από το ακρόσωμα ήταν εντόνως θετική και για τους δύο δείκτες και σαφώς αφοριζόμενη σε όλα τα ανοσοδραστικά σπερματοζωάρια ανεξάρτητα από τη μορφολογία τους. Στα κυτταροπλασματικά υπολείμματα των σπερματοζωαρίων τόσο από διαβητικούς όσο και από υγιείς άνδρες ισχυρή και ενιαία CML ανοσοαντίδραση ανιχνεύθηκε.

Η ημιποσοτική ανάλυση της χρώσης αποκάλυψε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση RAGE σε δείγματα από διαβητικούς άνδρες σε σύγκριση με μη διαβητικούς. Επιπλέον ανάλογα με τα στάδια της ακροσωμιακής αντίδρασης η εντόπιση του RAGE διέφερε. Συγκεκριμένα, όταν η ακροσωμιακή μεμβράνη ήταν ακέραια, η αντίδραση για το RAGE ήταν έντονα θετική στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων από την ισημερινή περιοχή έως την κορυφή. Όταν η ακροσωμιακή αντίδραση είχε αρχίσει, ισχυρότερη αντίδραση παρατηρούνταν στη μεσότητα σε σύγκριση με τα υπολείμματα του ακροσώματος. Σε σπερματοζωάρια που η ακροσωμιακή αντίδραση είχε ολοκληρωθεί δεν υπήρχε χρώση. Η ειδική μικροσκοπική εντόπιση του υποδοχέα RAGE στα σπερματοζωάρια πέριξ του πυρήνα ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι διαβήτη, υποδηλώνει ρυθμιστικό ρόλο του υποδοχέα στην ωρίμανση και τη λειτουργία τους.

Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση του CML σε εκχυλίσματα σπέρματος και σπερματικού πλάσματος με ELISA, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι πιο δύσκολη λόγω της διττής του φύσης, με την ευνοϊκή για τη γλυκοζυλίωση αυξημένη συγκέντρωση φρουκτόζης, που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα σπερματοζωάρια και την ισχυρά προστατευτική δράση της φυσιολογικής συγκέντρωσης στο μικροπεριβάλλον του όρχεως των πολυαμινών σπερμίνης και σπερμιδίνης, που προστατεύουν από το σχηματισμό AGEs. Είναι ενδιαφέρον ότι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα CML στο σπέρμα διαβητικών ανδρών σε σύγκριση με μη διαβητικούς ανιχνεύθηκε σε συμφωνία με τα αποτελέσματα και της ανάλυσης western blot ενώ το συνολικό ποσό CML ήταν μεγαλύτερο στο σπερματικό πλάσμα υποδηλώνοντας αυξημένη συγκέντρωση σε διαλυτή μορφή.

Αντίθετα η έκφραση του RAGE ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη τόσο στο σπέρμα όσο και στο σπερματικό πλάσμα των διαβητικών ανδρών. Οι συγγραφείς προκειμένου να εξηγήσουν την αναντιστοιχία των παρατηρήσεων, υπέθεσαν ότι ο διαβήτης ενεργοποιεί μηχανισμούς κάθαρσης της CML από το σπέρμα χωρίς ωστόσο να είναι επαρκής ώστε να αναστείλει την βλαβερή ενεργοποίηση του υποδοχέα RAGE.

Σε άλλη μελέτη ανάλυσης του σπέρματος διαβητικών και υγιών νέων ανδρών χωρίς άλλες συννοσηρότητες η συνολική συγκέντρωση των AGEs και του RAGE στο σπερματικό πλάσμα καθώς και του κατακερματισμένου DNA στα σπερματοζωάρια ήταν σημαντικά αυξημένη στους διαβητικούς συμμετέχοντες σε σύγκριση με τους υγιείς ($p < 0.001$) ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συγκέντρωση της CML μεταξύ των δύο ομάδων (Karimi et al, 2012). Η έκφραση του RAGE στο σπέρμα σχετίζεται άμεσα με τον κατακερματισμό του σπερματικού DNA στους διαβητικούς άνδρες ($r = 0.81, P < 0.001$) (Hosseinzadeh Colagar et al, 2013). Οι παρατηρήσεις αυτές σε συνδυασμό με την αυξημένη λιπιδική υπεροξείδωση και τη σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο του σπέρματος όσο και του σπερματικού πλάσματος, υπογραμμίζουν το ρόλο των AGE και του υποδοχέα RAGE στη δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος των αρρένων στα πλαίσια του οξειδωτικού stress.

Στην πειραματική μελέτη ΣΔ, σαφή χρώση της κεφαλής των σπερματοζωαρίων στην περιοχή του ακροσώματος, της equatorial περιοχής και των κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων όπου ήταν ορατά για τα AGEs και μόνο στο ακρόσωμα για το RAGE παρατηρήθηκε με υπεροχή στα διαβητικά ποντίκια σε σύγκριση με τους μάρτυρες (O'Neill et al, 2010). Το ποσό της CML στο σπέρμα όπως αξιολογήθηκε από την ELISA ήταν αυξημένο και στα δύο διαβητικά ζωικά πρότυπα (STZ: 1.9 φορές, Ins 2Akita: 2.2 φορές σε σύγκριση με τους μάρτυρες) χωρίς ωστόσο να αγγίζει στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα η συγκέντρωση RAGE δεν ήταν διαφορετική στις ομάδες πειραματόζωων. Στη μελέτη του ΜΣ (Mallidis et al, 2011) στικτή χρώση καταγράφηκε τόσο για τη CML όσο και για το RAGE σε όλα τα ζώα στην ουρά των σπερματοζωαρίων, πιο εκτεταμένη χρώση CML στην ομάδα ΜΣ στη μεσότητα των σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες και RAGE τόσο

στην ομάδα ΜΣ όσο και υπογοναδικών ζώων σε σύγκριση με μάρτυρες ενώ διακριτή χρώση και για τους δύο δείκτες σημειώθηκε στην περιοχή του ακροσώματος. Διαβάθμιση της έντασης με χαμηλότερη στην ομάδα μαρτύρων, υψηλότερη στην ομάδα των υπογοναδικών πειραματόζων και την πιο ισχυρή στην ομάδα του ΜΣ παρατηρήθηκε. Παρόμοια με τα αποτελέσματα της ELISA στο σπέρμα διαβητικών ζώων, η συγκέντρωση CML ήταν αυξημένη στα ζώα με ΜΣ και υπογοναδισμό (1.43-φορές και 1.35-φορές αντίστοιχα) αλλά όχι στατιστικά σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με τους μάρτυρες, παράλληλα με την παρατηρούμενη αύξηση κατακερματισμένου DNA ενώ η συγκέντρωση RAGE δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων πειραματισμού.

6. Πέος

Οι Jiaan κ συν. ήταν οι πρώτοι που ανίχνευσαν την παρουσία της πεντοσιδίνης, μιας μορφής AGE, σε βιοψίες πεικού ιστού (Jiaan et al, 1995). Εκθετική αύξηση της συσσώρευσης πεντοσιδίνης στον ινώδη χιτώνα και στα σηραγγώδη σώματα του πέους με την ηλικία αναδείχθηκε με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (high-performance liquid chromatography). Χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική αυξημένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε επίσης σε διαβητικούς άνδρες σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Καθότι τα επίπεδα AGEs στον ορό των ασθενών δεν ήταν σημαντικά αυξημένα στους διαβητικούς συμμετέχοντες άλλος μηχανισμός υπεύθυνος για την αυξημένη τους συγκέντρωση στο πέος από την εναπόθεση AGEs από την κυκλοφορία υποτέθηκε από τον Seftel κ συν. (Seftel et al, 1997). Σε ένα άλλο μοντέλο συστηματικής νόσου που προδιαθέτει σε σχηματισμό AGE, την νεφρική ανεπάρκεια, η χημική ανάλυση έδειξε υψηλότερα επίπεδα 5HMF στο πέος επίμυων (Usta et al, 2002).

Τα AGEs ήταν αυξημένα στα σηραγγώδη σώματα διαβητικών ζωικών προτύπων σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Cellek et al, 2004; Chen et al, 2008; Usta et al, 2004; Usta et al, 2003; Usta et al, 2006). Παράλληλα με την εκτεταμένη τροποποίηση του κολλαγόνου από τα AGEs, αυξημένη ήταν η έκφραση του RAGE σε

διαβητικούς άρρηνες. Η ανοσοϊστοχημική χρώση CML και του υποδοχέα galectin-3 των AGEs, κυρίως εντοπίστηκε στα κολποειδή των σηραγγωδών σωμάτων και το αγγειακό ενδοθήλιο τόσο σε υγιείς όσο και σε διαβητικούς επίμυες. Εκτός του πέους χρώση ανιχνεύθηκε και στα μείζονα πυελικά γάγγλια, τα οποία παρέχουν τη νεύρωση στο στυτικό ιστό. Ο ανοσοφθορισμός κατέγραψε υψηλότερη συγκέντρωση στα πεικά αγγειονευρώδη δερμάτια, με ασθενέστερη αντίδραση στις λείες μυϊκές ίνες, το συνδετικό ιστό και το ενδοθήλιο των σηραγγωδών σωμάτων. Σε ένα άλλο μοντέλο συστηματικής νόσου

Η στύση απαιτεί την χάλαση των κολποειδών των σηραγγωδών σωμάτων και στην επακόλουθη διαστολή των αρτηριών σαν αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης μη αδρενεργικών, μη χολινεργικών νευρώνων που απελευθερώνουν NO και του ενδοθηλίου. Η απόφραξη της φλεβικής απορροής που προκύπτει σαν αποτέλεσμα οδηγεί στη διόγκωση και τη σκληρότητα του πέους. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα AGEs επηρεάζουν τόσο τις αγγειακές όσο και τις νευρικές αποκρίσεις αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας.

Οι αγγειακές διαταραχές που προκύπτουν από τη χρόνια υπεργλυκαιμία και τον επακόλουθο σχηματισμό AGEs έχουν ενοχοποιηθεί για τη διαταραχή του αγγειακού δικτύου του στυτικού ιστού. Τα AGEs ελαττώνουν τη συσπαστικότητα των σηραγγωδών σωμάτων καθιστώντας σταδιακά πιο άκαμπτο το ελαστικό αρτηριακό τοίχωμα. Επιπλέον ο συνδυασμός γλυκοζυλίωσης και οξειδωτικού stress που είναι άρρηκτα συνδεδεμένες και αμοιβαία ανατροφοδοτούμενες διαδικασίες, στο αγγειακό ενδοθήλιο βαθμιαία επάγει τη χρόνια βλάβη που οδηγεί σε ίνωση.

Τα AGEs έχει βρεθεί ότι ανταγωνίζονται το NO, τον κύριο ρυθμιστή του στυτικού μηχανισμού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Bucala et al, 1991). Διαταράσσουν τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών μέσω του σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οι οποίες και αντιδρούν με το NO σχηματίζοντας peroxynitrite., το οποίο δεν έχει την ίδια δράση με το NO όσον αφορά τη χάλαση των μυϊκών ινών και περαιτέρω οδηγεί σε ατροφία, απόπτωση και ίνωση των λείων μυϊκών ινών (Cartledge et al, 2001; Siddiqi & Lewis, 2008).

Λόγω της αστάθειας του μορίου του NO, προκειμένου να μελετήσουν την επίδραση των AGEs στο NO, οι ερευνητές επικέντρωσαν στα μακράς διάρκειας ζωής μόρια-ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του NO. Τόσο η ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (endothelial eNOS), όσο και η επαγόμενη ισομορφή (inducible iNOS) ανιχνεύθηκαν στις λείες μυϊκές ίνες των σηραγγωδών σωμάτων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι Seftel κ συν. υπέθεσαν ότι τα AGEs διαταράσσουν την ισορροπία L-arginine (υπόστρωμα παραγωγής NO) - NO αυξάνοντας την έκφραση και την ενεργότητα της επαγόμενης συνθετάσης, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τη δράση της eNOS. Επιβεβαιώνοντας της υπόθεση αυτή, η έκφραση της iNOS στα σηραγγώδη σώματα διαβητικών επίμυων (Usta et al, 2003) και επίμυων με νεφρική ανεπάρκεια (Usta et al, 2002) βρέθηκε αυξημένη σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Τα AGEs είναι επίσης πιθανό να αντιδρούν και με άλλα αγγειοδραστικά μόρια που εμπλέκονται στο στυτικό μηχανισμό. Η ισχυρότερη έκφραση RAGE σαν αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης AGE επίμυων σε συνδυασμό με την αυξημένη δραστηριότητα της ενδοθηλίνης (endothelin)-1 με γνωστό αγγειοσπαστικό ρόλο που παρατηρήθηκε στα σηραγγώδη σώματα διαβητικών επίμυων υποδηλώνει την πιθανή συσχέτισή τους στα πλαίσια της στυτικής δυσλειτουργίας (Chen et al, 2008).

Άλλοι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση των AGEs στη νευρική NOS εντός του αυτονόμου νευρικού συστήματος καθώς είναι ο κύριος νευρομεταβιβαστής του στυτικού μηχανισμού (Cellek et al, 2003; Cellek et al, 2004; Usta et al, 2006). Μετά την εκδήλωση ΣΔ σε αρουραίους που εκτέθηκαν σε στρεπτοζοτοκίνη, παρατηρείται αρχικά μια σταδιακή ελάττωση της έκφρασης nNOS στους νιτρεργικούς νευρώνες του πέους. Μετά την αρχική αυτή φάση, παρατηρήθηκε συσσώρευση των AGEs στο πέος και τα μείζονα πυελικά γάγγλια σε συνδυασμό με εκλεκτική απόπτωση των νιτρεργικών νευρώνων και μη αναστρέψιμη εξάλειψη της έκφρασης nNOS στο πέος λόγω του αυξημένου οξειδωτικού stress. Η χορήγηση ινσουλίνης ομαλοποίησε τα επίπεδα γλυκόζης αλλά δεν μπόρεσε να αποκαταστήσει τη νευρική βλάβη και τις διαταραχές των σηραγγωδών σωμάτων, υποδηλώνοντας το βλαβερό ρόλο των AGEs (Cellek et al, 2003). Είναι ενδιαφέρον ότι σε μια κυτταρική καλλιέργεια κυττάρων

νευροβλαστώματος, το ενδογενές NO δρα συνεργικά με τα AGEs οδηγώντας σε απόπτωση των νιτρεργικών νευρώνων επιβεβαιώνοντας την προηγούμενη υπόθεση (Cellek et al, 2004).

Έμμεσα δεδομένα προκύπτουν επίσης από μελέτες της έκφρασης RAGE σαν αποτέλεσμα της ισχαιμίας στο μυοκάρδιο ή τον εγκέφαλο (Cellek et al, 2013). Παρότι η επίδραση των AGE σε συνδυασμό με την υποξία στους νιτρεργικούς νευρώνες, είναι πιθανό σε συνθηκες υποξίας η βλαβερή δράση των AGE να ενισχύεται. Επομένως η υποξία που οφείλεται στις μικροαγγειακές διαταραχές των βασικών γαγγλίων σε συνδυασμό με τις κυτταροτοξικές δράσεις τα συσώρευσης των AGE μπορεί συνεργικά να οδηγούν σε καταστροφή των νιτρεργικών νευρικών κυττάρων, τα οποία δεν έχουν δυνατότητα πολλαπλασιασμού και αντικατάστασης, οδηγώντας σε μη αναστρέψιμη απώλεια των νευρώνων.

Είναι λοιπόν σαφές ότι ποικίλοι μηχανισμοί εμπλέκουν τα AGE στην παθοφυσιολογία της στυτικής δυσλειτουργίας μέσω τόσο των προκαλούμενων δομικών αλλαγών στα σηραγγώδη σώματα όσο και στη λειτουργικότητα του αγγειακού και νευρικού ιστού.

2.12 Φαρμακολογικές επιλογές κατά των AGEs και θεραπευτικές παρεμβάσεις

2.12.1. Θεραπευτική στόχευση κατά των προϊόντων AGEs

Τα AGEs αποτελούν υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο και σημαντική προσπάθεια καταβάλλεται για την ανακάλυψη των μοριακών μηχανισμών που θα επιτρέψουν την πρόληψη σχηματισμού, την ελάττωση ή την απομάκρυνση ήδη σχηματισμένων AGE (Aldini et al, 2013). Οι διαφορετικές στρατηγικές που έχουν ως τώρα μελετηθεί μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους και συγκεκριμένα αν είναι αποτελεσματικές μέσω αναστολής του σχηματισμού AGE

ή διευκόλυνσης ή επιτάχυνσης της κάθαρσής τους καθώς και αναστολής των βλαβερών βιολογικών τους δράσεων.

Η πρώτη ομάδα αναστολέων σχηματισμού προϊόντων γλυκοζυλίωσης περιλαμβάνει διαφορετικές προσεγγίσεις που στοχεύουν διάφορους επαγωγούς των αντιδράσεων σχηματισμού (ROS, ιόντα μετάλλου) και ενδιάμεσα προϊόντα (κυρίως δραστικές καρβονυλικές ρίζες - reactive carbonyl species (RCS)). Η προστατευτική δράση των εξωγενώς χορηγούμενων αντιοξειδωτικών έχει εκτεταμένα μελετηθεί σε ζωικά κυρίως πρότυπα και σε σχέση κυρίως με την ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών. Φαίνεται ότι τα αντιοξειδωτικά και οι χηλικές ενώσεις (chelators) αναστέλλουν το σχηματισμό προϊόντων γλυκοξείδωσης δίχως ωστόσο να επηρεάζουν τη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών. Παρά την πληθώρα *in vitro* και *in vivo* μελετών, ένας μεγάλος αριθμός κλινικών μελετών που στόχευαν στην αναγνώριση των επιδράσεων των αντιοξειδωτικών (βιταμίνες E και C, β - καροτένιο και ρετινόλη) στην ανάπτυξη τόσο του καταρράκτη όσο και των επιπλοκών του ΣΔ δεν πέτυχαν να αναδείξουν ωφέλιμο ρόλο. Διάφοροι chelators έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε *in vitro* μελέτες ανέστειλαν το σχηματισμό CML ή ελάττωσαν τις συγκεντρώσεις MG και 3-DG, ισχυρών πρόδρομων μορφών AGEs καθώς και συνολικά των AGEs σε πειραματόζωα με αυξημένα AGEs. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση οι Nagai κ συν. πρότειναν τη χηλίωση ως υπεύθυνη για την ανασταλτική δράση του σχηματισμού AGE διαφόρων φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των επιπλοκών του ΣΔ, όπως η pyridoxamine, η tenilsetam, η carnosine, η metformin, η OPB-9195 και οι ACE αναστολείς και οι αναστολείς του υποδοχέα αγγειοτενσίνης II. Καθίσταται συνεπώς δύσκολη η διάκριση του μηχανισμού μέσω του οποίου η καθεμιά από αυτές τις ουσίες επηρεάζει το σχηματισμό AGE.

Στα πλαίσια της πρώτης κατηγορίας, ουσίες οι οποίες μπλοκάρουν τα ενδιάμεσα καρβονυλικά προϊόντα έχουν μελετηθεί, άλλες με μεμονωμένο μηχανισμό δράσης και άλλες με πολλαπλούς μηχανισμούς επίδρασης στα AGEs. Με βάση τη χημική τους δομή διακρίνονται σε ουσίες που περιέχουν θειόλη, παράγωγα γουανιδίνη και υδραζίνης και ανάλογα των β-δικαρβονυλικών, τα οποία χωρίζονται περαιτέρω σε ετεροκυκλικές ενώσεις, παράγωγα αμινών και φαινόλες και

πολυφαινόλες. Η Aminoguanidine, που είναι επίσης γνωστή ως rimagedine ήταν μία από τις πρώτες ουσίες που έχει μελετηθεί και παρότι η θετική της δράση έναντι των επιπλοκών του διαβήτη και της ουραιμίας σε διάφορα ζωικά πρότυπα ήταν αξιοσημείωτη, η φαρμακευτική ουσία δεν είχε επιτυχία σε κλινικές μελέτες πιθανόν λόγω της ταχείας νεφρικής κάθαρσης, της μειωμένης in vivo δραστηριότητας και της απώτερης τοξικότητας της. Η OPB-9195, ένα παράγωγο υδραζίνης, τόσο in vitro όσο και in vivo προσέφερε προστασία από τη βιολογική δράση των AGEs ελαττώνοντας το σχηματισμό τους. Ένα παράγωγο της βιταμίνης Β6, η pyridoxamine, η οποία αναστέλλει τις αντιδράσεις των προϊόντων Amadori, που μη αναστρέψιμα οδηγούν σε AGE καταστέλλοντας επίσης και την υπεροξειδωση των λιπιδίων, έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο σε πειραματικές όσο και σε πρώιμες κλινικές μελέτες. Αρωματικά LR σύμπλοκα έχει φανεί ότι είναι ισχυροί αναστολείς της διαδικασίας γλυκοζυλίωσης, δρώντας σε διαφορετικά βήματα της. Είναι ενδιαφέρον ότι εκτός από τη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου, οι παράγοντες LR δημιουργούν ένα ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ και in vitro φαίνεται να έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.

Μία δεύτερη κατηγορία παραγόντων στοχεύουν στην επιτάχυνση του καταβολισμού ήδη σχηματισμένων AGEs/ALEs. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την ενίσχυση του ενδογενούς πρωτεολυτικού συστήματος ή την χρήση ξενοβιοτικών που μπορούν να αποδομούν καταλυτικά AGEs/ALEs. Η ενζυματική προστασία του οργανισμού από τη γλυκοζυλίωση παρέχεται από τη κινάση-3 της φρουκτοζαμίνης (Fructosamine-3-kinase), που επιδιορθώνει τις βλάβες από τα προϊόντα Amadori, την αναγωγή της αλδόζης και το σύστημα της γλυοξαλάσης. Εξωγενώς χορηγούμενη λυσοζύμη φαίνεται να ελαττώνει τα επίπεδα AGE και να παρέχει προστασία στο επαγόμενο από αυτά οξειδωτικό φορτίο. Στο εσωτερικό των κυττάρων δύο είναι τα πρωτεολυτικά συστήματα που αποδομούν τα διάφορα μακρομόρια, τα λυσοσώματα και τα πρωτεασώματα. Γενετική τροποποίηση του πρωτεασώματος ή ενεργοποίηση του από φυσικές ή συνθετικές ουσίες έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε in vivo μοντέλα. Ήδη σχηματισμένα διακλαδισμένα-AGE (cross-linking) μπορούν να διασπαστούν από φάρμακα που χημικά τους διανοίγουν ελαττώνοντας την ποσότητα των AGE. Το N-phenacylthiazolium bromide

(PTB) και πιο σταθερά παράγωγά του όπως το ALT-711 (Alagebrium), έχουν ευεργετική δράση στην αναστροφή των βλαβερών συνεπειών της γήρανσης και του διαβήτη για τις οποίες ενοχοποιούνται τα AGEs. Επιπρόσθετα η αναστολή της απορρόφησης γλυκοτοξινών μέσω της AST-120 (Kremezin), ενός από του στόματος adsorbent συνέβαλε στην απομάκρυνση ουραιμικών τοξινών και AGE. Εξάλλου η ελάττωση των προσλαμβανόμενων από τη διατροφή AGE ή το κάπνισμα θα μπορούσε σημαντικά να μειώσει τις βλαπτικές τους δράσεις.

Το τρίτο επίπεδο δράσης ενάντια στα AGE, που είναι και το πιο καινοτόμο συνίσταται στο μπλοκάρισμα της βιολογικής απόκρισης στη δράση των AGE/ALEs. Αυτή η λογική προέκυψε μετά την ανακάλυψη του υποδοχέα RAGE και της galectin-3. Πρέπει να τονιστεί ότι η στρατηγική αυτή στοχεύει τόσο στα ενδογενώς παραγόμενα όσο και στα εξωγενώς προσλαμβανόμενα AGEs/ALEs. Η διαλυτή ισομορφή sRAGE έχει την δυνατότητα να αντιδρά με τους συνδέτες του υποδοχέα RAGE και η ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των συνδετών, του μεμβρανικού υποδοχέα RAGE και του sRAGE είναι δυναμική επηρεαζόμενη από παθήσεις και διάφορα φάρμακα. Είναι ενδιαφέρον ότι παραδοσιακά καρδιαγγειακά φάρμακα, όπως οι στατίνες, οι θειαζολιδινεδιόνες, οι αναστολείς ACE και οι ανταγωνιστές του AT-1 υποδοχέα καθώς επίσης και τα nutraceuticals (απόσταγμα grape seed proanthocyanidin) μπορούν να τροποποιήσουν την έκφραση του RAGE και την συγκέντρωση στην κυκλοφορία του sRAGE σε καρδιαγγειακά νοσήματα στα οποία παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση RAGE, γεγονός που μπορεί να συνιστά νέο μηχανισμό δράσης τους καθαρές των συνδετών του RAGE. Η εισαγωγή ανασυνδυασμένου sRAGE αναμένεται να αποτελέσει νέο θεραπευτικό εργαλείο για την πρόληψη της ενεργοποίησης του RAGE από προ-φλεγμονώδη μόρια. Μία άλλη θεραπευτική προσέγγιση στοχεύει στην απενεργοποίηση του υποδοχέα από μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους αναστολείς ή αντι-RAGE αντισώματα, ωστόσο λίγα είναι τα ως τώρα in vitro δεδομένα και πτωχά τα αποτελέσματα πρώιμων κλινικών μελετών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η πιθανή ελάττωση της έκφρασης του υποδοχέα RAGE (downregulation) από διάφορες φαρμακευτικές (PPAR-γ αγωνιστές, μετφορμίνη, η βαρδεναφίλη που είναι αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 5 και γνωστά καρδιαγγειακά φάρμακα) ή φυσικά προϊόντα, η

οποία αντιπροσωπεύει δευτερογενή μηχανισμό δράσης τους. Εξάλλου το μπλοκάρισμα του σηματοδοτικού καταρράκτη του RAGE πέρα από την ελάττωση της έκφρασης του μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο, όπως φαίνεται από τα ενθαρρυντικά δεδομένα για την χρήση κυρίως κεκαθαρμένων φυσικών βιοδραστικών ουσιών όπως η quercetin, η curcumin και άλλα φλαβονοειδή, που αναστέλλουν συγκεκριμένα τμήματα του μονοπατιού μετάδοσης του σήματος από το RAGE.

2.12.2. Φαρμακολογική αναστολή συσσώρευσης AGEs και δράσης τους στο ουροποιογεννητικό

Ουροδόχος κύστη

Υποθέτοντας το βλαβερό ρόλο των AGEs στη διαταραχή της λειτουργίας της ουροδόχου κύστης στα πλαίσια του ΣΔ, διάφοροι ερευνητές προσπάθησαν να αναστείλουν τη δυνητική τους επίδραση καταστέλλοντας την εναπόθεσή τους. Χορήγηση aminoguanidine σε επίμυες που παρουσίασαν ΣΔ σαν αποτέλεσμα της έκθεσης σε streptozotocin οδήγησε σε ελάττωση του αυτό-ανοσοφθορισμού και της ενζυματικής του πέψης, αντικατοπτρίζοντας την αναστολή συσσώρευσης AGE χωρίς ωστόσο να μπορέσει να αναστρέψει την ελάττωση του κολλαγόνου. Έτσι οι Eika κ.α. (Eika et al, 1992) υπέθεσαν ότι η aminoguanidine προστατεύει έναντι της συσσώρευσης των AGE και της επακόλουθης τροποποίησης του κολλαγόνου αλλά δεν κατάφερε να μετριάσει τις επιδράσεις τόσο in-vivo όσο και in-vitro στη λειτουργία της κύστης που παρατηρήθηκε σαν αποτέλεσμα του ΣΔ στη διάρκεια 2 μηνών πειραματισμού.

Σπέρμα

Διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας. Η χορήγηση lycorane, που είναι γνωστό για την ευεργετική αντιοξειδωτική του δράση, μείωσε τα επίπεδα sRAGE στο σπερματικό πλάσμα αλλά όχι στο αίμα, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην εκλεκτική εναπόθεση της στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και συγκεκριμένα στον προστάτη (Oborna et al, 2011). Η ελαττωμένη έκφραση sRAGE μπορεί να οφείλεται στην καταστολή των οξειδωτικών διαμεσολαβητών και εξηγεί τη σχετική βελτίωση της γονιμότητας μετά τη χορήγηση της. Η χορήγηση του αιθανολικού εκχυλίσματος του διαδεδομένου φρούτου σε Ασιατικές χώρες Terminalia chebula σε διαβητικούς επίμυες πέρα από τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ οδήγησε στην ελάττωση των επιπέδων AGEs στους όρχεις των πειραματόζων (Kim et al, 2011).

Πέος

Η χορήγηση Aminoguanidine μετά την επαγωγή ΣΔ σε επίμυες με την έκθεση σε STZ ανέστειλε τη διαταραχή της μεσολαβούμενης από το NO χάλασης των λείων μυϊκών ινών σε παρασκευάσματα σηραγγωδών in vitro (Cartledge et al, 2001). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει ότι τα AGEs τόσο ανταγωνιζόμενα το NO όσο και ελαττώνοντας τη συσπαστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων μπορεί να επηρεάσουν τη στυτική λειτουργία. Επιπλέον της αγγειακής τους δράσης, η περινευριδιακή εντόπιση των AGEs πιθανά αναστέλλει την απελευθέρωση του NO, δικαιολογώντας τη μεγαλύτερη αναστολή που προκαλείται από την aminoguanidine στην προερχόμενη από νευρικά ερεθίσματα σε σύγκριση με την ενδοθηλιακής προέλευσης χάλαση των λείων μυϊκών ινών από το NO.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και μία άλλη μελέτη, στην οποία η aminoguanidine ελάττωσε την εναπόθεση AGE, την έκφραση galectin-3 και της iNOS συνθετάσης στο πέος διαβητικών επίμυων (Usta et al, 2003). Σχετικά με τα λειτουργικά αποτελέσματα, η χορήγηση του σκευάσματος αποκατέστησε τη

μειωμένη στυτική απόκριση ως συνέπεια της ενεργοποίησης από ερεθισμό του σηραγγώδους νεύρου, που παρατηρείται στο ΣΔ, όπως αυτή αξιολογήθηκε από τη μέτρηση των πιέσεων εντός των σηραγγωδών σωμάτων *in vivo*. Ωστόσο η χορήγηση της ουσίας 4 εβδομάδες μετά την επαγωγή του ΣΔ και για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων κατάφερε να αναστρέψει την επίδραση του ΣΔ στη στυτική λειτουργία χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα των AGE στο στυτικό ιστό (Usta et al, 2004). Όταν χορηγήθηκε aminoguanidine σε διαβητικά πειραματόζωα 6 εβδομάδες μετά την εκδήλωση του ΣΔ για περίοδο 6 εβδομάδων δεν κατάφερε να αναστρέψει τη στυτική δυσλειτουργία (Usta et al, 2006). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους Usta και συν. να υποθέσουν ότι άλλος μηχανισμός και όχι η αναστολή σχηματισμού AGE είναι υπεύθυνος για την ευεργετική δράση της στη στυτική δυσλειτουργία σε ΣΔ, όπως η αναστολή της επαγόμενης iNOS, η οποία σημειώθηκε και θεωρήθηκε ότι επηρεάζει την έκφραση eNOS and nNOS στα σηραγγώδη (Usta et al, 2004; Usta et al, 2006). Είναι εξάλλου γνωστό ότι το φάρμακο μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό νέων AGE αλλά δεν μπορεί να διασπάσει ήδη σχηματισμένα υποδεικνύοντας προφυλακτική και όχι θεραπευτική ωφέλεια.

Η χρήση του ALT-711, το οποίο είναι γνωστό ότι διασπά τις ομοιοπολικές διασυνδέσεις των AGE, για περίοδο 6 εβδομάδων σε διαβητικούς αρουραίους 6 εβδομάδες μετά την εκδήλωση του ΣΔ (Usta et al, 2006), ελάττωσε τη συγκέντρωση των AGE στον ορρό και την ανοσοχρώση AGE στο πέος, τα οποία όμως εξακολουθούσαν να είναι υψηλότερα από τα παρατηρούμενα στους υγιείς μάρτυρες της μελέτης. Η χορήγηση αποκατέστησε επιτυχώς τη στυτική λειτουργία που επηρεάστηκε από το ΣΔ. Επιπλέον αποκατέστησε τα επίπεδα nNOS στο πέος, τα οποία μειώθηκαν σημαντικά στα διαβητικά πειραματόζωα. Πιθανολογείται επίσης και έμμεση δράση του φαρμάκου στην αναστολή των AGEs μέσω της αντιοξειδωτικής του ιδιότητας ως συμπλόκου μεταλλικής χηλίωσης. Η απομάκρυνση από τον οργανισμό ήδη σχηματισμένων AGE, συνιστά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο.

Έμμεσα δεδομένα για την επίδραση της βαρδεναφίλης στα AGE και τις βλαπτικές τους συνέπειες, ενός αναστολέα της PDE5, που ευρέως χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της ΣΔ προκύπτουν από τη χορήγηση της σε καλλιέργειες

ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλίου λώρου (human umbilical vein endothelial cells - HUVEC) (Ishibashi et al, 2011). Η ευεργετική λοιπόν δράση της βαρδεναφίλης στην αντιμετώπιση της ΣΔ θα μπορούσε να οφείλεται εκτός του γνωστού ρόλου της στην μείωση της επαγόμενης από τα AGEs δημιουργία ROS και έκφρασης RAGE καθώς και προφλεγμονωδών κυτοκινών που παρατηρήθηκε σε αυτό το in vitro πρότυπο.

3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

3.1 Γενικές έννοιες/εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι θανάτου των ευκαρυωτικών κυττάρων: η νέκρωση και η απόπτωση. Η νέκρωση προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες, όπως η υπερθερμία, η υποξία, η ισχαιμία και ο τραυματισμός. Περιλαμβάνει μια ποικιλία τύπων κυτταρικού θανάτου με κοινό χαρακτηριστικό τον “παθητικό” ρόλο του κυττάρου κατά την καταστροφή του και χαρακτηρίζεται από μία σειρά φαινομένων που καταλήγουν στην πλήρη λύση του κυττάρου και δεν απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Η απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου, κυρίως πρωτεασών και λυσοσωμικών ενζύμων, στον εξωκυττάριο χώρο πυροδοτεί απελευθέρωση κυτταροκινών από τα γειτονικά κύτταρα (μακροφάγα) και τοπική φλεγμονώδη αντίδραση.

Η απόπτωση αποτελεί μορφολογικά στερεότυπη μορφή κυτταρικού θανάτου, που επικρατεί σε πολυκυττάριους οργανισμούς και απομακρύνει μεμονωμένα κύτταρα από ζωντανούς ιστούς, χωρίς να διαταράσσει την αρχιτεκτονική τους. Η “απόπτωση” είναι μία από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες έννοιες στη σύγχρονη Ιατρική και Βιολογία. Πρόκειται για αρχαία ελληνική λέξη που κάνει την εμφάνισή της σε συγγράμματα του Ιπποκράτους και του Γαληνού. Ο όρος προτάθηκε το 1972 από τους Kerr, Wyllie και Currie (Kerr et al, 1972) οι οποίοι, εμπνεόμενοι από την Ιλιάδα, τον χρησιμοποίησαν προκειμένου να περιγράψουν την εκλεκτική και προγραμματισμένη απομάκρυνση των νεκρωμένων κυττάρων από τον οργανισμό (πτώση των φύλλων από τα δέντρα ή των πετάλων).

Πρόκειται για φαινόμενο πρωταρχικό και ουσιώδες για την ανάπτυξη των οργανισμών και για την διατήρηση της ομοιόστασης, καθώς αποτελεί το φυσιολογικό μηχανισμό της “αθόρυβης” απομάκρυνσης των κυττάρων που προσεγγίζουν το τέλος της προβλεπόμενης ζωής τους, έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη βλάβη ή είναι σε περίσσεια. Σε αντίθεση με τη νέκρωση, η απόπτωση είναι ενεργητική κυτταρική διαδικασία που δεν πυροδοτεί φλεγμονώδη αντίδραση, συνίσταται δε στην απομάκρυνση άχρηστων, ηλικιωμένων και

κατεστραμμένων κυττάρων από ζωντανούς ιστούς, χωρίς να διαταράσσει την αρχιτεκτονική τους. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου απεδείχθη ότι τα κύτταρα που έχουν ακολουθήσει την πορεία αυτή χαρακτηρίζονται από κοινές βιοχημικές και δομικές αλλαγές όπως είναι η φυσαλλιδιοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης (blebbing) χωρίς απώλεια, όμως, της ακεραιότητάς της, η συμπύκνωση της χρωματίνης (condensation), η διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού και η κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα (fragmentation), η έκπτωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας και η συρρίκνωση του κυττάρου (shrinkage) (Kerr et al, 1994). Τελικά, το κύτταρο αποδομείται σε μικρά τμήματα που αποτελούνται από κυτταρόπλασμα και οργανίδια, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη και καλούνται “αποπτωτικά σωμάτια” (apoptosomes). Τα σωμάτια αυτά φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωματικά ένζυμα (Elmore, 2007).

Η απόπτωση είναι υπεύθυνη για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες οι οποίες περιλαμβάνουν: α) την προγραμματισμένη καταστροφή κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, όπως συμβαίνει στην οργανογένεση και την εξελικτική εκφύλιση β) την ορμονο-εξαρτώμενη εκφύλιση οργάνων, όπως, για παράδειγμα, του προστάτη μετά από ανδρογονικό αποκλεισμό, γ) την απώλεια μέρους του DNA σε πολλαπλασιαζόμενους πληθυσμούς, δ) την απώλεια των T-κυττάρων του θύμου κατά την περίοδο της ωρίμανσης, καθώς και ε) την απάντηση σε πλήθος ερεθισμάτων, όπως π.χ. η απώλεια αυξητικών παραγόντων, η θερμότητα ή η εφαρμογή κυτταροστατικής θεραπείας (L.R. Kanoussi, 2012).

Η αποτυχία των κυττάρων να οδηγηθούν στην αποπτωτική διαδικασία οδηγεί σε υπερπλαστικές νόσους, καρκίνο και αυτοάνοσες ασθένειες, ενώ η υπερβολική εφαρμογή του αποπτωτικού μηχανισμού μπορεί να προκαλέσει εκφυλιστικές νόσους.

3.2 Μονοπάτια απόπτωσης και ρύθμιση της

Στα κύτταρα των θηλαστικών η διαδικασία της απόπτωσης επιτυγχάνεται μέσω δύο μονοπατιών, της εξωγενούς οδού (death receptor pathway) και της ενδογενούς οδού (stress pathway) (Elmore, 2007; L.R. Kavoussi, 2012).

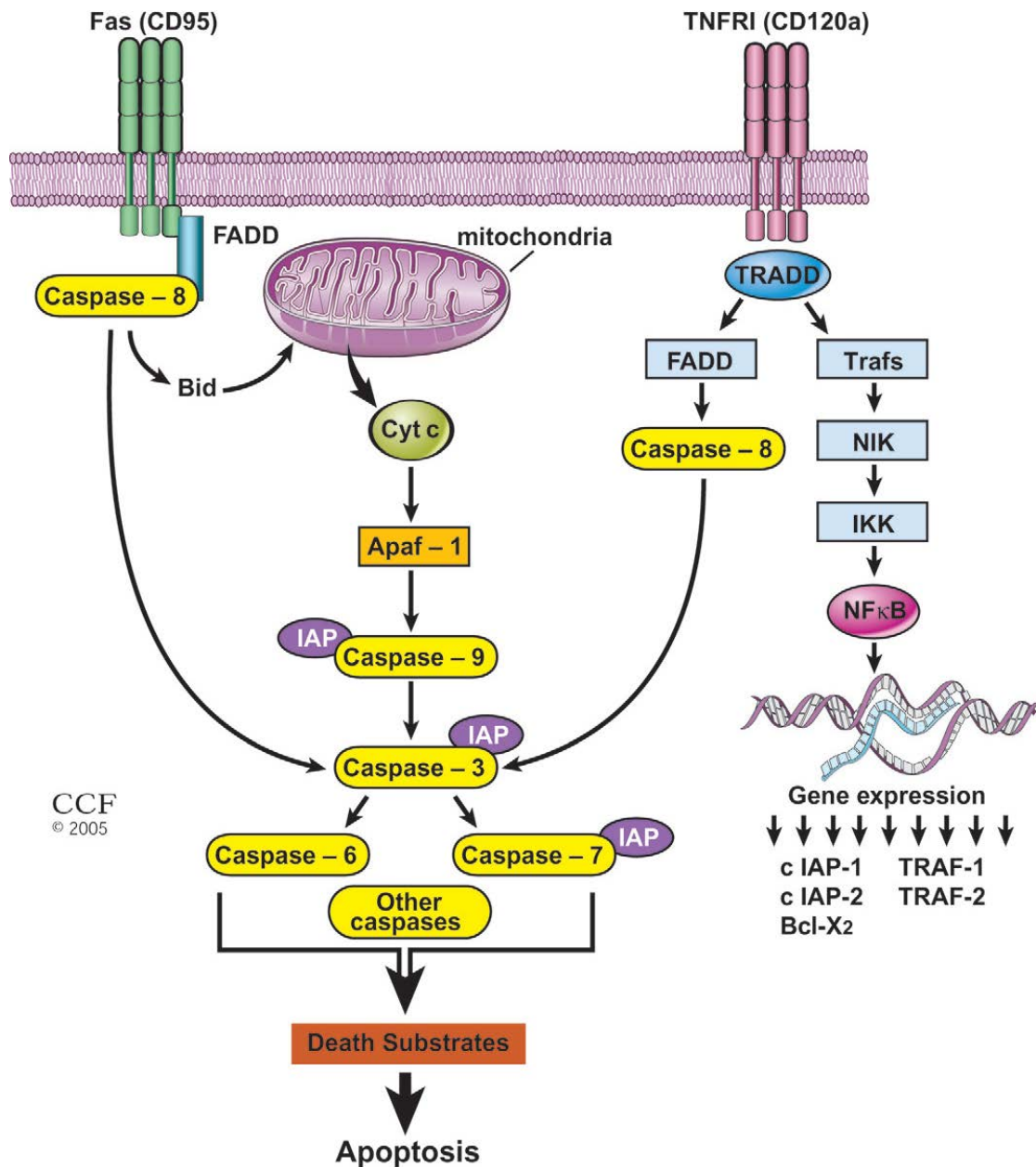
Το πρώτο (εξωγενές ή κυτταροπλασματικό ή εξαρτώμενο από τους υποδοχείς θανάτου) ενεργοποιείται διαμέσου του υποδοχέα θανάτου Fas (CD 95), ο οποίος είναι μέλος της υπερ-οικογένειας υποδοχέων του TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων). Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τους υποδοχείς θανάτου DR3, DR4, DR5, DR6, το σύμπλεγμα Fas και τις κασπάσες 8 και 10 που τελικά ενεργοποιούν τις υπόλοιπες κασπάσες οδηγώντας στην καταστροφή του κυττάρου καθώς αποδομούν εκατοντάδες πρωτεΐνες του.

Ο πιο αναλυτικά μελετημένος υποδοχέας θανάτου είναι ο Fas όπως αντίστοιχα και ο ρόλος του στην ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, όταν ο Fas είναι προσδεδεμένος με τον συνδέτη του FasL (CD 95L), τρία ή περισσότερα μόρια Fas συμπλησιάζουν δημιουργώντας μια θέση σύνδεσης για μια πρωτεΐνη που ονομάζεται FADD (Fas-associated death domain protein). Η πρωτεΐνη αυτή εν συνεχεία δεσμεύει την προκασπάση 8 και το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της τελευταίας δια μέσου ενός συστήματος πρωτεϊνών που καλείται DISC (death-inducing signaling complex). Το μονοπάτι που περιγράφηκε προηγουμένως αναστέλλεται από μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein) και οι οποίες συνδέονται με την προκασπάση 8, αλλά αδυνατούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίησή της.

Διάφοροι ιοί παράγουν τις πρωτεΐνες αυτές και μέσω αυτού του μηχανισμού τα κύτταρα που προσβάλλονται από τους συγκεκριμένους ιούς δεν υφίστανται απόπτωση. Τα παραπάνω φαίνονται στην Εικόνα 3.1, όπου απεικονίζεται η ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης και ο ρόλος του Fas.

Η σηματοδότηση από τον Fas διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των εξαλλαγμένων κυττάρων ή των μολυσμένων από κάποιο ιό και τη μεταφορά

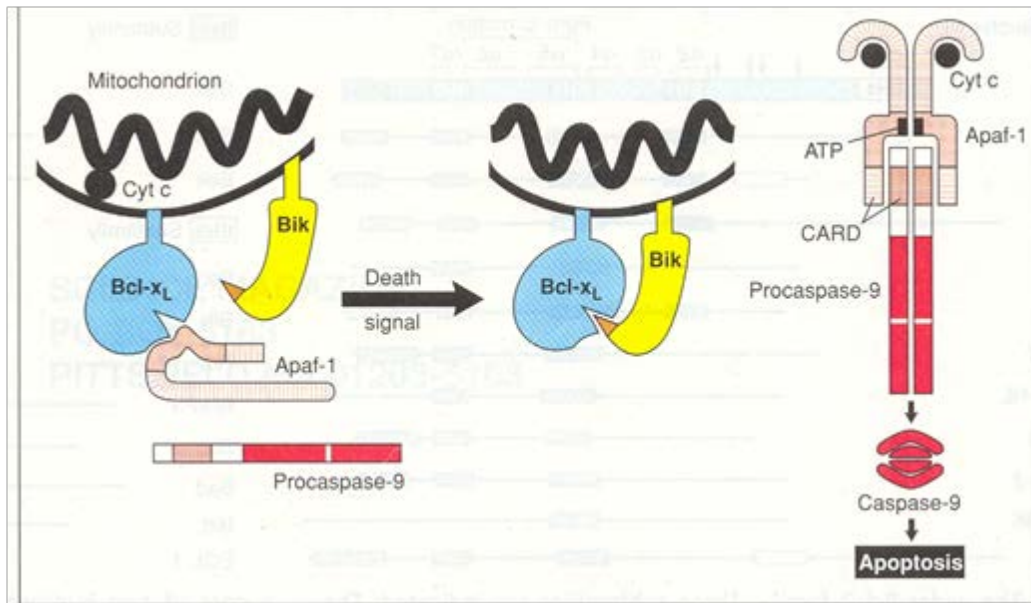
των αυτο-αντιδραστικών λεμφοκυττάρων και για αυτό το λόγο ελαττώματα σε αυτό το μονοπάτι εμπλέκονται σε πολλά κακοήθη και αυτοάνοσα νοσήματα.



Εικόνα 3.1. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του Fas και του TNFR1 που οδηγούν σε απόπτωση. Σύνδεση του Fas με τους συνδέτες έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνδεση της πρωτεΐνης FADD με τις περιοχές θανάτου του υποδοχέα Fas. Η FADD ακολούθως ενεργοποιεί την κασπάση 8 η οποία με τη σειρά της ξεκινά ένα καταρράκτη ενεργοποίησης διαφόρων κινασών. Η κασπάση 8 μπορεί να διασπάσει το μόριο Bid, γεγονός που επάγει την απελευθέρωση του

κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα c συνδέεται με τον Araf-1 ενεργοποιώντας της κασπάση 9, η οποία πυροδοτεί το μονοπάτι απόπτωσης των κασπασών. Ο υποδοχέας TNFR1 μπορεί επίσης αν ενεργοποιηθεί να πυροδοτήσει ένα καταρράκτη θανάτου μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-8. Επίσης πυροδοτεί το μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Ο NFκB ελέγχει την έκφραση πολλών αντιαποπτωτικών γονιδίων (όπως το cIAP), μερικά από τα οποία μπορούν να συνδεθούν και να αναστείλουν τις κασπάσες.

Το δεύτερο μονοπάτι, η ενδογενής οδός ενεργοποιείται από βλάβη στο DNA, από ανεπάρκεια κάποιου αυξητικού παράγοντα ή από ογκογονίδια. Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι αυτό. Αρχίζει με τις πρωτεΐνες BH3 οι οποίες αδρανοποιούν τις BCL-2 πρωτεΐνες, ενώ οι Bax και Bak απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c, που σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης-1 (Araf-1). Το σύμπλεγμα αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί την κασπάση-9, η οποία τελικά πυροδοτεί τις επόμενες κασπάσες (3, 6, 7). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c θεωρείται γεγονός «κλειδί» στην απόπτωση και ρυθμίζεται από γονίδια της BCL-2 οικογένειας, δεδομένου ότι ορισμένα μέλη της (BCL-2, BCL-X1) αναστέλλουν την απόπτωση εμποδίζοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.



Εικόνα 3.2: Απόπτωση μέσω της “ενδογενούς” οδού

Οι δύο οδοί, παρόλο που καταλήγουν στο ίδιο σημείο, είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους με εξαίρεση κάποια κύτταρα (π.χ. ηπατοκύτταρα) όπου συνδέονται μέσω της BH3-only protein Bid (tBid), που μπορεί να συνδεθεί με ομόλογα της BCL-2 και ίσως με την Bax.

Κύριο συστατικό του αποπτωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά, όπου συγκλίνουν, τελικά, τα διάφορα εναρκτήρια ερεθίσματα είναι η οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται κασπάσες. Πρόκειται για πρωτεάσες της κυστεΐνης με χαρακτηριστικό γνώρισμα την ειδικότητα στη διάσπαση πρωτεϊνικού υποστρώματος σε κρίσιμο σημείο του υπολείμματος του ασπαρτικού οξέος (caspase: cysteine-dependent aspartate specific protease). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες θηλαστικών με ποικίλους ρόλους στα φαινόμενα της φλεγμονής και της απόπτωσης (Chang & Yang, 2000). Οι κασπάσες βρίσκονται στα κύτταρα με τη μορφή ανενεργών ζυμογόνων μορφών (προενζύμων). Η ενεργοποίηση των προενζύμων προϋποθέτει πρωτεολυτική διαίρεση/άνοιγμα στο σημείο που συνδέεται η μεγάλη με τη μικρή υπομονάδα και συνένωση αυτών, έτσι ώστε να σχηματίσουν ένα ετεροδιμερές (Villa et al, 1997). Επίσης, συμβαίνει και απόσπαση της αμινο-τελικής ομάδας η οποία, ωστόσο, συνεισφέρει στην ενεργοποίηση και ρύθμιση της λειτουργίας των ενζύμων αυτών. Η ενεργοποίηση γίνεται είτε με τη δράση μίας κασπάσης σε μία άλλη ή με αυτοκατάλυση. Η εξέλιξη

του φαινομένου οδηγεί σε ενεργοποίηση μίας σειράς κασπασών με τρόπο ιεραρχικό.

Οι βασικές αρχές που διέπουν τη διαδικασία της πρωτεόλυσης συνοψίζονται στα εξής:

- Πρόκειται για μία κατάσταση μη αναστρέψιμη. Ο μόνος τρόπος για να “διορθωθεί” μία πρωτεολυμένη πρωτεΐνη είναι να δημιουργηθεί εκ νέου.

-Η πλειοψηφία των πρωτεασών συντίθενται ως πρόδρομες μορφές με μικρή καταλυτική δραστηριότητα.

-Η δράση των κασπασών ανήκει στο πλαίσιο ενός “πρωτεολυτικού καταρράκτη” που χαρακτηρίζεται από τη μετάδοση και ενίσχυση “σημάτων θανάτου”.

-Οι πρωτεάσες μπορούν να ρυθμίσουν την καταλυτική τους δραστηριότητα μέσω του θετικού ή αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού (positive/negative feedback).

-Όπου υπάρχουν πρωτεάσες υπάρχουν και οι αντίστοιχοι αναστολείς.

-Η πρωτεολυτική δραστηριότητα έχει υψηλό δείκτη ειδικότητας και περιορισμένη ομάδα υποστρωμάτων.

Στην απόπτωση οι κασπάσες δρουν είτε ως εναρκτές (initiators) ή ως εκτελεστές (effectors). Φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των κασπασών-εναρκτών ίσως να επιτυγχάνεται με ολιγομερισμό των ενζύμων, ενώ οι κασπάσες-εκτελεστές ενεργοποιούνται από τις κασπάσες-εναρκτές, καθώς και από άλλα ένζυμα. Οι πιο χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της πρώτης ομάδας είναι οι κασπάσες -2, -8 και -10, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι -3, -6 και -7. Η κασπάση-εναρκτής ενεργοποιεί την κασπάση-εκτελεστή η οποία, στη συνέχεια, διασπά πρωτεϊνικά υποστρώματα που είναι υπεύθυνα για μία πλειάδα βιοχημικών και μορφολογικών αλλοιώσεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Cohen, 1997). Επίσης, οι κασπάσες διαιρούνται και σύμφωνα με το μέγεθος της αμινοτελικής τους περιοχής. Έτσι, οι κασπάσες -1, -2, -4, -5, -8, -9 και -10 διαθέτουν μεγάλες περιοχές

ενώ οι -3, -6, -7 και -11 χαρακτηρίζονται από μικρές. Αυτό έχει αντίκτυπο στη λειτουργία τους, αφού οι κασπάσες της πρώτης ομάδας έχουν σημασία κυρίως για την έναρξη και ρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας, ενώ αυτές που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία έχουν ρόλο εκτελεστικό.

3.2.1 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην ενεργοποίηση των προενζύμων/Η οικογένεια Bcl-2

Τα μιτοχόνδρια, τα οργανίδια παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο, θεωρείται ότι διαδραματίζουν σπουδαιότατο ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης (Kluck et al, 1997). Αν και η απόπτωση είναι ανεξάρτητη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (δεν απαιτεί την ύπαρξη μιτοχονδριακού DNA) ο ρόλος των μιτοχονδρίων σε αυτήν είναι σημαντικός.

Αν και οι κασπάσες έχουν χαρακτηριστεί ως τα κύρια μόρια που σηματοδοτούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, η οικογένεια των Bcl-2 ρυθμίζει την απόπτωση σε επίπεδο μιτοχονδρίου. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 20 μέλη στα θηλαστικά. Κατά πολλούς θεωρούνται ο ισχυρότερος ρυθμιστής της απόπτωσης, ο “ροοστάτης” του όλου μηχανισμού. Το Bcl-2 γονίδιο αρχικά αναγνωρίστηκε στο χρωμόσωμα των λεμφοκυττάρων που προκαλούν λέμφωμα της ομόλογης σειράς. Είναι γνωστό, πλέον, ότι ανήκει σε μία οικογένεια γονιδιακών προϊόντων ρυθμιστών της απόπτωσης που αποτελούν είτε ανταγωνιστές-αντιαποπτωτικά μέλη (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-w, Bfl-1, Breg-1, Mcl-1, A1) ή αγωνιστές-προαποπτωτικά μέλη (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Hrk) αυτής. Τα περισσότερα από τα μόρια αυτά εδράζονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω καρβοξυ-τελικών υδρόφοβων μεμβρανοπροσφυσωμένων περιοχών που τους επιτρέπουν να εγκαθίστανται σε αυτές μπορεί να εντοπιστούν, όμως, και στην πυρηνική μεμβράνη ή το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως τα μέλη Bid και Bad. Η αναλογία των ανταγωνιστών προς τους αγωνιστές και ιδιαίτερα ο λόγος Bax/Bcl-2 (Bax-to-Bcl-2 ratio) καθορίζει το αν ένα κύτταρο θα ανταποκριθεί τελικά σε ένα αποπτωτικό ερέθισμα.

Κοινό παρονομαστή στην όλη διαδικασία αποτελεί το κυτόχρωμα-c, μία μιτοχονδριακή αποπτωτική πρωτεΐνη, γνωστή για τη συμμετοχή της στην αναπνευστική αλυσίδα. Η απελευθέρωση αυτής από τα μιτοχόνδρια ρυθμίζεται από διάφορα ερεθίσματα, όπως κυτταροτοξικά φάρμακα, στέρση της δράσης αυξητικών παραγόντων και καταστροφή του DNA. Αποτελεί το “σημείο χωρίς επιστροφή” και δεσμεύει το κύτταρο στο να ακολουθήσει την οδό της απόπτωσης. Είναι, πλέον, γνωστό ότι το κυτόχρωμα-c δεσμεύει την πρωτεΐνη Araf-1 (Apoptosis-Associated Factor-1). Ο Araf-1 διαθέτει μία αμινοτελική CARD (Caspase Recruitment Domain) περιοχή η οποία συνδέεται με την αντίστοιχη CARD περιοχή της προκασπάσης-9. Το σύμπλεγμα που αποτελείται από το κυτόχρωμα-c, τον παράγοντα Araf-1, το ATP/dATP, το μέλος της οικογένειας Bcl-2 (όπως θα δούμε παρακάτω) και την προκασπάση-9 (η οποία, επίσης, απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο) ονομάζεται “αποπτώσωμα” και οδηγεί στην ενεργοποίηση της τελευταίας, με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και άλλων κασπασών-εκτελεστών. Ο ρόλος του κυτοχρώματος-c φαίνεται και από μελέτη η οποία απέδειξε ότι όταν αυτό ενεθεί στο κύτταρο, παρακάμπτοντας δηλαδή τη διαδικασία απελευθέρωσής του από το μιτοχόνδριο, επάγει την απόπτωση με μηχανισμό ανεξάρτητο των κασπασών, με τρόπο, μάλιστα, δόσοεξαρτώμενο.

Η δεύτερη σημαντική ουσία, μαζί με το κυτόχρωμα-c, η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, είναι ο παράγοντας AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Πρόκειται για μία φλαβοπρωτεΐνη με MW 57 KDa. Μεταναστεύει στον κυτταρικό πυρήνα και θεωρείται η πιο σημαντική ουσία που συμμετέχει στην απόπτωσή του δια της συμπύκνωσης της χρωματίνης και του κατακερματισμού του DNA. Η δράση της αυτή είναι ανεξάρτητη από τις κασπάσες. Επιπρόσθετα, δημιουργεί ένα φαύλο κύκλο στην απελευθέρωση ουσιών από το μιτοχόνδριο αφού συμβάλλει στη μείωση του δυναμικού $\Delta\Psi_m$ και στη δημιουργία πόρων. Αναστέλλεται από τον παράγοντα Z-VAD.fmk ο οποίος είναι ένας γενικός αναστολέας των κασπασών. Αυτό έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο AIF είναι, ενδεχομένως, και αυτός μία κασπάση.

Πέρα από την απελευθέρωση πρωτεϊνών ενεργοποίησης των κασπασών, έχουν προταθεί δύο ακόμη μηχανισμοί μέσω των οποίων τα μιτοχόνδρια επάγουν την απόπτωση του κυττάρου:

I) Η διακοπή μεταφοράς ηλεκτρονίων και ενεργειακού μεταβολισμού: Προ πολλών ετών η διακοπή μεταφοράς ηλεκτρονίων αναγνωρίστηκε ως πρώιμο χαρακτηριστικό κυτταρικού θανάτου. Η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να έχει ως αντίκτυπο τη μείωση της παραγωγής του ATP. Παρ' ότι, όμως, η μείωση της παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια θα μπορούσε να θανατώσει ένα κύτταρο, το "σενάριο" αυτό δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πειστικό στην εξήγηση του μηχανισμού της απόπτωσης.

II) Η αλλαγή του οξειδοαναγωγικού (redox: reduction/oxidation) δυναμικού: Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης προκαλείται αύξηση του υπεροξειδίου και υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) είναι ένα σχετικά όψιμο γεγονός στην απόπτωση και προκαλείται, σε κάποιο βαθμό, από τη ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επίσης, επάγεται από τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 αλλά φαίνεται ότι δεν αποτελεί προϋπόθεση για την όλη διαδικασία.

3.2.2 Ο ρόλος άλλων γονιδίων στην απόπτωση

Το γονίδιο p53 και το πρωτο-ογκογονίδιο c-myc διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Όσον αφορά στο p53 έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίησή του μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε δύο καταστάσεις: τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2 καθώς και την απόπτωση (Evan & Littlewood, 1998). Το ποιά κατάσταση θα επικρατήσει εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, το περιβάλλον, καθώς και άλλους παράγοντες όπως η έκφραση ογκογονιδίων. Σε πολλές περιπτώσεις, βέβαια, η τελική κατάληξη είναι ίδια, όπως, για παράδειγμα, συμβαίνει στην "απάντηση" σε μία βλάβη του DNA, όπου η ενεργοποίηση του p53 θα οδηγήσει είτε σε μη αναστρέψιμη διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης ή σε απόπτωση. Για το λόγο αυτό,

άλλωστε, έχει ονομαστεί “φρουρός του γενώματος” (Dragovich et al, 1998). Στόχοι του p53 που αφορούν την επίτευξη της τελευταίας είναι το μόριο Bax καθώς και άλλοι παράγοντες όπως ο IGF-I και ο IGF-BP3 (Evan & Littlewood, 1998). Είναι, επίσης, γνωστό ότι μεταλλάξεις του p53 που προκαλούν αδυναμία της αντίστοιχης πρωτεΐνης να δράσει ανασταλτικά στην κυτταρική ανάπτυξη είναι κοινός παρονομαστής σε πολλές κακοήθειες.

Το c-myc έχει βρεθεί ότι μπορεί να διεγείρει τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση των κυττάρων. Ο δρόμος που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους όπως είναι η παρουσία αυξητικών παραγόντων καθώς και η συγκέντρωση του οξυγόνου. Πρέπει να τονιστεί, επίσης, ότι η απόπτωση που προκαλείται από το c-myc εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία του p53. Έχει φανεί ότι το c-myc αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στη δράση του p53 (Hermeking & Eick, 1994).

3.3 Μέθοδοι ανίχνευσης της απόπτωσης

Καθώς η απόπτωση συμβαίνει μέσω ενός πολύπλοκου σηματοδοτικού καταρράκτη ο οποίος ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα, υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες, ενεργοποιητές, μεσολαβητές ή ρυθμιστές που μπορούν να αξιολογηθούν ώστε να ανιχνευθεί η απόπτωση και να μετρηθούν τα αποπτωτικά κύτταρα. Ωστόσο πολλά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι κοινά με τη νέκρωση και για τούτο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται περισσότερες της μίας μεθόδους ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι συνέπεια απόπτωσης. Η κινητική επίσης της διαδικασίας της απόπτωσης θα πρέπει να κατανοηθεί πριν την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι κασπάσες για παράδειγμα εκφράζονται για μικρό χρονικό διάστημα ενώ τα κύτταρα κυτταρικών καλλιιεργειών θα οδηγηθούν τελικά σε νέκρωση και αυτά που αποπίπτουν πεθαίνουν και απομακρύνονται σχετικά γρήγορα. Έτσι ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν εάν η δοκιμασία ανίχνευσης της απόπτωσης πραγματοποιηθεί πολύ νωρίς ή πολύ αργά μετά το ερέθισμα που θα οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Είναι επίσης γνωστό ότι

απόπτωση συμβαίνει με χαμηλή συχνότητα στους ιστούς και ιδιαίτερα σε συγκεκριμένα τμήματα αυτών, οπότε η αξιολόγηση θα δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα εάν πραγματοποιηθεί σε μεγάλη έκταση.

Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ανίχνευσης της απόπτωσης στοχεύουν στην ανίχνευση:

1. Κυτταρομορφολογικών αλλοιώσεων: Τομές ιστών μπορούν να εξεταστούν με το απλό ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ούτως ώστε να ανιχνευθούν τα αποπτωτικά κύτταρα, των οποίων ωστόσο ο αριθμός θα είναι ελάχιστος λόγω της ταχείας θανάτωσης και απομάκρυνσης των κυτταρικών υπολειμμάτων. Παρότι με το κοινό μικροσκόπιο ανιχνεύονται μόνο τα απώτερα στάδια της απόπτωσης και γι αυτό είναι εξαιρετικά δύσκολη η αξιολόγηση, η transmission electron microscopy (TEM) θεωρείται gold standard καθώς μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης με μειονέκτημα την χρονική διάρκεια και την ανάλυση μικρής κάθε φορά έκτασης.
2. Κατακερματισμού DNA: Η τεχνική DNA laddering επιτρέπει την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων δράσης της ενδονουκλεάσης στο DNA κατά την απόπτωση. Η δοκιμασία απαιτεί την ανάλυση ομογενοποιημένου ιστού και ακολούθως ηλεκτροφόρηση, έχει ευαισθησία 1×10^6 κύτταρα και δεν είναι κατάλληλη για ιστούς με χαμηλό αποπτωτικό δείκτη ενώ δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τα κύτταρα που νεκρώνονται κατά τη διαδικασία προετοιμασίας για την αξιολόγηση. Η μέθοδος TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling), η οποία επίσης ανιχνεύει κατακερματισμένο πυρηνικό DNA σημαίνοντας ενζυματικά τα θραύσματα και επιτρέποντας την ανίχνευση τους είτε με απλή ή φθορίζουσα μικροσκόπηση ή με κυτταρομετρία ροής. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση με ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει εκτεθειμένες μονόκλωνες περιοχές DNA σε αποπτωτικούς πυρήνες εισήχθη από τους Frankfurt κ.α. (Frankfurt, 1994) αρχικά σε φρεσκοκατεψυγμένες τομές ιστών και αργότερα επεκτάθηκε σε τομές παραφίνης (Korkoloroulou et al, 2001). Η τεχνική αυτή κάνει χρήση της μειωμένης σταθερότητας του αποπτωτικού DNA ενάντια στη θερμική αποδόμηση που επάγεται από την πρωτεόλυση των συνδεδεμένων με το DNA πρωτεϊνών κατά την φάση εκτέλεσης της απόπτωσης, όπως αυτή αποδείχτηκε

από την ελάττωση της χρώσης σε τομές ιστών που ανασυστάθηκαν με ιστόνες πριν τη θέρμανση και με ενίσχυση της χρώσης από την επεξεργασία με πρωτεάση. Ωστόσο η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε ιστούς μονιμοποιημένους σε παραφίνη θα πρέπει να γίνεται με προσοχή καθώς η φορμαλδεύδη δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με το DNA και δεν επιτρέπει τη θερμική αποδόμηση και τη σύνδεση με το αντίσωμα σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

3. Κασπασών, υποστρωμάτων, ρυθμιστών και αναστολέων: Περισσότερες από 13 γνωστές κασπάσες, υποστρώματα όπως το PARP, φωσφορυλιωμένες ιστόνες η αναστολείς των κασπασών μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες μεθόδους με τη χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά western, ανοσοκαθίζησης και ανοσοϊστοχημείας. Μέθοδος PCR μικροσυστοιχιών επιτρέπει τη χρήση real-time PCR ούτως ώστε να αναγνωριστεί η έκφραση τουλάχιστον 112 γονιδίων, που εμπλέκονται στην απόπτωση και επομένως την αξιολόγηση του υπό εξέταση ιστού. Επίσης ιεραρχική ανάλυση ομάδων γονιδίων επιτρέπει τη χωρική και χρονική αξιολόγηση της ενεργοποίησης ή καταστολής τους και απαιτεί τη χρήση ελάχιστου ποσού 5ng ολικού RNA.
4. Αλλοιώσεων της κυτταρικής μεμβράνης: Η μετατόπιση των υπολειμμάτων φωσφατιδυλσερίνης στο έξω πέταλο της κυτταρικής μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων επιτρέπει την ανίχνευσή τους μέσω της Annexin V σε ιστούς, έμβρυα ή κυτταρικές καλλιέργειες. Όταν τα αποπτωτικά κύτταρα συνδεθούν με τη σημασμένη με FITC Annexin V μπορούν να αναγνωριστούν με φθορίζουσα μικροσκόπηση. Το πλεονέκτημα είναι η ευαισθησία της μεθόδου ενώ το μειονέκτημα της είναι ότι τα νεκρά κύτταρα σημαίνονται επίσης από τη χρώση. Χρώσεις όπως το propidium iodide και trypan blue που δεν διαπερνούν φυσιολογικά την κυτταρική μεμβράνη και αντιδρούν με το DNA, όταν η μεμβράνη έχει χάσει την ακεραιότητά της θα διακρίνουν τα νεκρά κύτταρα. Η από κοινού χρώση ωστόσο με την Annexin V επιτρέπει την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων που δεν έχουν χάσει την κυτταρική τους μεμβράνη.
5. Ολικών παρασκευασμάτων: Χρώσεις όπως acridine orange (AO), Nile blue sulfate (NBS) και neutral red (NR) λόγω της οξυφιλίας τους συσσωρεύονται σε περιοχές με υψηλή λυσοσωματική και φαγοκυτταρική δραστηριότητα αναγνωρίζοντας

έτσι πιθανά αποπτωτικά κύτταρα χωρίς να διακρίνουν από φαγοκυττάρωση άλλης αιτίας (π.χ. μικροοργανισμών) και για το λόγο αυτό θα πρέπει τα αποτελέσματα τους να επιβεβαιώνονται και με άλλη τεχνική.

6. Μιτοχονδριακών αλλοιώσεων: Αλλοιώσεις σε πρώιμα στάδια του ενδογενούς μονοπατιού ανιχνεύονται με δοκιμασίες των μιτοχονδρίων και του κυτοχρώματος c. Η χρήση Laser scanning confocal microscopy (LSCM) επιτρέπει την παρατήρηση διαφόρων γεγονότων στα μιτοχόνδρια ακέραιων κυττάρων. Η Mitochondrial permeability transition (MPT), η αποπόλωση της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου, η διακίνηση ιόντων Ca^{2+} , το μιτοχονδριακό οξειδοαναγωγικό status και οι ελευθερες δραστικές ρίζες O_2 μπορούν να αξιολογηθούν με τη μέθοδο αυτή

3.4 Απόπτωση και σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια δυναμική και συγχρονισμένη διαδικασία διαφοροποίησης και ωρίμανσης των αρχέγονων σπερματογονίων σε ώριμα σπερματοζωάρια, η οποία λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάκια του όρχεως. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μιτωτική διαίρεση των σπερματογονίων και τη διαφοροποίησή τους σε σπερματοκύτταρα που ακολουθείται από το σχηματισμό των σπερματίδων και των ώριμων σπερματοζωαρίων. Όπως σε διάφορους ιστούς στον ανθρώπινο οργανισμό, ο αριθμός των γενετικών κυττάρων εντός των σπερματικών σωληναρίων καθορίζεται από τη δυναμική ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Τόσο ο προγραμματισμένος όσο και ο θάνατος των κυττάρων που επάγεται από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (ελάττωση των ενδοορχικών ανδρογόνων ή γοναδοτροπινών, Sertoli cell τοξικών ουσιών, χημειοθεραπευτικών παραγόντων κ.α.) συμβαίνει μέσω της απόπτωσης (Aitken & Baker, 2013; Shaha et al, 2010; P. Αγγελοπουλου, 2000).

3.4.1 Απόπτωση των γεννητικών κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη

Τα αρχέγονα κύτταρα προέρχονται από την εμβρυική επιβλάστη και τελικά μεταναστεύουν στην αναπτυσσόμενη γονάδα. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρείται απόπτωση των κυττάρων που ακολουθούν «λανθασμένη» οδό. Η περίσσεια των κυττάρων, που προκύπτουν από τη διαδικασία αυτή αποπίπτουν μέσω διαδικασίας εξαρτώμενης κυρίως από τα μόρια Bcl-xL και Bax. Όταν τα σπερματοκύτταρα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια, φάσεις αυξημένης απόπτωσης παρατηρούνται, γνωστές ως πρώτο κύμα της σπερματογένεσης. Σε επίμυες και μύες το γεγονός αυτό λαμβάνει χώρα μεταξύ 10 και 30 ημέρων μετά τη γέννηση. Στο πρώτο αυτό κύμα συμμετέχουν οι κασπάσες 2, 3, 8 και 9 υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τόσο του ενδογενούς όσο και του εξωγενούς μονοπατιού. Διαταραχή της απόπτωσης μέσω της λειτουργική αναστολής των βασικών μεσολαβητών αυτής της διαδικασίας οδηγεί σε υπογονιμότητα λόγω της ανισορροπίας γεννητικών κυττάρων και κυττάρων Sertoli (Rodriguez et al, 1997).

Οι Beaumont και Mandl περιγράφουν τρία εκφυλιστικά κύματα των γεννητικών κυττάρων στο αρσενικό κατά την περιγεννητική περίοδο και ένα στο θηλυκό, κατά την περίοδο έναρξης της μείωσης. Σε αρουραίους το πρώτο παρατηρείται μεταξύ 20ής και 21ης ημέρας της κύησης και ακολουθεί επανενεργοποίηση του μιτωτικού μηχανισμού, με αποτέλεσμα στις 21,5 ημέρες να αυξάνεται ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων. Ακολουθεί δεύτερο αποπτωτικό κύμα στις 22 ημέρες της κύησης, ακριβώς πριν από τη γέννηση, ενώ μία ακόμη αύξηση παρατηρείται μετά τη γέννηση και ακολουθείται από το τρίτο αποπτωτικό κύμα.

Ένα, ακόμη, εκφυλιστικό κύμα παρατηρείται στα σπερματογόνια πριν από την ήβη και ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι είναι απαραίτητο για την έναρξη της σπερματογένεσης, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι η εκφύλιση των σπερματογονίων είναι συνεχής, διαρκεί όλη τη ζωή του αρσενικού και παρουσιάζει εξάρσεις σε ορισμένες περιόδους. Ένα μέρος των σπερματογονίων B και των σπερματοκυττάρων χάνεται,

με απόπτωση, προκειμένου να διατηρηθεί σταθερός ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων που θα εισέλθουν στη μείωση και να δημιουργηθεί η άριστη αναλογία γεννητικών κυττάρων προς κύτταρα Sertoli.

3.4.2 Απόπτωση των γεννητικών κυττάρων στον όρχι

Στην ενήλικη ζωή, η απόπτωση παίζει και πάλι σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. Η απόπτωση χρησιμοποιείται ως μηχανισμός για την απομάκρυνση κατεστραμμένων γεννητικών κυττάρων από τα σπερματικά σωληνάκια, έτσι ώστε να μην συνεχίσει τη διαφοροποίηση προς σπερματοζωάρια. Η εκλεκτική καταστροφή των γεννητικών κυττάρων που παρουσιάζουν βλάβες είναι σαφώς ένα κρίσιμο συστατικό των μηχανισμών που χρησιμοποιούνται για την προστασία του γονιδιώματος ενός συγκεκριμένου είδους. Το εύρος των ερεθισμάτων που βλάπτουν τα αναπτυσσόμενα γεννητικά κύτταρα είναι εντυπωσιακά ευρύ περιλαμβάνοντας διάφορες μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, περιβαλλοντικές τοξικές ουσίες, βαρέα μέταλλα και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Επιπλέον γενετικές διαταραχές των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, όπως η υπερέκφραση του SPATA 17 ή της φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης (androgen binding protein) ή η καταστολή κύριων γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σπερματογένεσης όπως η gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH)/DDX25, η Jmjd1a demethylase, η πρωτεΐνη Crem ή διάφορα μόρια chaperones αυξάνουν τα παρατηρούμενα επίπεδα απόπτωσης στα άρρενα γεννητικά κύτταρα. Ομοίως η ενδοκρινική διαταραχή της σπερματογένεσης μέσω της επαγωγής του διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη (Tsounari et al, 2012) ή έκθεση σε οιστρογόνα στην ενήλικη ζωή και όχι στην ενδομήτριο οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης στα αρσενικά γεννητικά κύτταρα (Chimento et al, 2010). Η εντύπωση που δίνεται είναι ότι αν σπερματογένεση διακοπεί με οποιοδήποτε τρόπο, στη συνέχεια τα βλαστικά κύτταρα έχουν την τάση να οδηγούνται σε απόπτωση. Το στάδιο της σπερματογένεσης, όπου επάγεται η απόπτωση φαίνεται να είναι κατά κύριο λόγο στο στάδιο της παχυταινίας και το σύστημα Fas / FasL φαίνεται να είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της διαδικασίας αυτής. Η εγγενής

ευαισθησία των αρρένων βλαστικών κυττάρων στην απόπτωση επεκτείνεται επίσης στους όγκους γεννητικών κυττάρων των όρχεων, η οποία τα καθιστά ευαίσθητα στη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως η σισπλατίνη (Spierings et al, 2003).

Η απόπτωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης στην ενήλικη ζωή έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της παρατήρησης υπερβολικά υψηλών συγκεντρώσεων αποπτωτικών κυττάρων στους όρχεις υπογόνιμων ανδρών, που υπογραμμίζει το ρόλο της στην παθοφυσιολογία της ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας. Επιπλέον, στα ώριμα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ασθενών έχουν ανιχνευθεί αποπτωτικοί δείκτες συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της κασπάσης και της φωσφατιδυλοσερίνης (Aitken et al, 2011). Καθώς η απόπτωση στα ώριμα σπερματοζωάρια φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην υπογονιμότητα συνδεδεμένη με τα υψηλά επίπεδα βλάβης του γενωμικού DNA, είναι η πτυχή αυτή της αποπτωτικής διαδικασίας που θα αναλυθεί περαιτέρω. Η μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων έδειξε σημαντική αύξηση της απόπτωσης σε ασθενείς με υποσπερματογένεση ή διακοπή της σπερματογένεσης, είτε στο στάδιο του σπερματοκυττάρου, είτε στο στάδιο της σπερματίδας.

3.4.3 Ορμονικός έλεγχος της απόπτωσης και της επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων

Είναι γνωστός ο καθοριστικός ρόλος των γοναδοτροπινών, των ανδρογόνων και της hCG στην επιβίωση των γεννητικών κυττάρων (Shaha et al, 2010; Sofikitis et al, 2008; P. Αγγελοπουλου, 2000). Η υποφυσεκτομή ή η εξουδετέρωση των γοναδοτροπινών στην κυκλοφορία αυξάνουν την εκφύλιση των γεννητικών κυττάρων και προκαλούν, επίσης, μορφολογικές αλλαγές στο σωματικό κυτταρικό στοιχείο του όρχι. Η έλλειψη της LH οδηγεί σε απόπτωση των σπερματοκυττάρων στα στάδια της παχυταινίας και των στρογγυλών σπερματίδων, ενώ η στέρηση της FSH προκαλεί απόπτωση των σπερματογονίων και των σπερματοκυττάρων στο στάδιο της παχυταινίας. Τα κύτταρα Sertoli έχουν υποδοχείς για την FSH και την

τεστοστερόνη, που είναι οι κύριοι ρυθμιστές της σπερματογένεσης. Κατά την ωρίμανση των σπερματικών σωληναρίων η τεστοστερόνη και η συνεργική δράση της οιστραδιόλης με την FSH προάγει την επιβίωση των γεννητικών κυττάρων ενώ η οιστραδιόλη έχει από μόνη της ανασταλτική αντιαποπτωτική δράση. Έχει δειχτεί ότι τόσο το εξωγενές όσο και το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιούνται στα γεννητικά κύτταρα μετά την ελάττωση των επιπέδων FSH και τεστοστερόνης. Συνεπώς, οι δύο ορμόνες διατηρούν την ομοιοστασία της σπερματογένεσης αναστέλλοντας τα σήματα θανάτου των γεννητικών κυττάρων (Pareek et al, 2007). Περίσσεια τεστοστερόνης μετά την εξωγενή χορήγηση testosterone undecanoate οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω αύξησης της έκφρασης του Fas/FasL στον όρχι με χρονοεξαρτώμενο τρόπο φτάνοντας τα μέγιστα επίπεδα 30 μέρες μετά την χορήγηση (Zhou et al, 2001). Αντίθετα η απόσυρση της τεστοστερόνης ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κασπάσης και επάγει τον κατακερματισμό του DNA στα κύτταρα Sertoli με ασθενή επίδραση στα γεννητικά κύτταρα.

Τα τελευταία χρόνια συσσωρεύεται βιβλιογραφία που υποστηρίζει την αναγκαιότητα των οιστρογόνων για τη σπερματογένεση δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσής τους στον όρχι (Hess, 2003). Καθώς οιστρογονικοί υποδοχείς υπάρχουν τόσο στην υπόφυση και στα γεννητικά κύτταρα χημικές ουσίες με οιστρογονική δράση μπορούν να έχουν δράση αγωνιστών ή ανταγωνιστών της ορμόνης (ενδοκρινικοί διαταράκτες – endocrine disruptors) και διαταραχή της γονιμότητας. Στα περισσότερα σπερματοκύτταρα η έκφραση του υποδοχέα β των οιστρογόνων έχει καταγραφεί. Η χορήγηση οιστρογόνων σε πειραματόζωα κατά την νεογνική περίοδο ή την ενήλικη ζωή μπορεί να επηρεάσει τη σπερματογένεση (McGlynn et al, 2008). Τόσο in vitro όσο και in vivo μελέτες αποδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα επάγουν την απόπτωση μέσω υπερέκφρασης του συμπλέγματος Fas/FasL ενώ το μεσολαβούμενο από το FasL σήμα μπορεί να επηρεάσει διαφορετικές γενιές των σπερματικών κυττάρων (Mishra & Shaha, 2005; Nair & Shaha, 2003).

3.4.4 Απόπτωση και επιβίωση των σπερματοζωαρίων

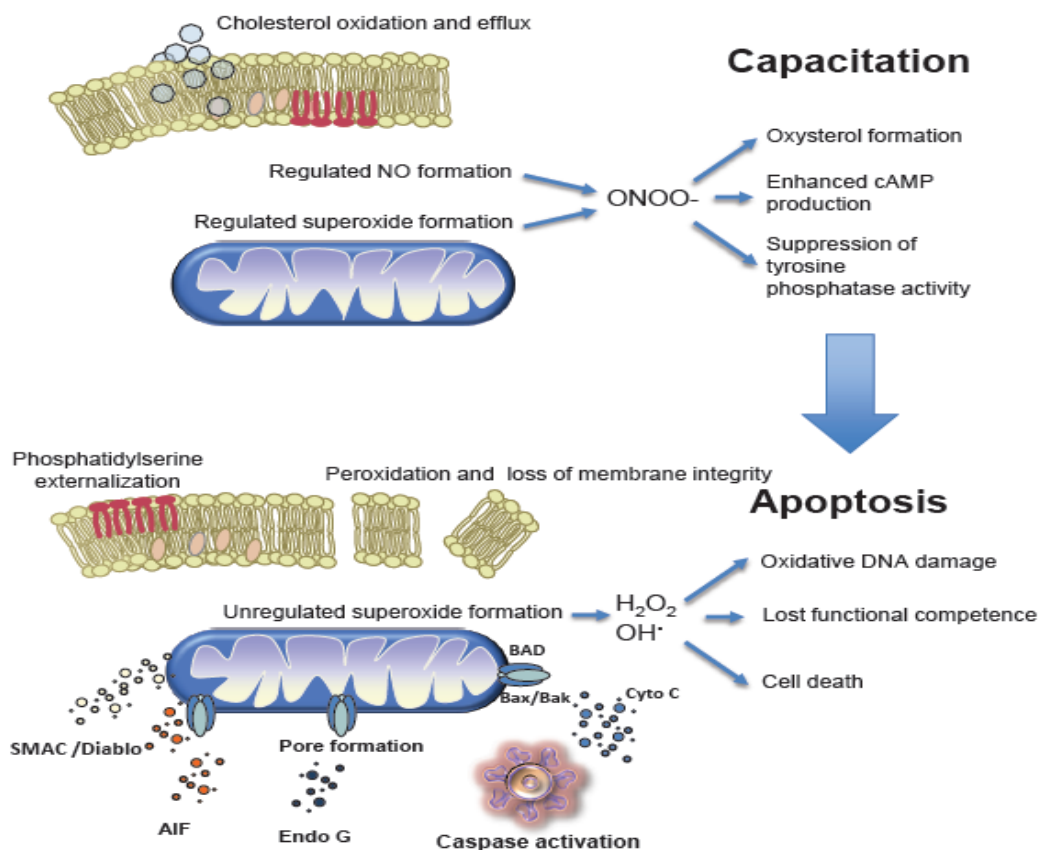
Ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό της απόπτωσης στα ώριμα σπερματοζωάρια είναι ότι αυτή η διαδικασία αντιπροσωπεύει μία προεπιλεγμένη διεργασία για το κύτταρο. Πράγματι, είναι η μοίρα του κάθε σπερματοζωαρίου στο σπερματικό υγρό να υποβληθεί σε αποπτωτικό θάνατο εκτός από τα λίγα σπερματοζωάρια που επιτυγχάνουν την αθανασία με την γονιμοποίηση των ωαρίων. Για τα περισσότερα σπερματοζωάρια η απόπτωση δεν επάγεται αλλά είναι ένα αυθόρμητο αποτέλεσμα της έντονης προσπάθειάς τους να φτάσουν στο ωάριο και να συμμετάσχουν στη διαδικασία της γονιμοποίησης. Όταν σπερματοζωάρια εγχέονται στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα δεν είναι ικανά να αναγνωρίσουν το έμβρυο ή έτοιμα να δεσμευτούν στον καταρράκτη των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων που θα κορυφωθεί με τη γονιμοποίηση. Πριν συμβεί η γονιμοποίηση αυτά τα κύτταρα πρέπει να υποβληθούν σε μια διαδικασία ωρίμανσης εντός του γυναικείου γεννητικού συστήματος, η οποία είναι γνωστή ως «ενεργοποίηση - capacitation». Αυτή η διαδικασία επιτρέπει στα σπερματοζωάρια να ενορχηστρώσουν την σύνθεση και την έκφραση μιας πολύπλοκης σειράς υποδοχέων στην επιφάνειά τους για τη διαφανή ζώνη (zona pellucida). Επιπλέον, η ενεργοποίηση συνδέεται με την έκφραση μιας εξαιρετικά εξειδικευμένης μορφής κινητικότητας που είναι γνωστή ως «υπερενεργοποίηση», η οποία επιτρέπει στα σπερματοζωάρια να αποκτήσουν τις αναγκαίες προωθητικές δυνάμεις ούτως ώστε να αποκολληθούν από το επιθήλιο που επενδύει τον αυλό του γεννητικού σωλήνα και να διεισδύσουν στα περιβλήματα του ωαρίου.

Η χημική βάση της διαδικασίας ενεργοποίησης του σπέρματος εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο μελέτης αλλά είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την απώλεια της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη και μια ευρεία αύξηση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης ιδίως στην ουρά των σπερματοζωαρίων υπό την επίδραση της cAMP. Όλη αυτή η διαδικασία φαίνεται να ρυθμίζεται από το οξειδοαναγωγικό status και εξαρτάται από την παραγωγή μικρών ποσών ROS από τα σπερματοζωάρια μέσω αντιδράσεων που ενεργοποιούν το μονοπάτι φωσφορυλίωσης τυροσίνης που οδηγεί στην ενεργοποίηση του σπέρματος. Οι ROS

που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης επίσης οξειδώνουν τη χοληστερόλη επάγοντας την ταυτόχρονη ενεργοποίηση ενός συστήματος μεταφοράς της χοληστερόλης από την επιφάνεια του σπέρματος (Boerke et al, 2013). Η εξάλειψη της χοληστερόλης από την μεμβράνη των σπερματοζωαρίων μέσω αυτών των μηχανισμών αυξάνει τη ρευστότητα του σπέρματος και με τον τρόπο αυτό διευκολύνει τη γονιμοποίηση που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διαδικασίες σύντηξης μεμβρανών.

Η συνεχής παραγωγή ROS από τα σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της capacitation υπερσχύει σταδιακά των περιορισμένων αμυντικών ικανοτήτων του σπέρματος και δημιουργεί μια κατάσταση οξειδωτικού στρες που με τη σειρά της ενεργοποιεί το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης (Aitken et al, 2011) (Εικόνα 3.3). Έτσι, η απόπτωση στα σπερματοζωάρια δεν ενεργοποιείται στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα, αλλά μάλλον αντιπροσωπεύει μια μορφή της προγραμματισμένης διαδικασίας ωρίμανσης. Ο λόγος ύπαρξης ενός τόσο προσεκτικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να σχετίζεται με την αλληλεπίδραση μεταξύ σπερματοζωαρίων και του ανοσοποιητικού συστήματος. Τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, τα σπερματοζωάρια θεωρούνται ως ξένα κύτταρα που είναι δυνητικά ανοσογόνα και ικανά να προκαλέσουν χυμική και κυτταρική ανοσολογική απόκριση. Όταν τα σπερματοζωάρια γηράσκουν είναι κρίσιμο να απομακρύνονται με μια φαγοκυτταρική διαδικασία που είναι “σιωπηλή”, υπό την έννοια ότι δεν θα πρέπει να εκκρίνονται προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Αν αυτό δεν συνέβαινε, η ανοσολογική απόκριση θα οδηγούσε στην επαγωγή ανοσίας έναντι αντιγόνων των σπερματοζωαρίων και στειρότητα (Koppers et al, 2011). Σε άλλα κυτταρικά συστήματα όπου παρατηρείται σιωπηλή φαγοκυττάρωση, όπως στην απομάκρυνση των ουδετερόφιλων από τα μακροφάγα κατά τη διάρκεια της μεταφλεγμονώδους ιστικής αναγέννησης, η έκφραση των αποπτωτικών δεικτών, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη, στη μεμβράνη των κυττάρων στόχων είναι κρίσιμη στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης. Με τη δέσμευσή τους σε οργανωμένο κυτταρικό θάνατο που παρουσιάζει πολλά από τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης τα ετοιμοθάνατα σπερματοζωάρια εξασφαλίζουν ότι μπορούν να απομακρυνθούν

αποτελεσματικά από το αρσενικό ή θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα χωρίς να ενεργοποιηθεί βλαβερή φλεγμονώδη απόκριση. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα όπου εκατοντάδες εκατομμύρια σπερματοζωαρίων πρέπει να απομακρυνθούν με φαγοκυττάρωση τις αμέσως επόμενες ώρες μετά τη γονιμοποίηση.



Εικόνα 3.3 Ενεργοποίηση (capacitation) και απόπτωση στα σπερματοζωάρια θηλαστικών. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης η παραγωγή των ROS, ιδιαίτερα ONOO^- οδηγεί σε παραγωγή oxysterol, η οποία διευκολύνει την απομάκρυνση της χοληστερόλης και μια επακόλουθη αύξηση στη ρευστότητα της μεμβράνης, καθώς και άλλες αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της φωσφατάσης της τυροσίνης και την αύξηση της παραγωγής cAMP. Όλες αυτές οι αλλαγές προωθούν την ενεργοποίηση. Εάν η γονιμοποίηση δεν συμβεί τότε η συνέχιση της παραγωγής oxysterol και αλδεϋδών λιπιδίων οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από αυξημένη μιτοχονδριακή παραγωγή υπεροξειδίου, λιπιδική υπεροξείδωση, απελευθέρωση κυτοχρώματος C,

ενεργοποίηση κασπάσης, εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, οξειδωτική βλάβη του DNA και τελικά θάνατο

3.4.5 Η προστασία των σπερματοζωαρίων από την αποπτωτική διαδικασία

Η υψηλή διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων έχει συνέπειες για τη μορφή που παίρνει τελικά η απόπτωση. Ο άνθρωπος είναι το μοναδικό μεταξύ των θηλαστικών, όπου δεν υπάρχει συμπεριφορά οίστρου για να εξασφαλιστεί ότι η γονιμοποίηση θα είναι συγχρονισμένη με την ωορρηξία. Ως αποτέλεσμα τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια μπορεί να χρειαστεί να επιβιώσουν για μία εβδομάδα στο θηλυκό γεννητικό σε κατάσταση αναμονής έως ότου συμβεί η ωορρηξία. Η παρατεταμένη τους επιβίωση εξαρτάται από την παρουσία παραγόντων όπως η προλακτίνη ή η ινσουλίνη στα υγρά του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Οι παράγοντες αυτοί με τη σειρά τους εξασκούν την αντιαποπτωτική τους δράση επάγοντας την ενεργοποίηση ρυθμιστικών ενζύμων, όπως η phosphatidylinositide 3-kinase (PI3 kinase) που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3), που είναι γνωστό ως PIP3.

Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, το οποίο καθορίζει τον έλεγχο της απόπτωσης σε αυτό τον τύπο κυττάρων, είναι το υψηλό επίπεδο διαμερισματοποίησης τους. Έτσι, μελέτη με ένα αντίσωμα έναντι της καταλυτικής υπομονάδας p100 kD της PI3κινάσης αποκαλύπτει ότι το ένζυμο αυτό βρίσκεται στο κύριο κομμάτι της ουράς των σπερματοζωαρίων, τον αυχένα και το ακρόσωμα αλλά όχι στη μεσότητα, όπου τα μιτοχόνδρια και τα υπολείμματα του κυτταροπλάσματος εντοπίζονται. Στα περισσότερα κύτταρα η ικανότητα της κινάσης PI3 να παράγει PIP3 είναι σε δυναμική ισορροπία με μια φωσφατάση που ρυθμίζει αρνητικά τη βιοδιαθεσιμότητα αυτής της φωσφατιδυλοϊνοσιτιδής καταλύοντας την αποφωσφορυλίωση της στην αντίστοιχη διφωσφορική PIP2 (PtdIns(4,5)P2). Αυτή η φωσφατάση είναι γνωστή ως phosphatase and tensin homolog (PTEN). Ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές ανίχνευσης του PTEN δίνει ένα πολύ ασθενές σήμα κυρίως στην ενδιάμεση περιοχή των

σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, ένα αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης, σταθερής μορφής του ενζύμου αυτού (pSer380) έδειξε ότι η πλειοψηφία του PTEN σε σπερματοζωάρια υπάρχει σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση και είναι εντοπισμένη στο ισημερινό τμήμα της κεφαλής των γαμετών διαχωριζόμενη πλήρως από την PI3 κινάση στον αυχένα, την ουρά ή το ακρόσωμα. Αυτή η φυσική διάκριση της PI3κινάσης και της φωσφορυλιωμένης PTEN εμφανίζεται μόνο σε σπερματοζωάρια και χρησιμεύει για να εξασφαλίζεται ότι η πρώτη είναι εντελώς ελεύθερη να δημιουργήσει PIP3 χωρίς οποιαδήποτε παρεμβολή από τη δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN.

Η PIP3 παράγεται από τη δέσμευση της ενεργοποιημένης PI3 κινάσης σε άλλη κινάση σερίνης/ θρεονίνης, AKT και διευκολύνει τη μεταφορά του προς την μεμβράνη του πλάσματος, όπου καθίσταται φωσφορυλιωμένη. Η φωσφορυλιωμένη AKT είναι κατόπιν υπεύθυνη για την ενεργοποίηση μιας σειράς αντιδράσεων από έναν καταρράκτη οι οποίες εξασφαλίζουν ότι τα σπερματοζωάρια δεν γηράσκουν και η απόπτωση αναστέλλεται. Δύο από τις τρεις κύριες ισομορφές της AKT που εκφράζονται στους όρχεις είναι η AKT1 (RAC α serine/threonine-protein kinase), ένας αναγνωρισμένος αναστολέας της απόπτωσης και η AKT2 (RAC- β serine/threonine πρωτεΐνης κινάσης), ένα σημαντικό συστατικό του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η AKT1 είναι παρούσα σε όλη την έκταση της ουράς των σπερματοζωαρίων, και ιδιαίτερα στη μεσότητα των κυττάρων, όπου οι αποφάσεις περαιτέρω διαφοροποίησης ή θανάτου για τα σπερματοζωάρια «λαμβάνονται». Η AKT2 είναι επίσης έντονα παρούσα στο ενδιάμεσο τμήμα των σπερματοζωαρίων και σε μικρότερο βαθμό στο εγγύς κύριο τμήμα. Ωστόσο, σε αντίθεση με την AKT1, το αντίσωμα έναντι της AKT2 δημιουργεί πολύ ισχυρή χρώση στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων, ιδιαίτερα στην περιοχή του ακροσώματος. Οι ενεργοποιημένες, φωσφορυλιωμένες μορφές αυτής της κινάσης συμπεριλαμβανομένων των pThr34 AKT (παρούσα στην AKT1 αλλά όχι AKT2), καθώς και της pThr308-, pSer473- και pSer124-AKT (τόσο στην AKT1 όσο και στην AKT2) έχουν επίσης ανιχνευθεί σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Είναι ενδιαφέρον ότι όλα τα αντισώματα εμφάνισαν

ισχυρή χρώση στο ενδιάμεσο τμήμα των σπερματοζωαρίων, σε στενή γειτνίαση με τα μιτοχόνδρια του σπέρματος .

Στη μεσότητα των σπερματοζωαρίων ο ρόλος της φωσφορυλιωμένης AKT είναι η πρόληψη της απόπτωσης . Ένας από τους τρόπους με τους οποίους αυτό επιτυγχάνεται είναι η διατήρηση του προ-αποπτωτικού παράγοντα, BAD, σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση. Χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή της BAD (pSer99), αυτή η μετα-μεταφραστικά τροποποιημένη πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί στο ενδιάμεσο τμήμα και την ουρά των σπερματοζωαρίων υγιών ατόμων.

3.4.6 Το οξειδωτικό stress και η απόπτωση στα σπερματοζωάρια.

Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε ROS. Η κύρια πηγή ROS είναι η αλυσίδα μεταφορά ηλεκτρονίων στην εσωτερική επιφάνεια της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Φυσιολογικά επίπεδα ROS είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών ενεργοποίησης και της αντίδρασης ακροσώματος. Ένα από τα πρώτα σημάδια ότι η απόπτωση έχει ενεργοποιηθεί με wortmannin είναι μια ξαφνική αύξηση στην παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων (Aitken & Curry, 2011). Η ενεργοποίηση δημιουργίας από τα μιτοχόνδρια δραστικών ριζών οξυγόνου δεν συνδέεται με οποιαδήποτε άμεση αλλαγή στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Koppers et al, 2011) αν και τελικά τα σπερματοζωάρια εισέρχονται σε ένα προχωρημένο στάδιο της διαδικασίας γήρανσης και αρχίζουν να χάνουν τη βιωσιμότητά τους. Μία από τις σημαντικότερες αιτίες της παρατεταμένης δημιουργίας ROS από τα μιτοχόνδρια στα σπερματοζωάρια που εισέρχονται σε φάση απόπτωσης, συνιστά η διάσπαση της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων από ηλεκτρονιόφιλες αλδεΐδες που παράγονται ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Έτσι, το αρχικό ερέθισμα για την ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού καταρράκτη θα μπορούσε , όσο και αν δείχνει περίεργο, να είναι η επαγωγή ήπιου οξειδωτικού stress. Το τελευταίο θα μπορούσε να προκύψει από

διάφορες οδούς που οδηγούν σε πτωχή αντιοξειδωτική προστασία εντός του ανδρικού ή γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, ως αποτέλεσμα είτε διατροφικών διαταραχών, γήρανσης, κισσοκήλης, συντήρησης του σπέρματος σε χαμηλές θερμοκρασίες, έκθεσης στο σύγχρονο τρόπο ζωής, σε φαρμακευτικές ουσίες, σε βακτήρια, ή λόγω παρατεταμένης επώασης *in vitro* ή *in vivo* και σε μια σειρά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία κ.α. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συγκλίνουν στην παραγωγή οξειδωτικού stress στο σπέρμα. Μία από τις αναπόφευκτες συνέπειες του οξειδωτικού stress στα σπερματοζωάρια είναι η ενίσχυση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει επειδή τα σπερματοζωάρια είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στη δράση των ελεύθερων ριζών O_2 ενώ η συγκέντρωση των ενζύμων που παρέχουν αντιοξειδωτική δράση είναι μικρή στο ούτως ή άλλως περιορισμένο κυτταρόπλασμά τους.

Μια σημαντική συνέπεια αυτής της ιδιότητας των πλούσιων σε λιπίδια μεμβρανών των μιτοχονδρίων των σπερματοζωαρίων είναι η επαγωγή της μιτοχονδριακής δημιουργίας ROS. Η παραγωγή ROS από τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια προκαλείται από το οξειδωτικό stress σε βρόχο θετικής αυτοανάδρασης οξειδοαναγωγής (du Plessis et al, 2010). Ως αποτέλεσμα της θετικής ανάδρασης, όταν μια κατάσταση οξειδωτικού stress έχει δημιουργηθεί στα σπερματοζωάρια, θα είναι πολύ δύσκολο να αντιστραφεί. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι επίσης σύμφωνη με την σύνδεση που έχει καταγραφεί μεταξύ της ελαττωματικής λειτουργίας των σπερματοζωαρίων και της αυξημένης παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια του σπέρματος (Koppers et al, 2008). Η απόπτωση στα σπερματοζωάρια των θηλαστικών μπορεί να είναι ένα προϊόν της ROS-επαγόμενης παραγωγής ROS συνεπώς, όπως έχει παρατηρηθεί σε άλλα κυτταρικά συστήματα.

Το οξειδωτικό stress λοιπόν κυρίως ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης ενώ έχει βρεθεί ότι σε ποσοστό 30–80% των υπογόνιμων ανδρών υπάρχει σύνδεση με τη δράση των ROS (Shekarriz et al, 1995). Οι ROS πέρα από την επαγωγή της απόπτωσης και τη βλάβη της μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, που με τη σειρά της επηρεάζει την κινητικότητα και την ικανότητα σύντηξης με τα ωοκύτταρα, μπορούν να βλάψουν απευθείας το γαμετικό DNA συμβάλλοντας έτσι

στην υπογονιμότητα. Η κύρια πηγή της βλάβης του DNA εντοπίζεται στην ανώμαλη συμπύκνωση της χρωματίνης. Εάν δεν σχηματιστεί το σωστό σύμπλεγμα των χρωματινών με το γαμετικό DNA, τότε το DNA καθίσταται ευαίσθητο να υποστεί βλάβη από ROS ή νουκλεάσες με συνέπεια τον κατακερματισμό του DNA που συνήθως ανιχνεύεται σαν αποτέλεσμα δράσης των ROS.

3.4.7 Διαταραχή της κινητικότητας του σπέρματος

Ο σχηματισμός προϊόντων λιποξειδωσης με τις πρωτεΐνες του σπέρματος είναι πιθανώς υπεύθυνος για ένα άλλο ουσιώδες χαρακτηριστικό του αποπτωτικού καταρράκτη στα σπερματοκύτταρα, την απώλεια της κινητικότητας τους. Αυτή η απώλεια προκύπτει κατά πάσα πιθανότητα, λόγω της ικανότητας των λιπιδίων να τροποποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν την κίνηση των σπερματοζωαρίων (Hughes et al, 2009). Έχει γίνει επίσης γνωστό ότι αλκυλιωτικοί παράγοντες όπως η βενζοκινόνη μπορεί να έχει μια ταχεία δράση ακινητοποίησης στα σπερματοζωάρια των θηλαστικών, επειδή σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με βασικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ρύθμιση της δραστηριότητας των μαστιγίων. Μολονότι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι ικανοί να ενεργοποιούν το σχηματισμό ROS, ιδιαίτερα από τα μιτοχόνδρια, η δραστηριότητα αυτή καθαυτή δεν είναι υπεύθυνη για την ξαφνική διακοπή της κίνησης του σπέρματος. Αλκυλιωτικοί παράγοντες που δεν έχουν καμία ανάμειξη σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπως η bismaleimide, έχουν τη δυνατότητα να ακινητοποιήσουν άμεσα τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια (Aitken et al, 2006; Hughes et al, 2009), ενώ δραστικές ουσίες όπως το αραχιδονικό οξύ, που διεγείρουν τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, αλλά δεν κατέχουν αλκυλιωτική δραστηριότητα απαιτούν σημαντικά περισσότερο χρόνο για να αναστείλουν την κίνηση αυτών των κυττάρων (Aitken et al, 2006). Όποιος και αν είναι ο θεμελιώδης μηχανισμός που εμπλέκεται, αυτή η απώλεια της κινητικότητας κατά τα πρώτα στάδια της απόπτωσης εξασφαλίζει ότι τα εν λόγω ελαττωματικά σπερματοζωάρια δεν θα συμμετάσχουν στη διαδικασία της γονιμοποίησης.

3.4.8 Δείκτες της απόπτωσης στα σπερματοζωάρια

Μετά την ενεργοποίηση σύνθεσης ROS από τα μιτοχόνδρια και την καταστολή της κινητικότητας, τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν πολλούς δείκτες της απόπτωσης συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της κασπάσης και έκκρισης φωσφατιδυλοσερίνης. Εάν η έναρξη της απόπτωσης είναι συγχρονισμένη μετά τη χορήγηση worthmannin τότε η ενεργοποίηση της κασπάσης μπορεί να προηγηθεί της έκκρισης φωσφατιδυλοσερίνης. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η ενεργοποίηση της κασπάσης είναι πιθανώς αποτέλεσμα της διάνοιξης πόρων από τα μιτοχόνδρια και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Ο μιτοχονδριακός σχηματισμός πόρων και η ενεργοποίηση της κασπάσης με τη σειρά τους προωθούν την ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών οι οποίες είτε απελευθερώνονται από τις μιτοχονδριακές μεμβράνες (Apoptosis Inducing Factor, mitochondrion-associated [AIFM] ή endonuclease G [EndoG]) ή ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα (Caspase Activated DNase; CAD), πριν την μετατόπιση στον πυρήνα. Αυτή η δράση της endonuclease α που σχετίζεται με την απόπτωση έχει προταθεί ως μηχανισμός βλάβης του DNA, που σχετίζεται με την εμφάνιση των TUNEL θετικών σημάτων σε ελαττωματικά σπερματοζωάρια.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η βιοιατρική έρευνα στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στα διάφορα ζωικά πρότυπα για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας πολύπλοκων ανθρώπινων διαταραχών, το σχεδιασμό και τη δοκιμή θεραπευτικών παρεμβάσεων. Ως ζωικό πρότυπο θεωρείται το είδος του ζώου, στο οποίο μια αυθόρμητη ή προκλητή παθολογική κατάσταση μπορεί να ερευνηθεί και η οποία ομοιάζει στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό στην αντίστοιχη κατάσταση στον άνθρωπο. Μεταξύ των διαφόρων πλεονεκτημάτων της χρήσης τρωκτικών ως ζωικά πρότυπα ανθρώπινων ασθενειών, το πιο σημαντικό είναι η έντονη ομοιότητά τους προς τον άνθρωπο στην ανατομία, τη φυσιολογία και το γενετικό υλικό. Έτσι ζωικά πρότυπα παρέχουν αξιόπιστη εναλλακτική για πειραματισμό και συγκεκριμένα τα ποντίκια και οι αρουραίοι (67 % και 21% αντίστοιχα των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων σήμερα) είναι τα πλέον συχνά χρησιμοποιούμενα ζωικά μοντέλα στην μελέτη της αναπαραγωγικής βιολογίας (Jamsai & O'Bryan, 2011) και της παθοφυσιολογίας των προστατικών διαταραχών (Valkenburg & Williams, 2011) λόγω του μικρού τους αναπαραγωγικού κύκλου, του μεγάλου αριθμού απογόνων ανά γέννα και του σχετικά χαμηλού κόστους απόκτησης και συντήρησης. Είναι συνεπώς ένα αποδοτικό και οικονομικό εργαλείο για την επιτάχυνση της έρευνας και την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Όσον αφορά τις προστατικές διαταραχές ευρεία είναι η χρήση των κυτταρικών σειρών, από τις οποίες έχουν εξαχθεί χρήσιμα συμπεράσματα για τις γενετικές αλλαγές που μετατρέπουν τα φυσιολογικά προστατικά κύτταρα σε καρκινικά (Valkenburg & Williams, 2011). Καρκίνος του προστάτη και ΚΥΠ εμφανίζεται μόνο σε σκύλους, των οποίων η χρήση στην έρευνα είναι περιορισμένη λόγω του μεγάλου χρόνου εκδήλωσης της νεοπλασίας, της διάρκειας ζωής των ζώων, του υψηλού κόστους και τις ενδείξεις μη εξαρτώμενης από τα ανδρογόνα καρκινογένεσης. Έτσι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης προτύπου προστατικής

νεοπλασίας σε γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια, η πάνω από 95% ομοιότητα του γονιδιώματος με τον άνθρωπο και η ευκολία γενετικών χειρισμών, τα κατέστησε τα πλέον συχνά χρησιμοποιούμενα στην έρευνα των προστατικών ασθενειών. Δεν θα πρέπει ωστόσο να αγνοούνται πέραν από τις ανατομικές και ιστολογικές διαφορές με τον άνθρωπο, οι ιδιαιτερότητες των τρωκτικών και κυρίως η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης σποραδικών νεοπλαστικών διαταραχών στο ποντίκι (Shappell et al, 2004). Οποιαδήποτε συνεπώς νεοπλαστική διαταραχή παρατηρείται είναι άμεση συνέπεια είτε των χειρισμών στα πειραματόζωα (ανοσολογικοί ή ορμονικοί) ή γενετικών τροποποιήσεων.

Είναι γνωστή η δυσκολία προτυποποίησης της ΚΥΠ σε πειραματόζωα λόγω της μειωμένης συχνότητας υπερπλαστικών διαταραχών (Scolnik et al, 1994). Οι σκύλοι και τα θηλαστικά είναι τα μόνα ζώα που παρουσιάζουν συμπτωματική ΚΥΠ λόγω της ύπαρξης «κάψας» η οποία περιβάλλει τον αδένα με συνέπεια την απόφραξη της ουρήθρας σαν συνέπεια του αυξημένου μεγέθους του προστάτη. Διάφορες μελέτες ωστόσο σε τρωκτικά έχουν επιτρέψει τη συσχέτιση των διατροφικών παραγόντων με τις υπερπλαστικές προστατικές διαταραχές (Escobar et al, 2009; Ploumidou et al, 2010). Πιο πρόσφατα οι Nicholson κ συν. (Nicholson et al, 2012) έδειξαν ότι αρσενικά ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε Τεστοστερόνη και 17β-Οιστραδιόλη παρουσίασαν ένα σύμπλεγμα συμπτωμάτων από το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα που μοιάζουν με αυτά που παρατηρούνται στον άνθρωπο, συγκεκριμένα απόφραξη της κύστης, διόγκωση του προστάτη, υπερπλασία των αδενίων και κυστική δυσλειτουργία. Το συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο θα μπορούσε συνεπώς να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας, της εξέλιξης και της θεραπείας της ΚΥΠ.

Δεδομένης της πολυπαραγοντικής αιτιοπαθογένειας της ανδρικής υπογονιμότητας, η όλη αναπαραγωγική διαδικασία δεν μπορεί να μελετηθεί αναλυτικά *in vitro* (Jamsai & O'Bryan, 2010). Η εκτεταμένη μελέτη γενετικά τροποποιημένων ποντικών οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ανακάλυψη πληθώρας γονιδίων που επηρεάζουν τη σπερματογένεση, την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, την ενεργοποίηση και τη γονιμοποίηση. Ωστόσο αντικρουόμενα είναι τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για την επίδραση της παχυσαρκίας στη

σπερματογένεση και διάφορες μελέτες έχουν πρόσφατα προσπαθήσει σε παχύσαρκα πειραματόζωα είτε ως αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που προδιαθέτουν σε παχυσαρκία ή διατροφικών χειρισμών που αυξάνουν το σωματικό βάρος να αναδείξουν τις συνέπειες στη γονιμότητα. Η χρήση των C57BL6 ποντικών πρόσφατα επέτρεψε την διερεύνηση των επιπτώσεων της προκαλούμενης από τη διατροφή παχυσαρκίας στη σπερματογένεση χωρίς τη συμμετοχή του ΣΔ, ο οποίος είναι γνωστός για τη βλαβερή του δράση στο σπέρμα (Ghanayem et al, 2010). Αυξημένο οξειδωτικό stress, αυξημένα επίπεδα κατακερματισμένου DNA και μειωμένη γονιμότητα (Bakos et al, 2011) με απογόνους που έχουν αναπτυξιακή διαταραχή και μειωμένη διάρκεια ζωής παρατηρήθηκε ενώ η μειωμένη γονιμότητα κληρονομείται και στους απογόνους και των δύο φύλων επηρεάζοντας 2 επόμενες γενεές.

4.1 Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας των όρχεων μυός

Τόσο στους μύες όσο και στους ανθρώπους, αμφότεροι οι όρχεις βρίσκονται εντός του οσχέου αλλά στον ποντικό σε αντίθεση με τον άνθρωπο οι όρχεις επικοινωνούν με την κοιλιακή κοιλότητα δια του βουβωνικού καναλιού, το οποίο παραμένει ανοικτό σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Συνήθως μετά την ευθανασία οι όρχεις ανευρίσκονται στην κοιλιακή κοιλότητα. Ο βουβωνικός πόρος καταλαμβάνεται από το λίπος του σώματος της επιδιδυμίδας όταν οι όρχεις βρίσκονται εντός του οσχέου. Όταν εισέρχονται στην κοιλιακή κοιλότητα οι όρχεις περιβάλλονται από την επιδιδυμίδα και λίπος.

Οι όρχεις περιβάλλονται από τον ινώδη χιτώνα (tunica albuginea) και τον ελυτροειδή χιτώνα (tunica vaginalis), που επενδύει την εσωτερική επιφάνεια του οσχέου. Στους ποντικούς η μεγάλη μάζα του όρχεως συνίσταται από εσπειραμένα σπερματικά σωληνάρια και διάμεσο ιστό πλούσιο σε κύτταρα Leydig. Παράγουν και απελευθερώνουν τους άρρενες γαμέτες, τα σπερματοζωάρια ενώ τα διάμεσα κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν ορμόνες (το στεροειδές του άρρενος, την τεστοστερόνη). Τα σπερματικά σωληνάρια είναι αρκετά εσπειραμένα και συνεπώς

περισσότερες της μίας εγκάρσιες τομές κάθε σωληναρίου θα αναγνωρίζονται σε διατομή ορχικού ιστού.

Τα σπερματικά σωληνάρια φαίνονται στο μικροσκόπιο ως κυκλικές ή ελλειψοειδείς τομές. Κάθε σωληνάριο αφορίζεται από βασική μεμβράνη που το διαχωρίζει από τα παρακείμενα τριχοειδή αγγεία, από τα περισωληναριακά (μυοειδή) κύτταρα και από τα κύτταρα Leydig. Τα κύτταρα Leydig είναι σωματικά κύτταρα που βρίσκονται στο διάμεσο ιστό, παράγουν την τεστοστερόνη, δράση η οποία ρυθμίζεται από την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) που εκκρίνεται από την υπόφυση. Στο εσωτερικό των σωληναρίων βρίσκονται τα κύτταρα Sertoli και τα άωρα γεννητικά κύτταρα, τα σπερματογόνια. Καθώς τα σπερματογόνια διαιρούνται και αναπτύσσονται ξεκινώντας από την περιφέρεια των σωληναρίων, σχηματίζουν κάτω από αυτά στήλες από ωριμάζοντα σπερματικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, η οποία στους μύες κρατά 33-35 μέρες, τα σπερματικά κύτταρα διέρχονται από 12 στάδια, τα οποία θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε πρώιμα (μακρές σπερματίδες είναι γενικά κοντά στην βασική μεμβράνη), σε μέσα (επιμήκεις σπερματίδες πλησιάζουν την επιφάνεια του αυλού και/ή πλησιάζουν την απελευθέρωση-Στάδιο VII), και σε όψιμα (Στάδιο VIII-XII-απουσία επιμήκων σπερματίδων) (Meistrich & Hess, 2013).

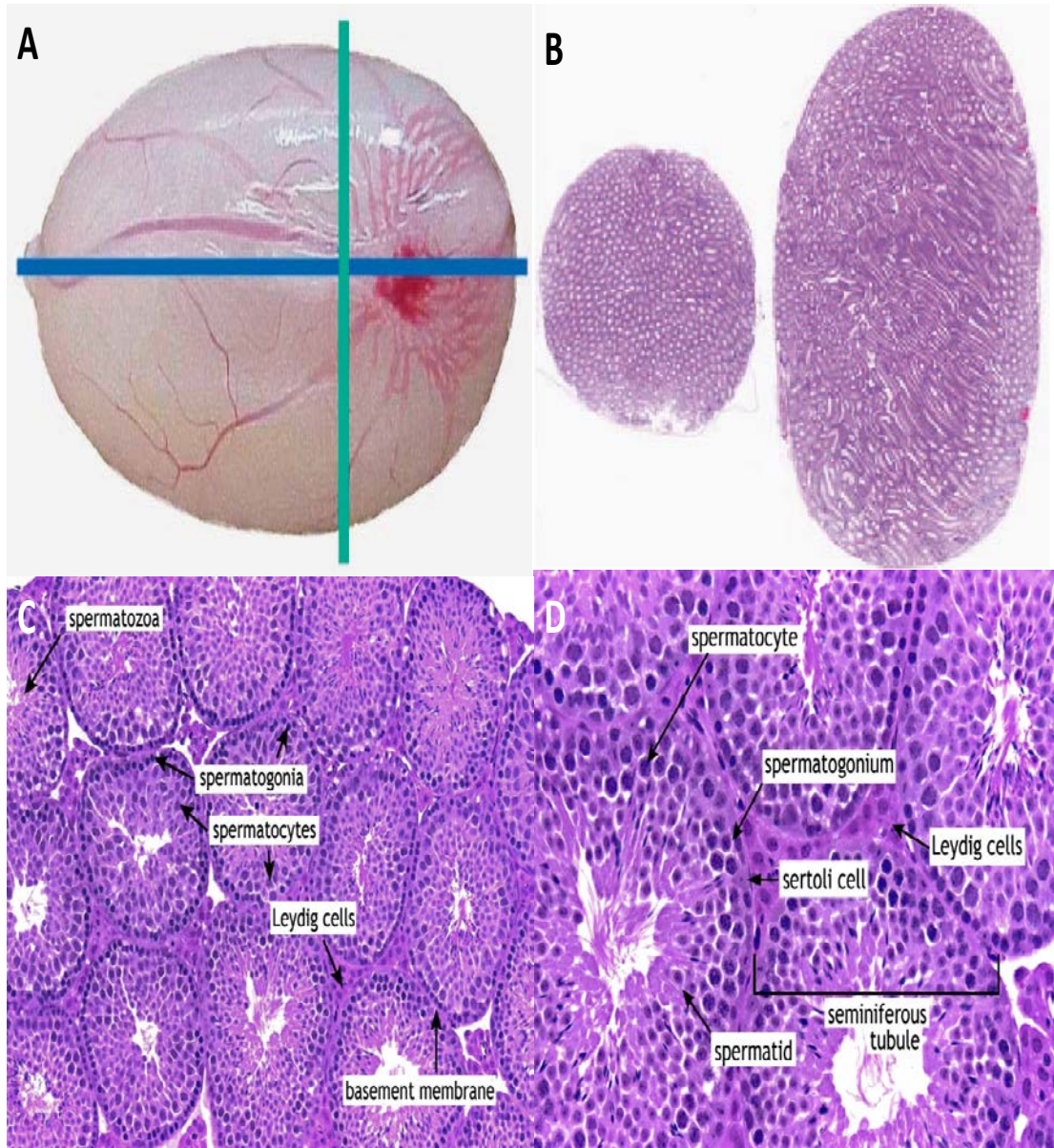
Αρχικά αναγνωρίζονται τα σπερματογόνια, με υποστρόγγυλο σχήμα και σφαιρικό πυρήνα, που βρίσκονται πολύ κοντά ή σχεδόν σε επαφή με τη βασική μεμβράνη, που εντοπίζεται ακριβώς μέσα από τον ινώδη χιτώνα. Ενώ μερικά σπερματογόνια παραμένουν προγονικά, άλλα μετά από μιτωτικές διαιρέσεις γίνονται πρωτογενή σπερματοκύτταρα ή σπερματοκύτταρα Α τάξης, τα οποία είναι ογκωδέστερα των σπερματογονίων και βρίσκονται σε μεγαλύτερο βάθος στο σπερματικό σωληνάριο. Με την πρώτη διαίρεση της μείωσης, τα σπερματοκύτταρα Α τάξης παράγουν δευτερογενή σπερματοκύτταρα ή σπερματοκύτταρα Β τάξης που είναι πολύ μικρότερα των πρωτογενών, η χρονική διάρκεια της ζωής τους είναι πολύ περιορισμένη και τα οποία με τη δεύτερη διαίρεση της μείωσης παράγουν τις σπερματίδες. Οι σπερματίδες είναι μικρά στρογγυλά κύτταρα με στρογγυλό πυρήνα, που διατάσσονται σε 3-4 σειρές κοντά στον αυλό του σωληναρίου και μέσω δεσμοσυνάψεων βρίσκονται σε επαφή με τα κύτταρα Sertoli. Τέλος, με μια

διεργασία μεταμόρφωσης των απλοειδών σπερματίδων που ονομάζεται σπερμιογένεση παράγονται τα σπερματοζωάρια. Τα σπερματοζωάρια εντοπίζονται πολύ κοντά στον αυλό ή μέσα σε αυτόν ως πολύ επιμηκυμένα κύτταρα στα οποία αρχίζει να διακρίνεται η ουρά. Οι στήλες αυτές με τα ωριμάζοντα σπερματικά κύτταρα βρίσκονται μεταξύ δύο παρακείμενων κυττάρων Sertoli, καθένα από τα οποία εκτείνεται από τη βασική μεμβράνη μέχρι τον αυλό.

Τα κύτταρα Sertoli είναι σωματικά κύτταρα που εκτείνονται από τα τοιχώματα προς το κέντρο των σπερματικών σωληναρίων. Προσδιορίζουν το ρυθμό της σπερματογένεσης ελέγχοντας το ρυθμό μετατόπισης των σπερματοκυττάρων από τη βασική μεμβράνη προς το κέντρο του σπερματοφόρου σωληνίσκου. Τα σπερματοκύτταρα είναι βυθισμένα μέσα στις κοιλότητες που σχηματίζονται από τις αναδιπλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων Sertoli σε καθορισμένη αλληλουχία και μετατοπίζονται κατά μήκος των κυττάρων Sertoli με αποικοδόμηση και ανοικοδόμηση των συνδέσεών τους με αυτά τα κύτταρα και με αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli παράγουν την ορμόνη κατά των πόρων του Muller (AMH) έχοντας έτσι σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του αναπαραγωγικού συστήματος του άρρενος. Επίσης, τα κύτταρα Sertoli απελευθερώνουν την δεσμευτική των ορομονών του φύλου σφαιρίνη (ABP) υπό την επίδραση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH). Λόγω της ABP τα κύτταρα Sertoli δεσμεύουν την τεστοστερόνη και εν συνεχεία η δεσμευμένη τεστοστερόνη συντηρεί την σπερματογένεση.

Τα σπερματικά σωληνάρια σχηματίζουν αγκύλες στα δύο τους άκρα που επικοινωνούν με τα ευθέα σωληνάρια (recti tubuli) και καταλήγουν στο δίκτυο του rete testis, και μέσω αυτών στο αποχετευτικό σύστημα των απαγωγών σωληναρίων και τελικά στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Το μεσαύλιο του όρχεως βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον ινώδη χιτώνα του όρχεως (tunica albuginea). Ο ινώδης χιτώνας είναι μία μεμβράνη πυκνού συνδετικού ιστού που περιβάλλει τον όρχι και συνέχεια με τα μεσολόβια διαφράγματα στον ανθρώπινο όρχι. Το αγγειακό δίκτυο βρίσκεται φυσιολογικά στην κάψα εγγύς του rete testis και βοηθά στην αναγνώρισή του. Τα tubuli recti και τα ευθέα σωληνάρια καλύπτονται από απλό κυβοειδές

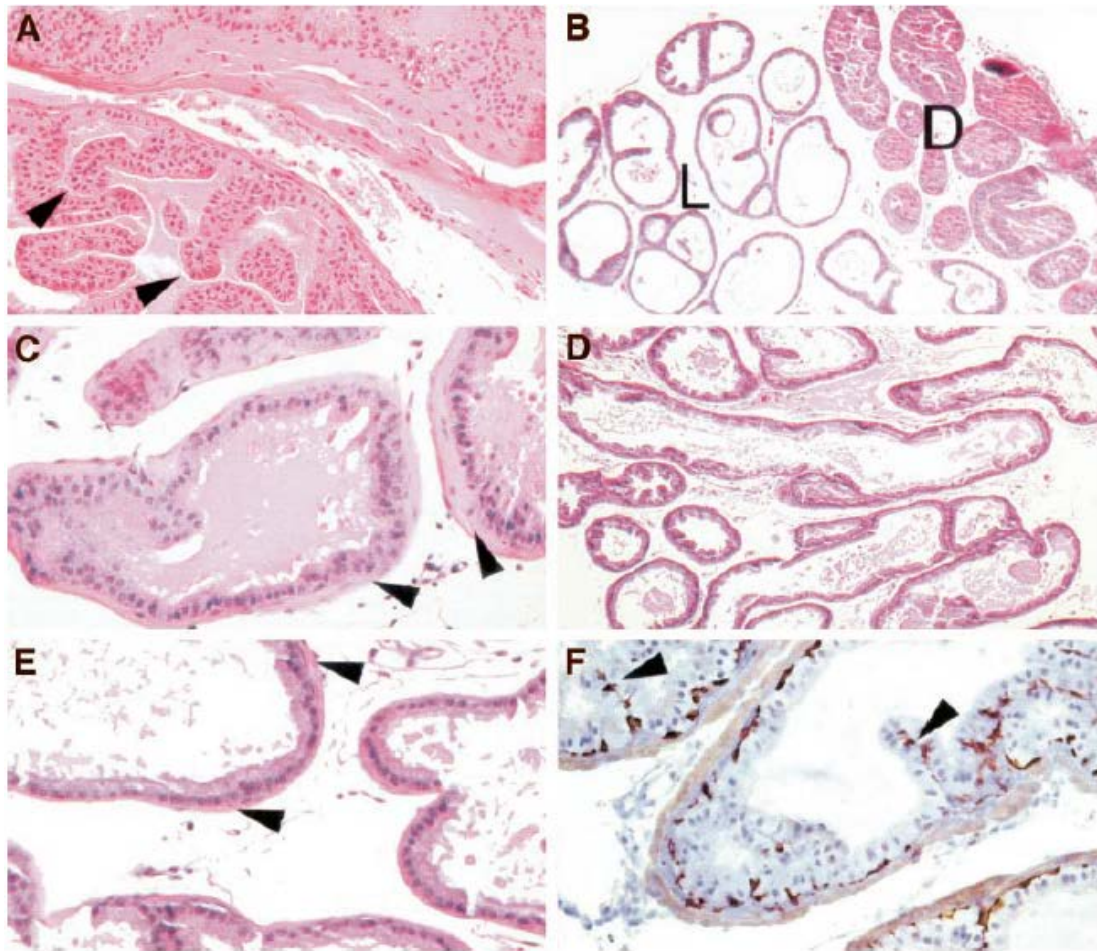
επιθήλιο χωρίς τη συμμετοχή του σπερματικού επιθηλίου και δε θα πρέπει να θεωρούνται εσφαλμένα ατροφικά ή μη φυσιολογικά σπερματικά σωληνάρια.



Εικόνα 4.1 Ιστολογία όρχεως ποντικού. **A** Παρασκεύασμα όρχεως. Οι έντονες γραμμές δείχνουν το επίπεδο επιμήκους και εγκάρσιας διατομής **B** Εγκάρσια διατομή αριστερά και επιμήκης δεξιά **Γ** Τομή όρχεως στην οποία φαίνονται τα σπερματικά σωληνάρια και ο διάμεσος ιστός με τα κύτταρα που τα συναποτελούν (20x μεγέθυνση) **Δ** Τομή όρχεως που επιτρέπει τη διάκριση των διαφορετικών φάσεων της σπερματογένεσης στο σπερματικό σωληνάριο (40x μεγέθυνση)

4.2 Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας προστάτου μυός

Συνιστά ένα περίπλοκο σύστημα πόρων οι οποίοι εκτείνονται από την ουρήθρα έως τον άπω αδένα και το μέγεθος του είναι μεγάλο σε σχέση με το σώμα του ζώου. Αποτελείται από κυψελοειδή αδένια και πόρους που περιβάλλονται από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Κάθε αδένιο περιβάλλεται από μία στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Σε αντίθεση με τον άνθρωπο, ο προστάτης των τρωκτικών χωρίζεται σε διακριτούς ανατομικά λοβούς. Ο προστάτης των ποντικών αποτελείται από τον πρόσθιο προστάτη (Anterior Prostate) ή πηκτικό αδένα, τον κοιλιακό προστάτη (Ventral Prostate) και τους ραχιαίους και πλάγιους λοβούς, οι οποίοι συνήθως περιγράφονται μαζί ως πλαγιο-ραχιαίος λοβός (DorsoLateral Prostate) (Εικόνα 4.2). Οι λοβοί περιβάλλονται από μία κάψα η οποία συμβάλλει στη διαμόρφωση των πόρων και, κατ' επέκταση, του ίδιου του λοβού. Έχει μεσοθηλιακή προέλευση και δεν είναι πάντοτε μακροσκοπικά ορατή αλλά σε μικροσκοπικό επίπεδο είναι πάντα διακριτή. Κάθε λοβός ξεχωριστά αποτελείται από ένα δίκτυο αδενίων και πόρων, που απολήγουν τυφλά. Μεταξύ του αδενικού στοιχείου του προστάτη και της κάψας παρεμβάλλεται συνδετικολιπώδης ιστός, ο οποίος περιέχει τα μείζονα αγγεία, νεύρα και γάγγλια. Σε κάθε ένα λοβό τα επιμέρους αδένια περιβάλλονται από λεπτό ινομυώδες στρώμα, που συνίσταται από λίγες στιβάδες spindle κυττάρων ανοσοθετικών για ακτίνη λείων μυϊκών ινών διάσπαρτων ανάμεσα σε ηωσινοφιλικό κολλαγόνο (Εικόνα 4.2, **A–F**). Το άφθονο πυκνό ινομυώδες στρώμα που περιβάλλει τον ανθρώπινο προστάτη δεν υπάρχει στον ποντικό. Υπάρχουν συνεπώς ουσιαστικές διαφορές στην ανατομία του προστάτη μεταξύ ανθρώπου και τρωκτικών.



Εικόνα 4.2 Ιστολογία προστάτου ποντικού. Α, Πρόσθιος Προστάτης ενήλικου φυσιολογικού (wild-type) ποντικού. Παρουσιάζει την πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική πόρων σε σύγκριση με άλλους λοβούς, με συχνές πτυχώσεις του βλεννογόνου που προβάλλουν στον αυλό των αδενίων (βέλη) Β, Ραχιαίος (D) και πλάγιος (L) λοβός προστάτη ενήλικου, φυσιολογικού (wild-type) ποντικού. Λεπτό ινομυώδες στρώμα και περιφερικότερα αυτού χαλαρός συνδετικός ιστός περιβάλλει τα αδένια τόσο στον πλάγιο όσο και στο ραχιαίο λοβό. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στο πάχος των επιθηλιακών κυττάρων και της διαμέτρου του αυλού των πόρων καθώς και η αυξημένη ποσότητα ηωσινοφιλικού εκκρίματος στο εσωτερικό των αδενίων στο ραχιαίο λοβό σε σύγκριση με τον πλάγιο.

Γ, Υψηλή μεγέθυνση διατομής ραχιαίου λοβού. Σημειώνεται το λεπτό ινομυώδες στρώμα που περιβάλλει τα επιμέρους αδένια (βέλη). Χαμηλής (Δ) και υψηλής (Ε) μεγέθυνσης διατομές κοιλιακού προστάτη. Σε αντίθεση με τον ανθρώπινο προστάτη με τη μεγάλη αναλογία ινομυώδους στρώματος με δυνατότητα συσταλτικότητας μικρή ποσότητα στρώματος περιβάλλει τα αδένια στον κοιλιακό λοβό. Ζ, Χρώση με υψηλού μοριακού βάρους κυτταροκερατίνη (CK5) διακρίνει καλώς αφοριζόμενη βασική στιβάδα κυττάρων που περιβάλλει περιμετρικά τον αυλό και επεκτείνεται στις φυσιολογικές μικρού ύψους βλεννογονικές πτυχώσεις (βέλη).

Οι πόροι του προστάτη του μυός δομικά είναι παρόμοιοι, ανεξάρτητα από το λοβό από τον οποίο προέρχονται. Είναι εσπειραμένοι, λεπτοί και μακροί και καλύπτονται από κυλινδρικό βασεόφιλο επιθήλιο, ενώ κάποια τμήματα επενδύονται από κυβοειδές επιθήλιο. Τα αδένια σε κάθε λοβό του προστάτη του ποντικού αποτελούνται από τους ίδιους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως και στον άνθρωπο, τα εκκριτικά κύτταρα, τα κύτταρα της βασικής στιβάδας και ένα μικρό αριθμό νευροενδοκρινών κυττάρων. Στον ποντικό όπως και στον άνθρωπο, η βασική στιβάδα κυττάρων δεν είναι ορατή στο απλό μικροσκόπιο και προηγούμενες μελέτες υποστήριζαν την απουσία αυτού του υποπληθυσμού κυττάρων. Αντισώματα έναντι της υψηλού μοριακού βάρους κερατίνης HMWCK (66 kDa and 57 kDa), που αναγνωρίζει τη βασική στιβάδα κυττάρων σε καλοήγη υπερπλασία ανθρώπινου προστάτη, δεν διακρίνει την ίδια φαινοτυπικά ομάδα κυττάρων σε φυσιολογικούς ποντικούς. Ωστόσο όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αντισώματα, διακριτή βασική στιβάδα αναγνωρίστηκε. Επίσης ανοσοχρώση για τη chromogranin (CG) διέκρινε πολύ μικρό πληθυσμό ανοσοφαινοτυπικά νευροενδοκρινικών στον προστάτη φυσιολογικού ποντικού

Αναλυτικά, η μορφολογία των λοβών και των πόρων του προστάτη του ενήλικα ποντικού έχει ως εξής:

α) Κοιλιακός λοβός: Το βάρος του αντιστοιχεί, περίπου στο μισό του συνολικού βάρους του προστάτη του ποντικού. Συνιστά ζεύγος δεξιού και αριστερού κοιλιακού λοβού. Τα αδένια διαθέτουν βασεόφιλο κυλινδρικό επιθήλιο με κάποια κυβοειδή κύτταρα, ο πυρήνας των οποίων βρίσκεται στη βάση τους, στον αυλό δε των περισσοτέρων από αυτούς παρατηρούνται ηωσινοφιλικές εκκρίσεις.³

Κάθε κοιλιακός λοβός αποτελείται από 2-3 κύριους πόρους, στην κοιλιακή πλευρά της ουρήθρας, ακριβώς κάτω από την ουροδόχο κύστη. Κάθε κύριος πόρος, αφού καλύψει μία μικρή απόσταση, διακλαδίζεται σε 8-12 μικρότερους, δευτερεύοντες πόρους, οι οποίοι εκτείνονται προς την “άπω” περιοχή χωρίς να διακλαδιστούν. Εκεί, όμως, πλήθος μικρών πόρων προκύπτουν από τους δευτερεύοντες το οποίο συνιστά ένα περίπλοκο δίκτυο.

Το επιθήλιο των πόρων της “άπω” περιοχής είναι μονόστιβο κυλινδρικό, με ένα μη συνεχόμενο στρώμα βασικών κυττάρων. Οι πρωτεύοντες και δευτερεύοντες πόροι επενδύονται από χαμηλό κυλινδρικό επιθήλιο.

β) Πηκτικός (πρόσθιος) λοβός: Αποτελείται από ζεύγος δεξιού και αριστερού λοβού οι οποίοι έρχονται σε επαφή με την έσω επιφάνεια των σπερματοδόχων κύστεων. Ο κύριος πόρος σε κάθε πλευρά διακλαδίζεται σε 40-50 τελικούς πόρους. Το επιθήλιο του πηκτικού λοβού είναι μονόστιβο κυλινδρικό με τον πυρήνα στο κέντρο του κοκκιώδους ηωσινοφιλικού κυτταροπλάσματος και μικρό πυρήνιο. Ιστολογικά, συνήθως παρουσιάζει θηλώδες και cribriform πρότυπο ανάπτυξης με εστιακή μόνο πτύχωση του επιθηλίου (Εικ. 4.2, **D** και **E**). Ο αυλός των αδενίων περιέχει άφθονες ηωσινοφιλικές εκκρίσεις (Εικ.4.2Α). Παρά το πολύπλοκο πρότυπο ανάπτυξης του επιθηλίου και τη στενή χωροταξική σχέση με τις προερχόμενες από πόρους του Wolf σπερματοδόχες κύστεις, ο πρόσθιος λοβός προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο ενώ θεωρείται ότι αντιστοιχεί στην κεντρική ζώνη του ανθρώπινου προστάτη.

γ) Πλάγιο-ραχιαίος λοβός: Ευρίσκεται ακριβώς κάτω από τη σπερματοδόχο κύστη και τον πηκτικό λοβό. Έρχεται σε στενή επαφή με την ουρήθρα μέσω συνδετικού ιστού και ένα σύστημα πόρων. Εκτείνεται κοιλιακά καλύπτοντας εν μέρει τον κοιλιακό λοβό και ραχιαία έρχεται σε επαφή με το ραχιαίο λοβό. Οι αδένες καλύπτονται από κυβοειδές ή κυλινδρικό επιθήλιο. Ο πυρήνας των κυττάρων εδράζεται στο κέντρο τους. Αναφέρεται ομολογία του πλαγίου λοβού με την περιφερική ζώνη του ανθρώπινου προστάτη.

Επικουρικοί γεννητικοί αδένες

Οι επικουρικοί γεννητικοί αδένες στον ποντικό είναι ανδρογONO-εξαρτώμενα αδενικά εκκολπώματα του εγγύς σπερματικού πόρου, ένας σε κάθε πλευρά. Οι μονήρεις σπερματικοί πόροι εκβάλλουν στον κοινό σπερματικό πόρο εγγύς των σπερματοδόχων κύστεων σε κάθε πλευρά. Προέρχονται από τον πόρο του Wolff, σε αντίθεση με την προέλευση του υπόλοιπου προστάτη από τον ουρογεννητικό κόλπο. Ρόλος τους είναι η παραγωγή εκκρίσεων που αθροίζονται στο σπερματικό υγρό συνεισφέροντας στη γονιμοποιητική του ικανότητα, χωρίς ωστόσο να

αναγνωρίζεται ομολογία με το γεννητικό σύστημα του ανθρώπου. Το επιθήλιο είναι απλό κυβοειδές και σε αντίθεση με τα προστατικά αδένια, περιβάλλεται από πυκνότερο ινομυώδες στρώμα. Οι εκκρίσεις έχουν χαρακτηριστική εμφάνιση «ελβετικού τυριού», με τρύπες ανάμεσα στο πυκνό ηωσινοφιλικό τους περιεχόμενο. Διόγκωση με επιθηλιακή υπερπλασία έχει παρατηρηθεί στους επικουρικούς γεννητικούς αδένες (και άλλους προερχόμενους από τον πόρο του Wolff δομές όπως οι σπερματοδόχες κύστεις αλλά όχι στον προστάτη .

Βολβουρηθραίοι αδένες

Τόσο οι βολβουρηθραίοι (ΒΟΑ) αδένες όσο και οι περιουρηθρικοί ακριβώς όπως και ο προστάτης είναι παράγωγα του ουρογεννητικού κόλπου ως αποτέλεσμα της δράσης των ανδρογόνων. Είναι ομόλογοι με τους αδένες Cowper's στον άνθρωπο, και εντοπίζονται ακριβώς κάτω από το βλεννογόνο της ουρήθρας στο χαλαρό συνδετικό ιστό του χορίου στη μεμβρανώδη μοίρα της ουρήθρας αμέσως μετά την κορυφή του προστάτη.

Στον ποντικό, οι ΒΟΑ εντοπίζονται πιο περιφερικά στην ουρήθρα, σε σαφή απόσταση από τον προστάτη ακριβώς κάτω από το βολβοσηραγγώδη μυ, σε αντίθεση με τον άνθρωπο. Σε αντίθεση με τον προστάτη , όπου δε διακρίνονται ιστολογικά αδενοκυψέλες ή εκφορητικοί πόροι, στους ΒΟΑ αναγνωρίζονται λόβια εκκριτικών αδενοκυψελών και κεντρικών εκφορητικών πόρων που επενδύονται από κυβοειδές επιθήλιο με κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα και άφθονο ωχρο βλεννώδες κυτταρόπλασμα και εκβάλλουν στην ουρήθρα.

Περιουρηθρικοί αδένες

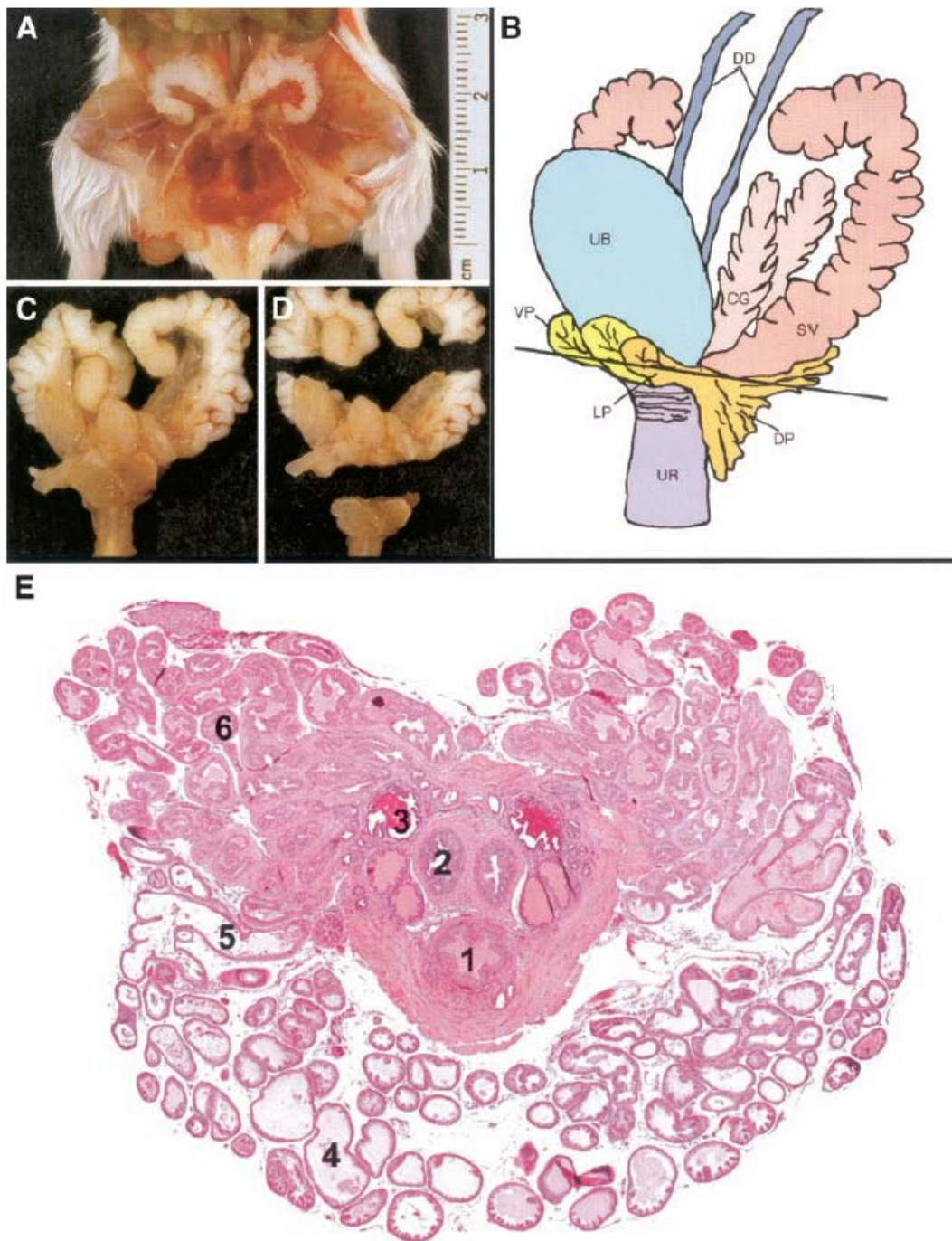
Στον άνθρωπο οι περιουρηθρικοί αδένες (αδένες Littre) εντοπίζονται κατά μήκος της πείκης ή σπογγιώδους ουρήθρας. Στον ποντικό οι αδένες αυτοί βρίσκονται στο χόριο κάτω ακριβώς από τη στιβάδα ουροθηλίου απώτερα από τα τμήματα της ουρήθρας στα οποία εκβάλλουν οι προστατικοί πόροι, εγγύτερα ωστόσο των ΒΟΑ. Αποτελούνται από αδενοκυψέλες και βραχείς εκφορητικούς πόρους που ανοίγουν στον αυλό της ουρήθρας. Σε φυσιολογικούς ποντικούς το επιθήλιο είναι κυβοειδές με ωοειδείς πυρήνες και πυκνό ηωσινοφιλικό κοκκιώδες

κυτταρόπλασμα. Εκκόλπωμα της ουρήθρας αναγνωρίζεται σε διάφορα είδη ποντικών, το οποίο θα πρέπει σαφώς να διακρίνεται από τους ΒΟΑ, που λόγω της ανατομικής τους θέσης συχνά συγχέονται.

4.3 Παρασκευή και μονιμοποίηση ουροποιογεννητικών οργάνων μυών

Οι όρχεις είναι ευαίσθητοι και χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τους χειρισμούς μονιμοποίησής τους. Μονιμοποίηση σε παραφίνη μπορεί να οδηγήσει σε συρρίκνωση των γεννητικών κυττάρων και των κυττάρων Sertoli, οδηγώντας σε τεχνητή αποκόλληση των κυττάρων και αποδιοργάνωση της δομής των σωληναρίων παρότι η διάμετρος των σωληναρίων διατηρείται ανέπαφη. Εγκάρσιες τομές του όρχεως χρησιμοποιούνται προς αξιολόγηση της σπερματογένεσης. Η αξιολόγηση της σπερματογένεσης μπορεί να γίνει σε παρασκευάσματα φορμόλης αν και η μονιμοποίηση σε υγρά όπως το Bouin's ή το τροποποιημένο Davidson οδηγούν σε λιγότερη συρρίκνωση του σπερματικού επιθηλίου. Η συμπίεση εξάλλου των όρχεων κατά την επεξεργασία τους μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση αθροίσεων κυττάρων στον αυλό των σωληναρίων, το οποίο δεν πρέπει να θεωρείται διαταραχή της αρχιτεκτονικής. Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης είναι ικανοποιητική για την μορφολογική εξέταση του ουρογεννητικού συστήματος, ενώ η PAS χρώση μπορεί να δώσει πληροφορίες για την ακροσωματική αντίδραση. Επιπρόσθετα, η επιδιδυμίδα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στις διατομές του όρχεως

Η παρασκευή των επιμέρους προστατικών λοβών πραγματοποιείται μετά την αφαίρεση όλου του γεννητικού συστήματος en bloc (προστάτης, σπερματοδόχες κύστεις, επικουρικοί αδένες, εγγύς ή κοινός σπερματικός πόρος, ουροδόχος κύστη και εγγύς ουρήθρα) μετά τη διατομή της ουρήθρας. Μετά εγκάρσια διατομή διά της ουρήθρας (με ή χωρίς τους προστατικούς λοβούς) το παρασκεύασμα αποτίθεται στις κασέτες προς μονιμοποίηση.



Εικόνα 4.3 Τεχνική για ιστολογική εξέταση του προστάτη με την en bloc επεξεργασία του . Α. Εικονίζονται ακέραιος ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη και οι σπερματοδόχες κύστεις μετά από επιμήκη διατομή του κοιλιακού τοιχώματος. Οι λευκές σπερματοδόχες είναι εύκολα διακριτές. Β. Σχηματικό διάγραμμα του αφαιρεθέντος ουροποιογεννητικού συστήματος en bloc (προσθιοπλάγια άποψη) μετά τη διατομή της ουρήθρας (UR). VP: κοιλιακός προστάτης LP: Πλάγιος λοβός DP: Ραχιαίος λοβός SV: Σπερματοδόχες κύστεις CG: Πηκτικός ή πρόσθιος λοβός DD: σπερματικός πόρος UB: Ουροδόχος κύστη. Η οριζόντια μαύρη γραμμή υποδεικνύει το επίπεδο της εγκάρσιας τομής μέσω της ουρήθρας ώστε να περιλαμβάνει τόσο το ραχιαίο όσο και τον κοιλιακό λοβό του προστάτη κοντά

στη συμβολή τους με τη σπερματοδόχο κύστη SV. C. Το αφαιρεθέν από το ζώο στο σχήμα A ουροποιογεννητικό σύστημα en bloc. D. Το ίδιο μπλοκ μετά από εγκάρσια τομή μέσω της ουρήθρας, όπως αναφέρεται στο B και επιπλέον εγκάρσια τομή μέσω των σπερματοδόχων κύστεων E. Μικροσκοπική τομή που απεικονίζει το ουροποιογεννητικό σύστημα επιτρέποντας τυπικά επαρκή ανάδειξη των διαφόρων λοβών του προστάτη καθώς επίσης και επικουρικών γεννητικών αδένων. 1 Ουρήθρα σε διατομή 2 Σπερματικός πόρος σε διατομή 3 Επικουρικοί αδένες σε διατομή 4 Κοιλιακός προστάτης 5 Πλάγιος προστάτης 6 Ραχιαίος προστάτης.

ΣΚΟΠΟΣ

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που καταγράφηκε στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας προκύπτει η σημαντική επίδραση των Advanced Glycation End Products (AGE) και του υποδοχέα τους RAGE στο μεταβολισμό και την αναπαραγωγική λειτουργία των αρρένων, προκαλώντας κυτταρική δυσλειτουργία και ιστικές βλάβες μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών της φλεγμονής και της απόπτωσης.

Η πειραματική μελέτη αξιολόγησε την επίδραση διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα [saturated fatty acids (SAFA)], που προσομοιάζει στη σύγχρονο διατροφικό πρότυπο του δυτικού κόσμου, στο λιπιδαιμικό και μεταβολικό προφίλ (επίπεδα AGE, οξειδωτικό stress) καθώς επίσης και στις ιστοπαθολογικές (έκφραση AGE, RAGE, απόπτωση) και μορφομετρικές παραμέτρους του αναπαραγωγικού συστήματος αρρένων μυών C57BL6 *in vivo*. Μετά την εκδήλωση παχυσαρκίας εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα της χορήγησης διατροφής πλούσιας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα [monounsaturated fatty acids (MUFA)] ή ίσης περιεκτικότητας MUFA και SAFA .

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

1.Α)ΕΠΙΛΟΓΗ ΖΩΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Προκειμένου να μελετηθεί σε μοριακό επίπεδο η επίδραση του μεταβολικού συνδρόμου στο αναπαραγωγικό σύστημα είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο ζωικό πρότυπο. Δεδομένης της πολυπαραγοντικής φύσεως του ΜΣ το ζωικό μοντέλο για τη μελέτη του ΜΣ θα πρέπει μεταβολικά και παθοφυσιολογικά να προσομοιάζει προς τον άνθρωπο με μέγεθος τέτοιο ώστε να επιτρέπει παρατηρήσεις για τα μονοπάτια που οδηγούν στην εκδήλωση του συνδρόμου και τις επιπλοκές του. Έτσι ποικίλα μοντέλα που φέρουν μονογονιδιακές μεταλλάξεις, όπως οι ob/ob μύες και οι Zucker-(fa/fa) επίμυες, ή άλλα στα οποία η αύξηση του βάρους επάγεται από φάρμακα δεν μπορούν να αναπαραγάγουν τον πολύπλοκο φαινότυπο της ανθρώπινης διαταραχής.

Αύξηση της περιεκτικότητας της διατροφής σε λιπαρά οξέα έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί παχυσαρκία, υπερχοληστερολαιμία και σακχαρώδη διαβήτη σε διάφορα είδη μυών (Surwit et al, 1988; West et al, 1992) και επίμυων (Schemmel et al, 1970). Τα C57BL/6 ποντίκια, ιδιαίτερα τα αρσενικά αποτελούν ένα πάρα πολύ καλό πρότυπο του μεταβολικού συνδρόμου επειδή αναπτύσσουν τις μεταβολικές διαταραχές που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο όταν τους επιτραπεί ad libitum πρόσβαση σε πλούσια σε λίπη τροφή (Surwit et al, 1988) ενώ διατηρούν καλή φυσική κατάσταση και φυσιολογικό σωματικό βάρος όταν η περιεκτικότητα της διατροφής τους σε λιπαρά περιοριστεί. Η προοδευτική εκδήλωση αντίστασης στην ινσουλίνη, υπεργλυκαιμίας και παχυσαρκίας στα ποντίκια αυτά ομοιάζει προς τη σταδιακή εκδήλωση των ανάλογων διαταραχών του ΜΣ σε ανθρώπους που υιοθετούν το σύγχρονο δυτικό τρόπο ζωής (καθιστική ζωή, έλλειψη σωματικής άσκησης, διατροφή πλούσια σε λίπη, διαιτολόγιο με προμαγειρεμένες,

προτηγανισμένες τροφές που θερμαίνονται ή παρασκευάζονται σε υψηλές θερμοκρασίες) (Collins et al, 2004). Ερευνητές αναφέρουν ότι η προκαλούμενη από τη διατροφή παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης στα ζώα αυτά χαρακτηρίζεται από εκλεκτική εναπόθεση λίπους στο μεσεντέριο, γεγονός το οποίο και στον άνθρωπο συνιστά ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση σακχαρώδους διαβήτη. Διατροφή εξάλλου πλούσια σε λίπη σχετίζεται και με αυξημένη αθηρογένεση .

Η παχυσαρκία των C57BL/6 μυών με υψηλή πρόσληψη λιπαρών οξέων δεν είναι απλά το αποτέλεσμα υπερφαγίας ή μειωμένης φυσικής δραστηριότητας. Οι μύες αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη αποδοτικότητα της διατροφής τους (σωματικό βάρος που αποκτάται/ θερμίδες που καταναλώνονται). Παρότι σε σύγκριση με τους A/J ποντικούς τα C57BL6 φαίνεται να τρώνε ελαφρά αυξημένη ποσότητα τροφής, δεν ευθύνεται αυτή η υπερφαγία για την αύξηση του σωματικού βάρους. Επιπλέον γίνονται παχύσαρκα παρά την αυξημένη τους σωματική δραστηριότητα. Οι Brownlow κ συν. (Brownlow et al, 1996) ανέφεραν ότι τα παχύσαρκα C57BL6 ποντίκια είναι εξίσου δραστήρια όσο τα λεπτότερα και 3 φορές πιο ενεργά από τα A/J.

Η κεντρική εναπόθεση του λίπους στα ζώα αυτά συνοδεύεται από μεταβολικές διαταραχές. Η υπεργλυκαιμία εκδηλώνεται σε ένα μήνα από την έναρξη της δίαιτας ενώ 16 εβδομάδες αργότερα έχει αναπτυχθεί υπερπλασία και υπερτροφία των λιπωδών κυττάρων τέτοια ώστε το συνολικό περιεχόμενο σε λίπος του οργανισμού να αυξάνεται κατά 93%. Το σύνδρομο παχυσαρκίας - διαβήτη επιδεινώνεται με το πέρασμα του χρόνου και με την αύξηση του σωματικού βάρους αλλά ακόμα και μετά την πλήρη εκδήλωσή του μετά 16 εβδομάδες είναι πλήρως αναστρέψιμο. Παράλληλα όπως στους ανθρώπους με ΜΣ η παχυσαρκία και η υπερινσουλιαιμία στα C57BL/6 ποντίκια συνοδεύεται από υπέρταση και αυξημένη ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

1.Β)ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η πλειοψηφία των ερευνητών, που χρησιμοποίησαν τα C57BL/6 ως ζωικό πρότυπο παχυσαρκίας προκαλούμενης από εμπλουτισμένη σε λίπη διατροφή προτίμησαν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (η πρόσληψη θερμίδων από λίπη κυμαίνεται από 40 έως 60%) (Collins et al, 2004; Petro et al, 2004; Surwit et al, 1995) και διάφορες πηγές προέλευσης των λιπαρών (ζωικά ή φυτικά), σε καθαρή μορφή ή απλά με προσθήκη συγκεκριμένης συγκέντρωσης λιπαρών σε συνήθεις τροφές. Τα πειραματόζωά τους σε διάστημα 8 έως 12 εβδομάδων γίνονται παχύσαρκα, ήπια ως μέτρια υπεργλυκαιμικά και εκδηλώνουν διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης. Τα διαιτολόγια όμως αυτά απέχουν πολύ από τη συνηθισμένη διατροφή του ανθρώπου ενώ καθιστούν δύσκολη την απορρόφηση των απαραίτητων λιποδιαλυτών βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την ανάπτυξη των ζώων. Αντίθετα η τροφή που παρέχεται από την εταιρεία Harlan Teklad TD88137 και αναφέρεται ως δίαιτα δυτικού τρόπου ζωής χαρακτηρίζεται από περιεκτικότητα σε λιπαρά και συγκεκριμένα σε κορεσμένα λιπαρά αντιπροσωπευτική της σύγχρονης διατροφής, η οποία σχετίζεται με την αυξημένη επίπτωση του ΜΣ. Τα C57BL/6 ποντίκια με την τροφή αυτή ανέπτυξαν παχυσαρκία και δυσλιπιδαιμία σε χρονικό διάστημα παρόμοιο με την πολύ υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά συνιστώντας το κατάλληλο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διαμεσολαβούν τις επιδράσεις του ΜΣ στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρρένων (Raab et al, 2005).

1.Γ) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

Καθώς λοιπόν το συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο με τη δυτικού τύπου διατροφή εκδηλώνει διαταραχές του ΜΣ καθιστά δυνατή την περαιτέρω διερεύνηση των επιδράσεων διαφορετικής προέλευσης λιπαρών οξέων τόσο στο λιπιδαιμικό προφίλ όσο και στο γεννητικό σύστημα. Η ακριβής περιεκτικότητα της διατροφής σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα που θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ ή την αθηροσκλήρωση δεν είναι

γνωστή. Υψηλή περιεκτικότητα της διατροφής σε κεκορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) σχετίζεται με υπερχοληστερολαιμία ενώ τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) παίζουν προστατευτικό ρόλο κατά της δυσλιπιδαιμίας (Arapostathi et al, 2011). Εξάλλου όπως ήδη περιγράφηκε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η συσχέτιση των λιπαρών οξέων της διατροφής με την φυσιολογία και τις παθήσεις του προστάτη καθώς και τη σπερματογένεση.

1.Δ) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

58 αρσενικά C57BL/6 ποντίκια ηλικίας 3 μηνών αποκτήθηκαν από το Ινστιτούτο Παστέρ. Το ερευνητικό πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από τη διεύθυνση Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Νομαρχίας Αθηνών με την υπ' αριθμ. Κ/6030/18-10-2005 απόφαση σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, η οποία είναι εναρμονισμένη με την Οδηγία 86/609/ΕΟΚ (ΦΕΚ 64/τ.Α'/1991) της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθώς και από το επιστημονικό συμβούλιο του Γ.Ν. Αθηνών «Λαϊκό». Η οδηγία 86/609/ΕΟΚ στοχεύει στην προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς ώστε να εξασφαλίζεται η ελαχιστοποίηση του πόνου, της ταλαιπωρίας, της αγωνίας ή της μόνιμης βλάβης που ενδέχεται να υποστούν, συνεπεία των διαδικασιών των οποίων αποτελούν το αντικείμενο.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα ζώα φυλάσσονταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο πειραματοζώων του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν. Σ. Χρηστέας». Ήταν τοποθετημένα σε πλαστικούς αδιαφανείς κλωβούς που καλύπτονταν με μεταλλικό δικτυωτό πλέγμα και με στρωμή από πριονίδι. Ο χώρος των πειραματοζώων είχε τεχνητά ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, αερισμό και φωτισμό. Η θερμοκρασία του χώρου κυμαινόταν μεταξύ 18°C και 20°C. Η ρύθμιση του φωτισμού γινόταν με χρονοδιακόπτη ώστε να υπάρχει ημερήσιος κύκλος με 10 ώρες φωτός και 14 ώρες σκοτάδι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ανανέωση του αέρα γινόταν δύο φορές την ώρα και η υγρασία κυμαινόταν στο 55±10%. Η αλλαγή της στρωμνής και των κλωβών γινόταν κάθε 4

ημέρες. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στο χειρισμό των πειραματοζώων έτσι ώστε να προκαλείται το ελάχιστο δυνατό stress στα ζώα. Ειδικότερα η αλλαγή των κλωβών, η χορήγηση της τροφής και του νερού και η ζύγιση γινόταν πάντοτε από το ίδιο άτομο και συγκεκριμένη ώρα της ημέρας. Τροφή και νερό χορηγούνται ad libidum.

10 μύες, οι οποίοι τρέφονταν με συνήθη τροφή (12%kcal λιπαρά, 68%kcal υδρογονάνθρακες, 20%kcal πρωτεΐνες, 3.9kcal/g τροφής- D10001, την οποία προμηθεύει η εταιρεία Research Diets, New Brunswick, USA) χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Οι υπόλοιποι 48 μύες χωρίστηκαν τυχαία από την αρχή σε 3 ομάδες με 16 πειραματόζωα η καθεμία (MUFA, MUFA-SAFA, και SAFA) και έλαβαν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (42%kcal λιπαρά, 42.7%kcal υδρογονάνθρακες, 15.3%kcal πρωτεΐνες, 4.62kcal/g τροφής), τη λεγόμενη TD88137 ή τροφή δυτικού τρόπου ζωής, η οποία παρέχεται από την εταιρεία Harlan Teklad (Madison, Wisconsin, USA). Σε χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων απέκτησαν αυξημένο σωματικό βάρος και δυσλιπιδαιμία.

Μετά την ανάπτυξη υπερχοληστερολαιμίας, για τις υπόλοιπες 16 εβδομάδες στα ζώα χορηγήθηκε τροφή ίδιας περιεκτικότητας σε λιπαρά αλλά με διαφορετική αναλογία SAFA και MUFA. Έτσι στα πειραματόζωα χορηγήθηκε είτε τροφή πλούσια σε MUFA (ομάδα MUFA) στη μορφή ηλιελαίου (σύνθεση λιπαρών οξέων 78% MUFA, 14% PUFA, 8% SAFA; τροφή D05101205 που αγοράστηκε από την εταιρεία Research Diets) ή με παρόμοιο περιεχόμενο MUFA και SAFA (ομάδα MUFA-SAFA) με τη μορφή φοινικελαίου (σύνθεση λιπαρών οξέων 42% MUFA, 14%PUFA, 44% SAFA; τροφή D05101204 που αγοράστηκε από την εταιρεία Research Diets) ή η προηγούμενη πλούσια σε SAFA τροφή (ομάδα SAFA).

Ο πίνακας 1 περιέχει την σύνθεση των τροφών που χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα, ο πίνακας 2 την περιεκτικότητα στα θρεπτικά στοιχεία, ο πίνακας 3 την ανάλυση των θρεπτικών συστατικών όπως αυτά παρέχονται από τις εταιρείες παραγωγής ενώ το σχήμα 1 συνοψίζει το σχεδιασμό του πειράματος.

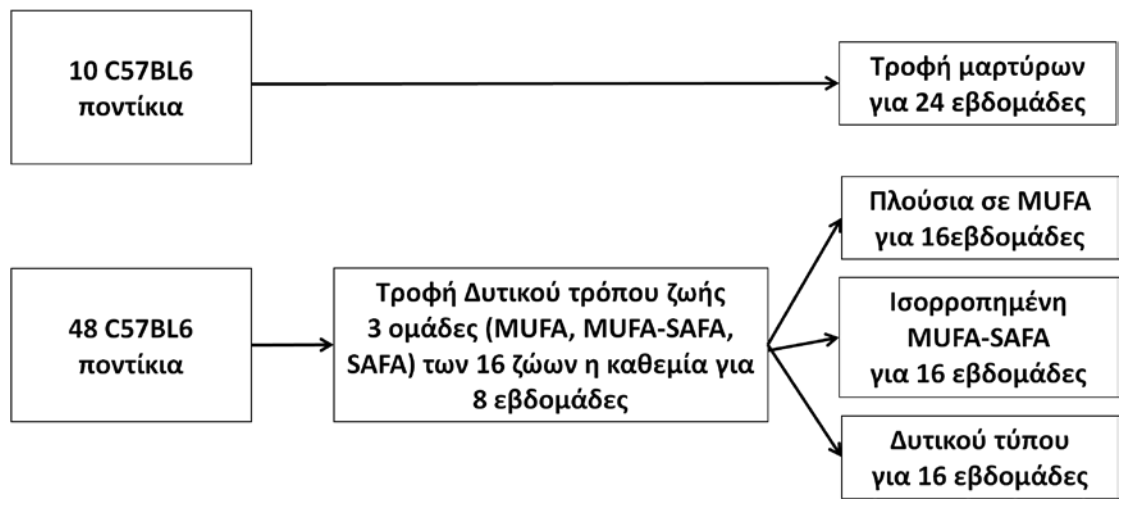
Πίνακας 1: Ομάδες πειραματοζώνων ανάλογα με την περιεκτικότητα διαφορετικής προέλευσης λιπαρών οξέων της διατροφής τους

ΟΜΑΔΕΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΔΙΑΤΡΟΦΗ	ΛΙΠΟΣ (%gm/ kcal%)	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ (%gm)
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	Μάρτυρες	Διατροφή μαρτύρων	5% ΛΙΠΟΣ / 11,5%	25,1% MUFA 62% PUFA 12,9% SFA
ΟΜΑΔΑ SAFA	Μεταβολικό Σύνδρομο	Διατροφή SAFA	21,2% ΛΙΠΟΣ / 40%	29% MUFA 3,3% PUFA 62% SFA
ΟΜΑΔΑ MUFA	Μεταβολικό Σύνδρομο	Διατροφή MUFA	20,7% ΛΙΠΟΣ / 40%	78,2% MUFA 16% PUFA 8% SFA
ΟΜΑΔΑ MUFA-SAFA	Μεταβολικό Σύνδρομο	Διατροφή MUFA-SFA	20,7% ΛΙΠΟΣ / 40%	42,1% MUFA, 13,7% PUFA 44,1% SFA

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα σε θρεπτικές ουσίες και προέλευση λιπαρών οξέων τροφών πειραματοζώνων

ΤΡΟΦΗ (% βάρους)	ΜΑΡΤΥΡΩΝ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ (HARLAN)	MUFA-SFA (palm oil)	MUFA (safflower)
Ολικό λίπος	5	21.2	20.7	20.7
SFA	12.9	62	44.1	8
MUFA	25.1	29	42.1	78.2
PUFA	62	62	13.7	16
Υδατάνθρακες	66	48.5	44.9	44.9
Πρωτεΐνες	20.3	17.3	24.1	24.1

Εικόνα 1 Σχεδιασμός Πειράματος



Πίνακας 3: Ανάλυση θρεπτικών συστατικών τροφών πειράματος

	D10001-CONTROL		D05101204-SFA		D05101205-MUFA		HARLAN-MS DIET
	Gm	Kcal	Gm	kcal	Gm	Kcal	%gm
Πρωτεΐνες	20.3	21	24.1	21	24.1	21	17.3
Υδατάνθρακες	66	68	44.9	39	44.9	39	48.5
Λίπος	5	12	20.7	40	20.7	40	21.2
Σύνολο	91.3	100	89.7	100	89.7	100	
Kcal/gm	3.9		4.62		4.62		4.5

Συστατικά

Casein, 80 Mesh	200	800	200	800	200	800	DL-Methionine	0,3(%)
DL-Methionine	3	12	3	12	3	12	Corn Starch	15(%)
Maltodex-trin	0	0	75	300	75	300	Sucrose	34,1(%)
Corn Starch	150	600	75	300	75	300	Cellulose, BW 200	5(%)
Sucrose	500	2000	218.8	875	218.8	875	Anhydrous Milk Fat	21(%)
Cellulose, BW 200	50	0	50	0	50	0	Caco3	0,4(%)
Corn Oil	50	450	10	90	10	90	Mineral Mix AIN-76 (170915)	3,5(%)
High Oleic Safflower Oil	0	0	0	0	165	1485	Vitamin Mix Tekland (40060)	1(%)
Palm Oil	0	0	765	1485	0	0	Ethoxyquin (antioxidant)	0.004(%)
Mineral Mix S10001	35	0	35	0	35	0	Casein, 80 Mesh	19,5(%)
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40	10	40		
Choline Bitartate	2	0	2	0	2	0		
FD & C Blue Dye 1	0	0	0.05	0	0	0		
FD & C Red Dye 40	0	0	0	0	0.05	0		
TOTAL	1000	3902	843.9	3902	843.9	3902		

Μετά την παρέλευση 24 εβδομάδων, στο τέλος του πειραματισμού η αναισθητοποίηση των πειραματόζων έγινε με παρατεταμένη έκθεση σε ατμόσφαιρα διαιθυλαιθέρα (Vioyl) μέσα σε γυάλινο κώδικα, αφού προηγουμένως είχαν ζυγιστεί. Η ευθανασία τους έγινε με αφαίμαξη παρακεντώντας την κοιλιακή αρτηρία, αφού είχαν πλήρως αναισθητοποιηθεί. Μετά την επιβεβαίωση του θανάτου

του πειραματοζώου ακολουθούσε η παρασκευή και αφαίρεση του ουρογεννητικού συστήματος *en bloc*. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης και ακολούθως εγκλείσθηκαν σε παραφίνη.

Εικόνα 2 Α. Το ποντίκι C57BL6 Β Σπερματοδόχες κύστεις και ουροδόχος κύστη C. *En bloc* παρασκευή του ουροποιογεννητικού συστήματος

A



B



C



1.Ε) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑΣ

Πέραν της υπεργλυκαιμίας και η χρόνια υπερλιπιδαιμία έχει τοξικές επιδράσεις στη λειτουργία κυττάρων και οργάνων. Η λεγόμενη τοξικότητα των λιπών (lipotoxicity) συνίσταται στις δηλητηριώδεις για τον οργανισμό συνέπειες της αυξημένης συγκέντρωσης κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων και εναπόθεσής τους στο εσωτερικό κυττάρων, σε όργανα όπως το ήπαρ, το πάγκρεας και οι μύες. Αυξημένη υπεροξειδωση των λιπών πιθανά σε συνδυασμό με την υπεργλυκαιμία

και το οξειδωτικό stress οδηγεί στο σχηματισμό AGEs, τα οποία και αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ της δυσλιπιδαιμίας και των επιπλοκών του ΜΣ.

Η χοληστερόλη εκκρίνεται στο προστατικό πλάσμα από τον προστάτη με στόχο την προστασία των σπερματοζωαρίων από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις. Η δίοδος των σπερματοζωαρίων από το γυναικείο γεννητικό σωλήνα στα θηλαστικά συνοδεύεται από ελάττωση της περιεκτικότητας της μεμβράνης τους σε χοληστερόλη, διαδικασία που συμβάλλει στην ενεργοποίηση του σπέρματος. Η χοληστερόλη έχει βρεθεί ότι τροποποιεί τη συγχώνευση της μεμβράνης αυτής με την εξωτερική μεμβράνη του ακροσώματος εμποδίζοντας την ενεργοποίηση. Διατροφή πλούσια σε χοληστερόλη δυσχεραίνει την ακροσωματική αντίδραση στα σπερματοζωάρια κονίκλων επηρεάζοντας άμεσα την εκκριτική λειτουργία των κυττάρων Leydig και Sertoli, τη σπερματογένεση και τη διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων στο εσωτερικό της επιδιδυμίδας. Σε ανθρώπους και επίμυες η υπερχοληστερολαιμία με/ ή υπερτριγλυκεριδαιμία σχετίζεται με χαμηλή ποιότητα σπέρματος σαν άμεση επίδρασή της στην ορχική λειτουργία. Παράλληλα σε πληθυσμούς υπογόνιμων ανδρών αυξημένη καταγράφεται η επίπτωση τόσο της υπερχοληστερολαιμίας όσο και της υπερτριγλυκεριδαιμίας.

Επίμυες, συνεπώς, των οποίων η διατροφή έχει εμπλουτιστεί με χοληστερόλη συνιστούν κατάλληλο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της δυσλιπιδαιμίας. Λόγω μεγέθους είναι ευκολότεροι στους χειρισμούς και η διατροφή τους αυτή έχει βρεθεί ότι προκαλεί τόσο υπερλιπιδαιμία όσο και υπεργλυκαιμία, συστατικά στοιχεία του ΜΣ. Παράλληλα οι υπερλιπιδαιμικοί επίμυες λόγω εμπλουτισμένης σε χοληστερόλη διατροφής έχουν προταθεί ως ζωικό πρότυπο για τη μελέτη τόσο του κατώτερου ουροποιητικού όσο και της στυτικής δυσλειτουργίας καθώς παρουσιάζουν προστατική υπερπλασία, υπερδραστικότητα της κύστης αλλά και διαταραχή της στυτικής λειτουργίας. Πιθανολογείται συνεπώς κοινός παθογενετικός μηχανισμός που οδηγεί στις αναφερθείσες διαταραχές στο πλαίσιο του ΜΣ.

1.ΣΤ) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑΣ

45 επίμυες Wistar ηλικίας 100 ± 20 ημερών μετά από πάροδο χρονικής περιόδου δέκα ημερών για την προσαρμογή τους στο πειραματικό περιβάλλον χρησιμοποιήθηκαν για την ερευνητική διαδικασία. Το ερευνητικό πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από τη διεύθυνση Κτηνιατρικής της Νομαρχίας Αθηνών σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία σε συμμόρφωση με την Οδηγία 86/609 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από το επιστημονικό συμβούλιο του Γ.Ν. Αθηνών «Λαικό».

Η τροφή των αρουραίων, που προμηθεύονταν κάθε μήνα από την εταιρεία Mucedola, φυλάσσεται στους $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ και δίδεται κάθε μέρα από το ίδιο άτομο. Οι αρουραίοι χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα αναφοράς (C, 15 πειραματόζωα) τρέφονταν με συνήθη τροφή 4RF25, ειδικά διαμορφωμένη για την ανάπτυξή τους ενώ τα ζώα που ανήκουν στην υπερχοληστερολαιμική ομάδα (CH, 30 πειραματόζωα) τρέφονταν με 4 % χοληστερόλη και 1% χολικό οξύ. Η τροφή και το νερό των ζώων δίνεται ad libitum. Μετά την πάροδο 5 μηνών από την έναρξη του πειραματισμού διακόπηκε η χορήγηση τροφής στα πειραματόζωα και εντός 24 ωρών ακολούθησε η ευθανασία τους.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 In vivo μετρήσεις

Κατά την ευθανασία πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και από τα δείγματα αίματος το πλάσμα χωρίστηκε με φυγοκέντρηση. Ακολούθησαν μετρήσεις του λιπιδικού προφίλ (Ολική χοληστερόλη, HDL, LDL και τριγλυκερίδια) και της γλυκόζης αίματος. Τα υπόλοιπα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη για τον προσδιορισμό των AGEs σε αυτά και περαιτέρω μετρήσεις του βιοχημικού και ορμονικού προφίλ.

Όλες οι διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με τις αρχές και τους κανόνες που δίνονται από τις οδηγίες της Federation of Laboratory Animal Science Association. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν κατά την ολοκλήρωση κάθε φάσης του πειράματος. Στο τέλος των δύο πρώτων περιόδων 0,5cc αίματος ελήφθη από τον έξω κανθό του ματιού κάθε ποντικού. Στο τέλος των επομένων φάσεων, ομάδες των 6 αναισθητοποιούνταν ανά περίοδο και 1-1,5cc συλλέγονταν από την κάτω κοίλη φλέβα τους πριν την ευθανασία.

Έμπειροι κτηνίατροι ελάμβαναν αίμα από τα πειραματόζωα μετά 12 ώρες νηστείας. Το αίμα συλλέγονταν σε φιαλίδια Vacutainer (VWR Scientific Products, West Chester, PA) και αναρροφούνταν με την προσθήκη ηπαρίνης. Το πλάσμα διαχωρίστηκε με χαμηλής ταχύτητας φυγοκέντρησης και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια στους -80°C έως την περαιτέρω ανάλυσή τους

2.2 Βιοχημικές και ορμονικές αναλύσεις

Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της ολικής χοληστερόλης μετρήθηκαν με ενζυματική μέθοδο με το εμπορικά διαθέσιμο kit PAP (“biosis” – Biotechnological Applications, Athens, GR), της HDL-χοληστερόλης με τη φωτομετρική ενζυματική μέθοδο που αρχικά περιγράφηκε από τους Williams κ συν. (Williams et al, 1979) και από τους Badimon κ συν (Badimon et al, 1990) ενώ τα τριγλυκερίδια με το εμπορικά διαθέσιμο διαγνωστικό kit με τη χρήση της GPO/PAP ενζυματικής μεθόδου. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Έρευνας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η Τεστοστερόνη μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) χρησιμοποιώντας συσκευασμένο αντιδραστήριο του εμπορίου που αγοράστηκε από την εταιρεία Calbiotech, CA, USA.

2.3. Μέτρηση AGEs

2.3.1 AGE-ELISA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των AGEs στον ορρό των ζώων εφαρμόστηκε η ανταγωνιστική ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία AGE-ELISA η οποία έχει περιγραφεί από την κ Διαμάντη κ.α (Diamanti-Kandarakis et al, 2005). Χρησιμοποιούνται πλαστικές πλάκες μικροτιτλοποίησης από πολυστυρένιο των 96 φρεατίων. Σε κάθε φρεάτιο της πλάκας τοποθετούνται 100 μl διαλύματος επικάλυψης με τροποποιημένη από AGEs βόεια αλβουμίνη ορρού (AGE-BSA) σε πυκνότητα 3μg/ml διαλύματος. Οι πλάκες καλύπτονται και ακολουθεί επώαση στους 4 °C για 12- 18 ώρες ούτως ώστε να προσδεθεί με απλή φυσική (παθητική) προσρόφηση το AGE-BSA.

Εν συνεχεία τα φρεάτια πλένονται τρεις φορές με 150 μl διαλύματος πλύσεων το οποίο περιέχει το μη ιονικό απορρυπαντικό Tween-20 προκειμένου να ελαττωθούν οι μη ειδικές αντιδράσεις. Ακολουθεί τοποθέτηση 100 μl διαλύματος Superblock σε κάθε φρεάτιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Το διάλυμα αυτό δεσμεύει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης της AGE-BSA αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.

Αφού η πλάκα πλένεται τρεις φορές με διάλυμα πλύσεων σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 10 μl του υπό εξέταση ορρού ή ορρού με γνωστή συγκέντρωση AGEs αραιωμένα σε διάλυμα αραιώσης. Ακολούθως προστίθενται σε όλα τα φρεάτια 50 μl αντισώματος anti- AGE σε διάλυμα αραιώσης που περιέχει 2 % φυσιολογικό ορρό αιγός (normal goat serum – NGS), για τη δέσμευση με το οποίο θα ανταγωνιστούν τόσο τα περιεχόμενα στους ορρούς AGEs όσο και τα προσδεδεμένα στα φρεάτια της δοκιμασίας.

Μετά την επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με ήπια ανάδευση και την πλύση της τρεις φορές με το διάλυμα πλύσεων προστίθενται σε κάθε φρεάτιο 50 μl από το δευτερογενές αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό έχει αναπτυχθεί σε αίγες εναντίον της ανοσοσφαιρίνης IgG των μυών και είναι

συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά την πλύση τρεις φορές των φρεατίων με το διάλυμα πλύσεων προστίθεται σε κάθε ένα 100μl φωσφορικής π-νιτροφαινόλης (pNPP), η οποία είναι το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης. Σε 30 - 60 λεπτά με φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 405 nm υπολογίζεται η οπτική πυκνότητα (ΟΠ) καθενός φρεατίου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως B/Bo , υπολογίζονται δε ως [πειραματική ΟΠ – ΟΠ υποβάθρου (δηλ. χωρίς αντίσωμα)]/[ολική ΟΠ (δηλ. χωρίς ανταγωνιστή – AGE-BSA στο φρεάτιο) – ΟΠ υποβάθρου].

Η ευαισθησία της δοκιμασίας εξαρτάται από τη σύνδεση των AGEs με το αντίσωμα, δηλαδή τη φύση του αντισώματος, την αραίωση των δειγμάτων αλλά και από τη συγκέντρωση του διαλύματος επικάλυψης των φρεατίων. Ο προσδιορισμός των AGEs στον ορρό, συνεπώς προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δοκιμασία γίνεται σε αυθαίρετες μονάδες. Ως 1 μονάδα AGE ορίζεται το μέσο ποσοστό αναστολής που προκύπτει από την αραίωση φυσιολογικού ανθρώπινου ορρού 1 : 5 και το ποσό των AGEs στο φυσιολογικό ανθρώπινο ορρό. AGE-BSA σε γνωστές συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο - ανταγωνιστής της πρόσδεσης του αντισώματος με σκοπό τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς (0,1 - 100 μονάδες AGEs/ml). Η τιμή των AGEs στα υπό εξέταση δείγματα υπολογίζεται με λογιστική παλινδρόμηση της καμπύλης αναφοράς.

2.3.2 Ειδικότητα του αντισώματος αντί-AGE (6D12)

Το 6D12 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπου με ειδικότητα στη κοινή δομή που φέρουν οι AGE-πρωτεΐνες. Ο επίτοπος του 6D12 είναι η N3-καρβοξυμεθυλ-λυσίνη (CML)-πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει ακόμα την καρβοξυαιθυλ-λυσίνη και δεν αναγνωρίζει τα πρώιμα προϊόντα, όπως οι βάσεις Schiff και τα προϊόντα Amadori . Ωστόσο, επιδεικνύει θετική αντίδραση σε AGE-δείγματα που έχουν προέλθει από πρωτεΐνες, παράγωγα της λυσίνης ή μονοαμινο καρβοξυλικά οξέα. Ανοσολογικές μελέτες με τη χρήση του 6D12 έδειξαν

την παρουσία από AGE-τροποποιημένων πρωτεϊνών σε διάφορους ανθρώπινους ιστούς, δηλώνοντας την εγκυρότητα του στη βιοχημική ποσοτικοποίηση των AGE-τροποποιημένων πρωτεϊνών. Το αντίσωμα χρησιμοποιείται στη διεθνή βιβλιογραφία για την ανίχνευση AGEs τόσο με τη μέθοδο ELISA σε συγκέντρωση 0,1-0,5 µg/ml όσο και με την ανοσοιστοχημεία σε συγκέντρωση 2 µg/ml.

2.4. Ανοσοιστοχημεία

Για την ανίχνευση των AGEs και του υποδοχέα RAGE στους ιστούς των πειραματόζων ακολουθείται η ανοσοιστοχημική διαδικασία που έχει περιγραφεί από την κ Διαμάντη κ.α. (Diamanti-Kandarakis et al, 2007a; Diamanti-Kandarakis et al, 2007b).

Συγκεκριμένα τομές προστάτου και όρχεων μονιμοποιημένες σε φορμαλίνη και εγκλεισμένες σε παραφίνη, αποπαραφινώνονται με ξυλένιο και αφυδατώνονται με αιθανόλη. Οι τομές επεξεργάζονται αρχικά με υπεροξείδιο του υδρογόνου 3% σε φωσφορικό διάλυμα άλατος (PBS) για 15 λεπτά και έπειτα με PBS. Για την αύξηση της ανοσοδραστικότητας των AGEs, οι τομές τοποθετούνται σε 500ml διαλύματος κιτρικού οξέος 0.01M (pH 7.0) και θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 500W για 5 λεπτά. Μετά από εκτενή πλύση, οι τομές επωάζονται με φυσιολογικό ορό κόνικλου για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προς αποφυγή της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, οι τομές επωάζονται για όλο το βράδυ στους 4°C με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-AGE, 6D12 (0.25 mg/ml stock, 1:50 αραίωση) ή με μονοκλωνικό αντίσωμα αιγός αντι-RAGE (0.25ml, 1:400 αραίωση) σε PBS που περιέχει 1% αλβουμίνη βοείου ορού. Η ανοσοδραστικότητα ανιχνεύεται με τη μέθοδο του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης σύμφωνα με τις οδηγίες. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης γίνεται ορατό με τη χρήση της τετραϋδροχλωρικής 3,3'-διαμινοβενζιδίνης. Τομές πνευμονικού ιστού από διαβητικούς επίμυες χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για τα αντισώματα των AGE και RAGE. Αρνητικοί μάρτυρες (π.χ. ορχικός ή προστατικός ιστός στον οποίο το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε με μη ανοσοποιημένο ορό μύος ή

αιγός) χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε σειρά πειραμάτων. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων εκτιμήθηκε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Η εκτίμηση της χρώσης των τομών πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητα από δύο παθολογοανατόμους. Η ένταση της χρώσης AGE και RAGE ημιποσοτικά εκτιμήθηκε και διαβαθμίσθηκε σε 4 επίπεδα +/- πολύ ασθενής, + ασθενής, ++ μέτρια, +++ ισχυρή. Η έκφραση των AGEs και του RAGE κατηγοριοποιήθηκε σε 4 επίπεδα ανάλογα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων ως ακολούθως, ελάχιστη (1–10% των κυττάρων), χαμηλή (11–30% των κυττάρων), μέτρια (31–60% των κυττάρων) και εκτεταμένη (>60% των κυττάρων). Τα δεδομένα ημιποσοτικής ανάλυσης παρουσιάστηκαν ως Hscore, το οποίο προκύπτει από τη μέση ένταση των ανοσοθετικών κυττάρων πολλαπλασιασμένη επί το ποσοστό των κυττάρων που παρουσιάζουν θετική χρώση

2.4.1 Ειδικότητα του αντισώματος αντι-RAGE

Το μονοκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι ανθρώπου αντι-RAGE είναι αντιορός που παρασκευάσθηκε από ένα συνθετικό πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 42-59 του αμινοτελικού άκρου της ανθρώπινης πρωτεΐνης RAGE (42 PKKPPQRLEWKLNTGRTE59) και όχι της μορφής εναλλακτικού ματίσματος esRAGE (στα καρβοξυτελικά αμινοξέα 332EGFDKVVREAEDSPQH347). Αυτός ο αντιορός έχει δείξει ανοσοδραστικότητα με το μη συζευγμένο ανοσοποιητικό πεπτίδιο μέσω ELISA και έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανοσοϊστοχημική σήμανση αγγείων από διαβητικούς ιστούς και νευρώνων από τους εγκεφάλους ασθενών που πάσχουν από Alzheimer μονιμοποιημένων σε φορμαλίνη και παραφινωμένων (σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή)

2.5. Αξιολόγηση του οξειδωτικού stress στα δείγματα ορού – Δοκιμασία Oxystat

Το οξειδωτικό status στα δείγματα ορού εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της συγκέντρωσης ολικών υπεροξειδίων με τη δοκιμασία OxyStat της Biomedica (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria), ακολουθώντας το πρωτόκολλο που

προτείνεται από την εταιρεία παρασκευής. Εν συντομία, το kit ανιχνεύει συγκεντρώσεις υπεροξειδίων με βάση την αντίδραση των βιολογικών υπεροξειδίων με την υπεροξειδάση και μια αντίδραση ακολούθως με χρωμογόνο που χρησιμοποιεί τη 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ως υπόστρωμα. Μετά την προσθήκη διαλύματος για να σταματήσει η αντίδραση, φωτομέτρηση στα 450 nm επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου χρώματος. Διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των βιολογικών υπεροξειδίων σε κάθε δείγμα. Η συγκέντρωση καταγράφεται ως ισοδύναμα H₂O₂ (μmol/L). Τα αποτελέσματα της μεθόδου δείχνουν μια άμεση συσχέτιση μεταξύ των ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου και των κυκλοφορούντων βιολογικών υπεροξειδίων, η οποία επιτρέπει την αξιολόγηση του οξειδωτικού status των βιολογικών δειγμάτων. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (intra-assay coefficient of variation) αναφέρεται από τον παρασκευαστή του kit ως 3.1% σε μία μέση συγκέντρωση υπεροξειδίων 221 μmol/l, SD = 6.9 μmol/l.

2.6. Αξιολόγηση της απόπτωσης

Τα αποπτωτικά κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο μέσω ενός μονοκλωνικού αντισώματος (mAb) που αναγνωρίζει εκτεθειμένες μονόκλωνες (ss) περιοχές στο DNA των αποπτωτικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως από την κυρία Κορκολοπούλου κ συν. (Korkoloroulou et al, 2000). Αυτό το αντίσωμα (Mab F7-26; Apostain, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) επιτρέπει την διάκριση μεταξύ αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων. Εν συντομία, σύμφωνα με το πρωτόκολλο από τον κατασκευαστή, μονιμοποιημένες σε φορμαλδεΰδη και εγκλεισμένες σε παραφίνη τομές ιστών επωάστηκαν για 20 λεπτά με 0.1mg/mL σαπωνίνης σε PBS, ακολουθούμενη από επεξεργασία με 20 mg / ml πρωτεϊνάσης K για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλύση με απεσταγμένο νερό. Οι τομές στη συνέχεια επωάστηκαν σε ένα υδατικό 50% διάλυμα φορμαμίδιου στους 56 °C για 20 λεπτά, πλύθηκαν επί 5 λεπτά σε ψυχρό

PBS, εκτέθηκαν σε 3% H₂O₂ σε PBS για 5 λεπτά και ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό. Μη ειδική σύνδεση μπλοκαρίστηκε με 3% αποβουτυρωμένο γάλα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές επώαστηκαν με το mAb F7-26 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια με ένα αντίσωμα έναντι της IgM ποντικού (αραίωση 1:100) για άλλα 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε χρήση διαμινοβενζιδίνης ως χρωμογόνου και μετέπειτα αντι-χρώση με αιματοξυλίνη ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Η ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων βασίστηκε στο συνολικό αριθμό ssDNA-θετικών κυττάρων με αποπτωτική μορφολογία που μετρήθηκαν σε πέντε τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία σε x200 μεγέθυνση. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε περιστατικό λεμφώματος Burkitt. Τα θετικά κύτταρα μετρήθηκαν χωρίς προηγούμενη γνώση των πειραματικών συνθηκών.

2.7. Μορφομετρικές αναλύσεις

Ένα τμήμα του προστατικού αδένου από κάθε ποντικό, το οποίο περιλαμβάνει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα των πλάγιων λοβών και της ουρήθρας, διατομές από αμφοτέρες τις σπερματοδόχες κύστεις με τον πηκτικό λοβό (πρόσθιο λοβό του προστάτη), καθώς επίσης και τον κοιλιακό λοβό κοντά στην ουροδόχο κύστη μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα 10% φορμόλης. Ομοίως, τομές ορχικού ιστού υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με συνήθεις ιστολογικές μεθόδους. Διαδοχικές τομές πάχους 4 - 5mm του μονιμοποιημένου προστάτη και των όρχεων αφού αποπαραφινώθηκαν υπεβλήθησαν σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης προκειμένου να ακολουθήσει μικροσκοπική αξιολόγηση. Επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του αυλού των αδενίων και τα στρωματικά κύτταρα από τον κοιλιακό λοβό του προστάτη εξετάστηκαν περαιτέρω για αξιολόγηση της αρχιτεκτονικής του αδένου σε όλα τα ζώα της κάθε ομάδας, χρησιμοποιώντας x 200 μεγέθυνση. Ο βαθμός πτύχωσης του βλεννογόνου αξιολογήθηκε σε τρία επίπεδα, δηλαδή 0: χαμηλή ή μηδενική 1: μέτρια 2: η κανονική.

2.8. Αξιολόγηση της σπερματογένεσης

Η ωριμότητα του γεννητικού επιθηλίου βαθμολογήθηκε χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο Johnsen score που αρχικά περιγράφηκε για την αξιολόγηση βιοψιών όρχεων (Guneli et al, 2008; Johnsen, 1970). Τουλάχιστον 50 σωληνάρια αξιολογήθηκαν για κάθε όρχι και η μέση βαθμολογία κατά Johnsen ανά ποντικό υπολογίστηκε στη συνέχεια. Δόθηκε ένας βαθμός από 1 έως 10 σε κάθε διατομή σωληναρίων σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: 10 = πλήρης σπερματογένεση και τέλεια σωληνάρια 9 = πολλά σπερματοζωάρια παρόντα και ανοργάνωτη σπερματογένεσης 8 = λίγα μόνο σπερματοζωάρια παρόντα 7 = καθόλου σπερματοζωάρια, αλλά πολλές σπερματίδες παρούσες 6 = λίγες μόνο σπερματίδες παρούσες 5 = καθόλου σπερματοζωάρια ή σπερματίδες αλλά πολλά σπερματοκύτταρα παρόντα 4 = λίγα μόνο σπερματοκύτταρα παρόντα 3 = μόνο σπερματογόνια παρόντα 2 = απουσία γεννητικών κυττάρων, μόνο τα κύτταρα Sertoli παρόντα 1 = Ούτε γεννητικά κύτταρα ούτε κύτταρα Sertoli υπάρχουν.

2.9. Η μέτρηση της διαμέτρου των σπερματικών σωληναρίων

Τα 10 πιο κυκλικά σπερματικά σωληνάρια τυχαία προσδιορίζονταν σε κάθε τομή των όρχεων και η διάμετρός τους μετρήθηκε με ένα οφθαλμικό μικρόμετρο χρησιμοποιώντας τη μεγέθυνση x10 στο φακό. Η μέση διάμετρος σπερματικών σωληναρίων (σε μικρόμετρα) στη συνέχεια προσδιορίζεται για κάθε όρχι.

2.9. Μέτρηση του πάχους της μεμβράνης των σπερματικών σωληναρίων (seminiferous tubule basement membrane - STBM)

Τομές πάχους 5 μικρομέτρων που λαμβάνονται αντιπροσωπευτικά από κάθε ζώο αναλύθηκαν στο μικροσκόπιο μέσω συνδεδεμένου συστήματος video camera και ανάλυσης εικόνας με τη χρήση λογισμικού Image-Pro Plus v.6.0 (Media

Cybernetics, Rockville, MD, USA). Η μέτρηση διεξήχθη σε 10 τυχαία επιλεγμένες STBMs και βγήκε ο μέσος όρος.

2.10. Στατιστική ανάλυση

Ποσοτικές μεταβλητές που ακολουθούν κανονική κατανομή εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm 1τυπική απόκλιση ενώ σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής ως διάμεσος (διατεταρτημοριακό εύρος). Το τεστ Kolmogorov – Smirnov και γραφικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί αν οι συνεχείς μεταβλητές ακολουθούν κανονική κατανομή (Gaussian).

Συγκρίσεις μεταξύ περισσότερων των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance - ANOVA). Το Kruskal-Wallis test ήταν η μη παραμετρική δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις πολλαπλών ομάδων, με τη χρήση του Mann-Whitney's U test και false discovery rate (FDR) για πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη προς εντοπισμό στατιστικώς σημαντικών διαφορών (post hoc multiple testing).

Συγκρίσεις μεταξύ περισσότερων των δύο διαφορετικών μετρήσεων μιας μεταβλητής πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση διασποράς επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures ANOVA) καθώς και με Friedman's test και Wilcoxon's signed rank test με FDR, ως μη παραμετρικές δοκιμασίες.

Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson και του Spearman (ρ) υπολογίστηκε για την αξιολόγηση της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών.

Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχου πολλαπλών υποθέσεων, οι μεταξύ των ομάδων διαφορές αξιολογήθηκαν με FDR και η πιθανότητα family-wise error ορίστηκε <0.05 .

Όλες οι δοκιμασίες ήταν 2 κατευθύνσεων. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές εάν η μηδενική υπόθεση μπορούσε να απορριφθεί με >95% εμπιστοσύνη ($p < 0.05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σωματομετρικές, βιοχημικές και ορμονικές παράμετροι

Τα αποτελέσματα των σωματομετρικών και μεταβολικών παραμέτρων που μελετήθηκαν σε όλες τις ομάδες πειραματόζων στις διάφορες φάσεις της πειραματικής μελέτης συνοψίζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4 Σωματομετρικά, βιοχημικά, ορμονικά δεδομένα και οξειδωτικό status

Έναρξη	Μάρτυρες	MUFA	MUFA-SAFA	SAFA
TC (mg/dl)	129 ± 25*	144 ± 35	141 ± 22	135 ± 19
LDL- C (mg/dl)	61 ± 21*	69 ± 29	72 ± 21	64 ± 16
HDL-C (mg/dl) _	60 ± 13*	64 ± 14	62 ± 12	60 ± 9
TG (mg/dl)	43 ± 7	59 ± 45	52 ± 12	53 ± 20
Βάρος (g)	25 ± 2*	27 ± 2	26 ± 3	23 ± 3
	Τροφή μαρτύρων	Πλούσια σε SAFA τροφή		
8^η εβδομάδα				
TC (mg/dl)	95 ± 13	179 ± 35 [†]		
LDL- C (mg/dl)	48 ± 5	81 ± 15 [†]		
HDL-C (mg/dl) _	36 ± 1	87 ± 25 [†]		
TG (mg/dl)	54 ± 20	56 ± 18		
Βάρος (g)	28 ± 2	35 ± 5 [†]		
	Τροφή μαρτύρων	Αλλαγή τροφής		
24^η εβδομάδα	Μάρτυρες	MUFA	MUFA-SAFA	SAFA
TC (mg/dl)	88 ± 16 [‡]	116 ± 22 ^{‡,§}	98 ± 25 ^{‡,§}	204 ± 69
LDL- C (mg/dl)	27 ± 11 [‡]	42 ± 20 ^{‡,§}	38 ± 15 ^{‡,§}	94 ± 30
HDL-C (mg/dl) _	46 ± 7 [‡]	64 ± 6 [§]	47 ± 14 ^{‡,§}	94 ± 47
TG (mg/dl)	75 ± 9	52 ± 13 [‡]	65 ± 19 [§]	81 ± 20 [§]
Βάρος (g)	31 ± 2 ^{‡, **}	34 ± 4 [‡]	30 ± 4 ^{‡,§}	41 ± 3 [§]
Τεστοστερόνη	24.67 ± 2.93	22.7 ± 11.24	20.1 ± 10.65	23.5 ± 5.28
Oxystat (μmol/l)	196.74 ± 18.14	86.45 ± 69.16	183.22 ± 260.76	40.89 ± 27.68
AGEs ορού (U/ml)	4.75 ± 1.07	4.6 ± 1.09	4.91 ± 1.67	4.62 ± 0.98

* , § , ** p < .05 σε σύγκριση με τις μετρήσεις 8^{ης} εβδομάδας.

† p < .05 σε σύγκριση με τις μετρήσεις στην αρχή του πειράματος.

‡ p < .05 σε σύγκριση με τις μετρήσεις της ομάδας SAFA την 24^η εβδομάδα

Πριν την τυχαιοποίηση στις τέσσερις πειραματικές ομάδες, δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς την ολική χοληστερόλη, την λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) και τα Τριγλυκερίδια ή το σωματικό βάρος.

Μετά τις πρώτες 8 εβδομάδες της μελέτης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του βάρους των ζώων τόσο στην ομάδα των μαρτύρων όσο και στο σύνολο των ζώων με πλούσια σε SAFA τροφή. Οι τιμές ολικής χοληστερόλης και HDL ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τις μετρήσεις στην αρχή της μελέτης ($p < .05$) στους μάρτυρες, ενώ στις υπόλοιπες τρεις ομάδες που τρέφονταν με υψηλής περιεκτικότητας σε SAFA τροφή ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τα επίπεδα πριν την έναρξη της διατροφής ($p < .05$).

Στο τέλος της πειραματικής μελέτης (24η εβδομάδα) το σωματικό βάρος των μαρτύρων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σύγκριση με την 8η εβδομάδα ($p < .05$). Ωστόσο στη φάση αυτή δεν διαφέρει σημαντικά από τις μετρήσεις των πειραματοζώων της ομάδας MUFA και MUFA-SAFA ($p > .05$). Η χορήγηση τόσο της πλούσιας σε MUFA όσο και της ίσης περιεκτικότητας MUFA και SAFA τροφής οδήγησε σε σημαντική μείωση, της ολικής χοληστερόλης, της HDL και της LDL σε σύγκριση με τις μετρήσεις κατά την 8η εβδομάδα της μελέτης ($p < .05$), ενώ η τελευταία προκάλεσε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων ($p < .05$) κατά την ίδια περίοδο. Οι δύο χαμηλής περιεκτικότητας σε SAFA διατροφές επανέφεραν στο τέλος της μελέτης τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και της LDL σε χαμηλά επίπεδα, μη στατιστικά σημαντικά διαφορετικά από αυτά των μαρτύρων.

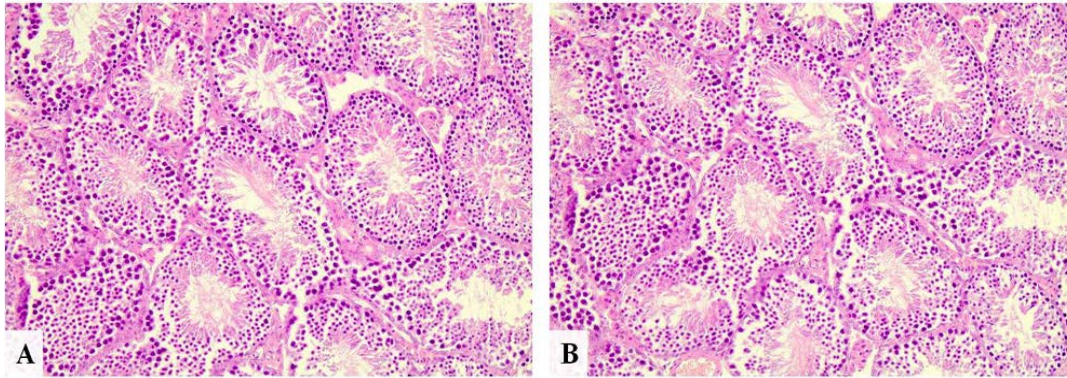
Είναι ενδιαφέρον ότι τα πειραματόζωα που τρέφονταν με υψηλής συγκέντρωσης SAFA τροφή για 16 εβδομάδες παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικής χοληστερόλης και LDL σε σύγκριση τόσο με τους μάρτυρες όσο και με τις ομάδες MUFA και MUFA-SAFA ($p < .05$). Στην ίδια περίοδο οι τιμές της HDL στην ομάδα SAFA ήταν σημαντικά αυξημένες σε σύγκριση με τους μάρτυρες την ομάδα MUFA-SAFA, ενώ στην ομάδα MUFA παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($p < .05$ vs SAFA).

Κατά την ολοκλήρωση της πειραματικής μελέτης οι συγκεντρώσεις της τεστοστερόνης δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των 4 ομάδων πειραματοζώων. Παράλληλα τόσο τα επίπεδα AGEs στον ορρό των πειραματοζώων όσο και των υπεροξειδίων δεν διέφεραν σημαντικά στις 4 πειραματικές ομάδες.

3.2 Ιστολογική αξιολόγηση των όρχεων

Παρά το γεγονός ότι η μονιμοποίηση των όρχεων έγινε σε διάλυμα φορμαλίνης που διαταράσσει τη συνολική αρχιτεκτονική των σπερματικών σωληναρίων και προκαλεί οίδημα του διαμέσου ιστού, συνολικά η σπερματογένεση σε όλα τα πειραματόζωα φαίνεται να διατηρείται ενώ διακριτά ώριμα κύτταρα Leydig στο διάμεσο ιστό καταγράφονται. Τα σπερματικά σωληνάκια τόσο των ζώων της ομάδας ελέγχου όσο και των εκτεθειμένων στα υψηλά λιπαρά παρουσίασαν ωρίμανση του σπερματικού επιθηλίου που συγκλίνει σε ώριμες σπερματίδες και μερικά σπερματοζωάρια με καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων των ζώων που τρέφονται υψηλή σε λιπαρά διατροφή, αν και ο αριθμός των ώριμων σπερματοζωαρίων φαινόταν να είναι χαμηλότερος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρόλο που δεν διαπιστώθηκε πλήρης σπερματογένεση σε κανένα σωληνάριο ο αυλός κάποιων σωληναρίων φαίνεται να περιέχει ελεύθερα σπερματοζωάρια (Εικόνα 3).

Εικόνα 3. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τομές όρχεων ποντικών με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. (Α) Όρχις ποντικού μάρτυρα (Β) Όρχις ποντικού από την ομάδα SAFA. Ο διαχωρισμός του σπερματικού επιθηλίου από τη βασική μεμβράνη, η αλλοίωση της αρχιτεκτονικής των σπερματικών σωληναρίων και το οίδημα του διαμέσου ιστού πιθανώς οφείλεται στην επιδραση της φορμόλης αλλά η σπερματογένεση διατηρείται χωρίς διαφοροποίηση στις διάφορες ομάδες πειραματισμού (x200 μεγέθυνση).



3.2 Μορφομετρική ανάλυση της διαμέτρου των σπερματικών σωληναρίων και του πάχους της βασικής μεμβράνης

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάμετρο των σπερματικών σωληναρίων των διαφορετικών ομάδων της μελέτης ($p > .05$). Η μορφομετρική ανάλυση ανέδειξε σημαντική μείωση του πάχους της βασικής μεμβράνης στα ζώα με αυξημένη πρόσληψη λιπαρών (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA) σε σχέση με τους μάρτυρες ($p = .05$, Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Ιστολογικά δεδομένα και αριθμός αποπτωτικών κυττάρων στις διάφορες ομάδες πειραματόζων

	Μάρτυρες	MUFA	MUFA-SAFA	SAFA
Διάμετρος Σπερματικών σωληναρίων μm	495 \pm 112	521 \pm 84		
Πάχος βασικής μεμβράνης μm	14,74 \pm 8,65	8,59 \pm 2,6*		
Απόπτωση	1(2)	5(6) [†]	4(6,25) [†]	3,5(3,75) [†]
Πτύχωση προστατικού βλεννογόνου	2 (0,5)	1,5(1) [‡]	1(1) [†]	0(1) [†]

* $p = 0.05$ σε σύγκριση με μάρτυρες

† $p < .05$ σε σύγκριση με μάρτυρες

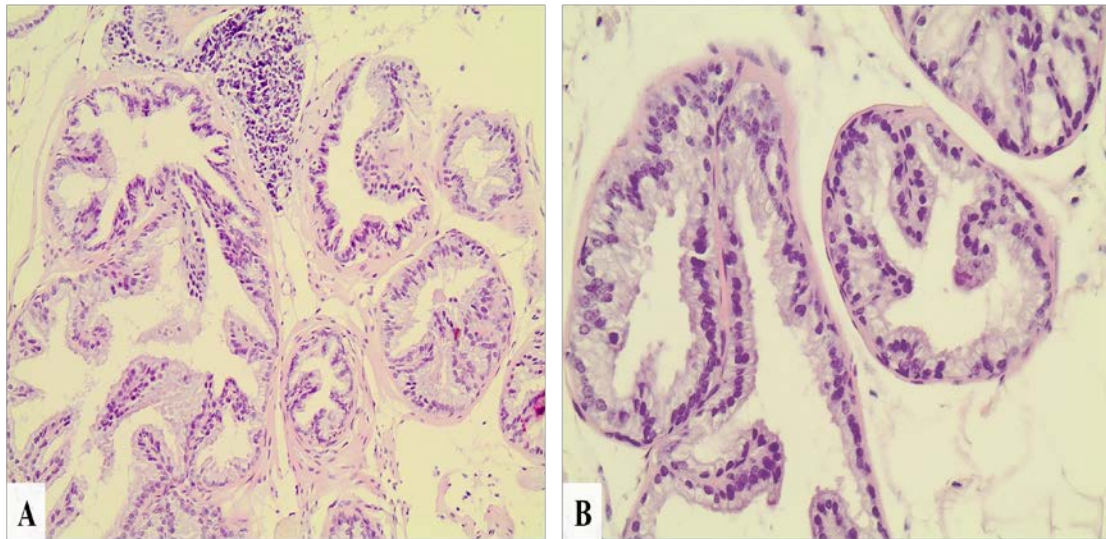
‡ $p < .05$ σε σύγκριση με SAFA

3.3 Ιστολογικά ευρήματα προστάτη

Μακροσκοπικά, οι προστάτες των πειραματοζώων δεν παρουσίαζαν κάποιες διαφορές. Ιστολογικά το αδενικό στοιχείο ήταν σωληνοκυψελώδους τύπου και αποτελούνταν από λόβια διαφορετικών μεγεθών με φυσιολογική πτύχωση του βλεννογόνου στους μάρτυρες. Το επιθήλιο αποτελούνταν κυρίως από υψηλά κυλινδρικά εκκριτικά κύτταρα περιβαλλόμενα από μυϊκό-ινοκολλαγόνωδες στρώμα.

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων της μελέτης ήταν η μείωση της πτύχωσης του βλεννογόνου των αδενίων στον κοιλιακό προστάτη των ζώων με υψηλή πρόσληψη λιπαρών (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA) σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < .01$). Ειδικότερα ο αδενικός βλεννογόνος των πειραματοζώων των ομάδων MUFA-SAFA και SAFA παρουσίασε λιγότερη πτύχωση σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p = .032$ και $p = .012$, αντίστοιχα) ενώ η χορήγηση της υψηλής σε MUFA τροφής οδήγησε σε σημαντική αύξηση της πτύχωσης σε σχέση με την ομάδα SAFA ($p = .015$, Πίνακας 5). Το εκκριτικό επιθήλιο περιλαμβάνει κυρίως υψηλά κυλινδρικά κύτταρα των οποίων ο πυρήνας έχει σχήμα στρογγύλο και βρίσκεται τοποθετημένος στην βάση του κυττάρου (περιφερικά αδένια) ή στην κορυφή (κεντρικότερα αδένια). Δεν υπήρχαν ενδείξεις ατροφίας του κυτταροπλάσματος των κυττάρων που επενδύουν τον αυλό των αδενίων ή διαφοροποίησης της αναλογίας του επιθηλίου σε σχέση με το στρώμα στους προστατικούς αδένες των ζώων με υψηλή πρόσληψη λιπαρών στη διατροφή τους (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA) σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Εικόνα 4, Πίνακας 5). Επίσης η πτύχωση του βλεννογόνου παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη των πειραματοζώων ($r = -0.28$, $p < .05$).

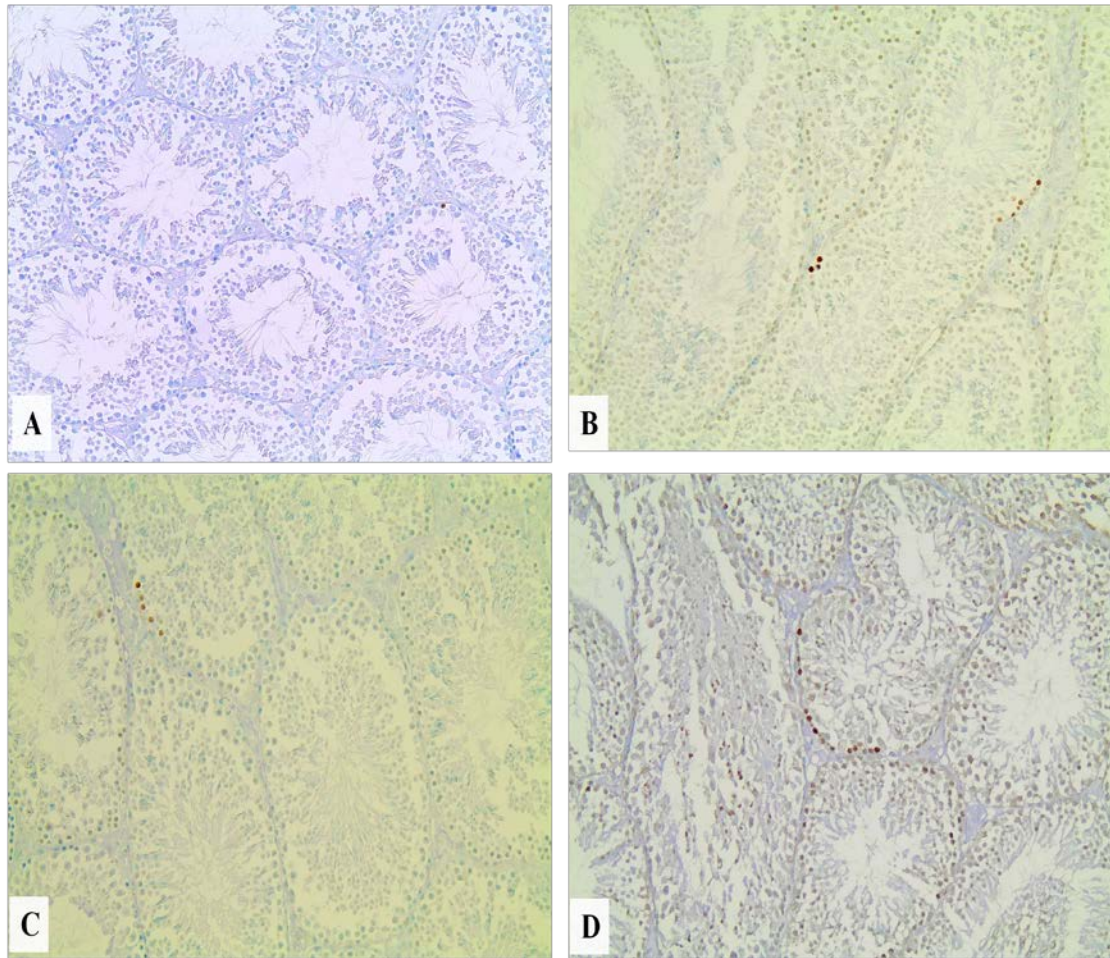
Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από τομές προστάτου ποντικών με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. (Α) Κοιλιακός λοβός προστάτη ποντικού μάρτυρα (Β) Κοιλιακός λοβός προστάτη ποντικού από την ομάδα SAFA. Ελάττωση της βλεννογονικής πτύχωσης σε σύγκριση με τους μάρτυρες είναι ορατή (x200 μεγέθυνση).



3.4 Αξιολόγηση της απόπτωσης

Συνολικά στην ομάδα των μαρτύρων ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων ήταν μικρός. Στο σύνολο των ζώων με υψηλή πρόσληψη λιπαρών στη διατροφή (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA) ωστόσο παρατηρήθηκε εντόπιση αποπτωτικών κυττάρων στα πρώιμα στάδια σπερματογένεσης, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές των μαρτύρων ($p < .005$). Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις επιμέρους ομάδες σε σχέση με τους μάρτυρες (MUFA $p = .012$, MUFA-SAFA $p = .026$, SAFA $p = .012$, Εικόνα 5, Πίνακας 5).

Εικόνα 5 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες τομών όρχεως των ποντικών με χρώση anti-ssDNA. (A) Μάρτυρες (B) MUFA (C) MUFA-SAFA (D) SAFA. Αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων αναγνωρίζεται στο σύνολο των ζώων που έλαβαν υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά τροφή σε σύγκριση με τους μάρτυρες



3.5 Ανοσοιστοχημική έκφραση AGE στους όρχεις, τις επιδιδυμίδες και τον προστάτη

Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των AGE στους όρχεις ακολουθεί ενιαίο πρότυπο κατανομής στο κυτταρόπλασμα όλων των γεννητικών κυττάρων ανεξαρτήτως σταδίου διαφοροποίησης και ωρίμανσης καθώς και στα κύτταρα Leydig όλων των ομάδων της μελέτης. Η ένταση της χρώσης ήταν ισχυρότερη στο σπερματικό επιθήλιο κοντά στη βασική μεμβράνη των σωληναρίων.

Η εναπόθεση των AGE στο σπερματικό επιθήλιο ήταν εκτενέστερη στα πειραματόζωα της ομάδας SAFA και λιγότερο εκτενής στις ομάδες MUFA and MUFA-SAFA σε σύγκριση με τους μάρτυρες (SAFA vs μάρτυρες $p = .018$). Στο σύνολο των ζώων με υψηλή πρόσληψη λιπαρών στη διατροφή (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA)

όταν συγκρίθηκε σε σχέση με τους μάρτυρες, η έκφραση AGE ήταν πιο ισχυρή τόσο ως προς την ένταση όσο και προς το H-score ($p < .05$ και για τις δύο μεταβλητές). Επίσης το ποσοστό των AGE-ανοσοθετικών Leydig κυτταρων ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p < .05$, Πίνακας 6, Εικόνα 6). Στο τέλος της πειραματικής μελέτης η τροφή MUFA-SAFA οδήγησε σε μείωση των AGE σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των μαρτύρων.

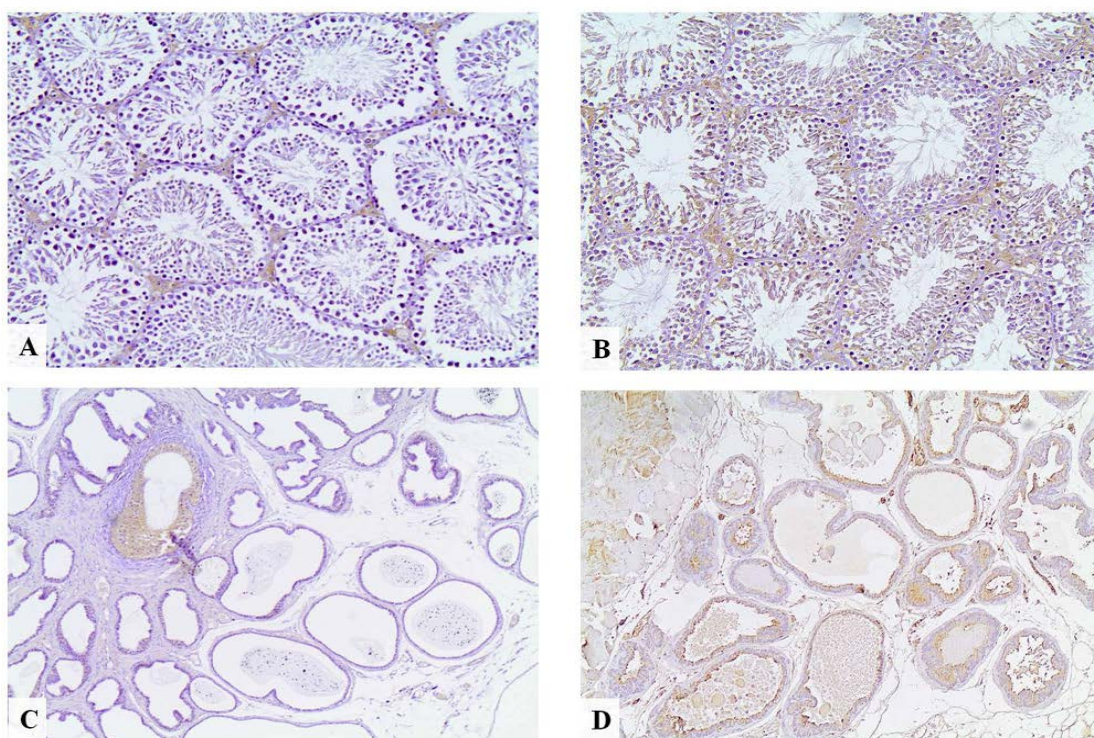
Πίνακας 6. Ανοσοϊστοχημικά δεδομένα AGE χρώσης

	Μάρτυρες	MUFA	MUFA-SAFA	SAFA	<i>p</i> value
AGE Έκφραση					
Σπερματοκύτταρα	5 (15)	20 (58.75)	10 (75)	10 (77)	< .05
Κύτταρα Leydig	30 (87.5)	90 (20)	80 (30)	90 (35)	< .05
Προστάτης	0 (35)	15 (41.25)	30 (80)	10 (30)	
Ένταση AGE χρώσης					
Σπερματοκύτταρα	1 (1)	1.5 (2.25)	1 (1)	2 (2)*	< .05
Κύτταρα Leydig	1 (2.5)	2 (1.25)	2 (1)	3 (2)	
Προστάτης	0 (1.5)	1 (0.25)	1 (1)	1 (2)	
AGE H-Score					
Σπερματοκύτταρα	5 (15)	30 (138.75)	20 (55)	30 (207)	< .05
Κύτταρα Leydig	30 (267.5)	180 (177.5)	160 (120)	270 (210)	
Προστάτης	0 (65)	17.5 (41.25)	30 (90)	20 (50)	

p value για τη σύγκριση της ομάδας μαρτύρων με το σύνολο των πειραματοζώων με πλούσια σε λιπαρά τροφή (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA)

* $p = .018$ vs Μάρτυρες

Εικόνα 6 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες χρώσης AGE σε τομές όρχεων και προστάτου των πειραματοζώων. (A) Όρχις Μαρτύρων (B) Όρχις SAFA Η χρώση AGE είναι πιο εμφανής στα σπερματοκύτταρα της ομάδας SAFA σε σχέση με τους μάρτυρες. (C) Προστάτης Μαρτύρων (D) Προστάτης SAFA. AGE θετικά κύτταρα είναι εμφανή μόνο σε ζώα με πλούσια σε λιπαρά τροφή (x200 μεγέθυνση).



Τα επιθηλιακά κύτταρα της επιδιδυμίδας ήταν ανοσοδραστικά για AGE με κυτταροπλασματική εντόπιση και ασθενέστερη χρώση εγγύτερα στη βασική μεμβράνη. Μία ασθενής αντίδραση παρατηρήθηκε επίσης στο μυϊκό τοίχωμα του οργάνου.

Η ένταση της χρώσης AGE στα γεννητικά κύτταρα παρουσίασε θετική συσχέτιση με διάφορες παραμέτρους του λιπιδαιμικού προφίλ. Συγκεκριμένα στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε με την ολική χοληστερόλη ($r = .37, p < .01$), την HDL ($r = .35, p < .01$) και την LDL ($r = .35, p = .01$). Επιπρόσθετα σημειώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έντασης της AGE χρώσης και του H-score με το σωματικό βάρος των πειραματόζώων ($r = .42, p < .001$) και $r = .27, p < .05$ αντίστοιχα). Η ανοσοδραστικότητα AGE των κυττάρων Leydig και η ένταση της έκφρασης είχε αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($r = -0.39, p = .005$ and $r = -0.36, p < .01$ αντίστοιχα), και θετική με το σωματικό βάρος ($r = .28, p = .05$).

Στον προστατικό ιστό ομοιόμορφη κατανομή των AGE στο επιθήλιο των αδενίων με υψηλότερη ένταση στα κύτταρα που επενδύουν τον αυλό (Εικόνα 6,

Πίνακας 6). Στα ζώα με υψηλή πρόσληψη λιπαρών στη διατροφή (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA) παρατηρήθηκε τάση αυξημένης εναπόθεσης AGE σε σχέση με τους μάρτυρες, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

3.6 Ανοσοιστοχημική έκφραση RAGE στους όρχις, τις επιδιδυμίδες και τον προστάτη

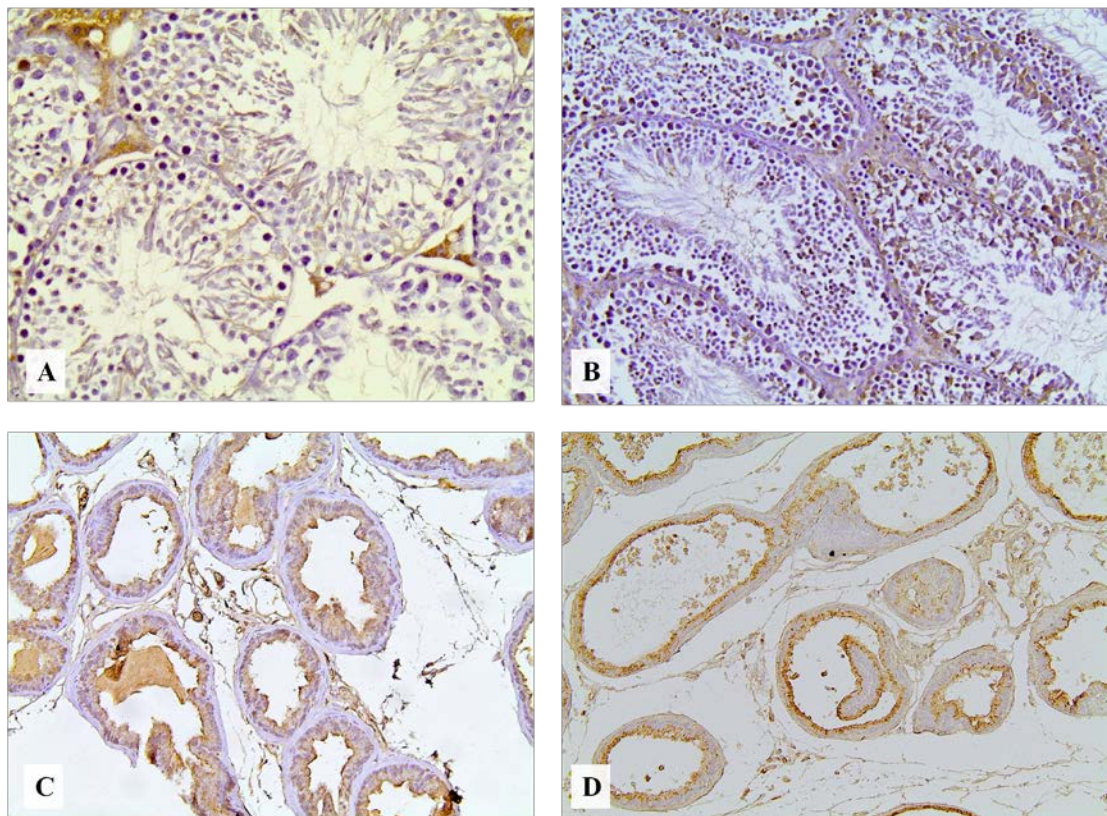
Ακολουθώντας την κατανομή των AGE στους όρχις, κυτταροπλασματική έκφραση του υποδοχέα RAGE παρατηρήθηκε τόσο στα σπερματικά κύτταρα όσο και στα Leydig. Στα κύτταρα Leydig ωστόσο σημειώθηκε και ισχυρή μεμβρανική εντόπιση. Η έκφραση RAGE τόσο στους όρχις όσο και στις επιδιδυμίδες δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων πειραματοζώων.

Στον προστατικό ιστό παράλληλα προς την εναπόθεση AGE η έκφραση RAGE ήταν ισχυρότερη στην επιφάνεια του κυτταροπλάσματος των επιθηλιακών κυττάρων κατά μήκος του αυλού αδενίων και πόρων. (Εικόνα 7, Πίνακας 7).

Πίνακας 7 Ανοσοϊστοχημικά δεδομένα RAGE χρώσης

RAGE	Μάρτυρες	Πλούσια σε λιπαρά (MUFA, MUFA-SAFA, SAFA)
Έκφραση		
Σπερματοκύτταρα	25 (87.5)	70 (50)
Κύτταρα Leydig	65 (82.5)	85 (65)
Προστάτης	40 (85)	90 (30)
Ένταση		
Σπερματοκύτταρα	1.5 (2.75)	2 (1.63)
Κύτταρα Leydig	2 (2.75)	2.75 (1.25)
Προστάτης	2.5 (2.5)	3 (1)
H-score		
Σπερματοκύτταρα	35 (267.5)	130 (167.5)
Κύτταρα Leydig	130 (252.5)	217.5 (222.5)
Προστάτης	90 (260)	270 (90)

Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες χρώσης RAGE σε τομές όρχεων και προστάτου των πειραματοζώων. (A) Όρχις Μαρτύρων (B) Όρχις SAFA Έκφραση RAGE ανιχνεύεται τόσο στο σπερματικό επιθήλιο όσο και στα κύτταρα Leydig. (C) Προστάτης Μαρτύρων (D) Προστάτης SAFA. RAGE ανιχνεύεται στο τμήμα των εκκριτικών κυττάρων που επενδύει τον αυλό των αδενίων (x200 μεγέθυνση).



3.7 Αποτελέσματα μελέτης υπερχοληστερολαιμικής διαίτας

Η επίδραση της υπερχοληστερολαιμικής διατροφής στη μορφολογία του προστάτη ήταν σημαντική (Ploumidou et al, 2010) ενώ η σπερματογένεση δε φάνηκε να επηρεάζεται αντίστοιχα. Στην ομάδα ελέγχου τα αδένια έχουν φυσιολογικό μέγεθος και αριθμό, περιβαλλόμενα από το στρώμα, καλύπτονται δε από φυσιολογικό επιθήλιο που περιλαμβάνει τόσο βασικά όσο και εκκριτικά κύτταρα. Αντιθέτως στην ομάδα της υπερχοληστερολαιμικής διατροφής εμφανίζονται αύξηση των αδενίων τα οποία καλύπτονται από υπερπλαστικά εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν θηλώδεις ενδοαυλικές

προσεκβολές. Τα εκκριτικά κύτταρα είναι κυλινδρικά με άφθονο κυτταρόπλασμα και μερικά εμφανίζουν κενοτόπια γεμάτα με λίπος. Η ιστολογική δομή αυτή του προστάτη ομοιάζει με τις ιστολογικές αλλοιώσεις του προστάτη αρουραίων με μορφολογία πλησιέστερη προς την ανθρώπινη καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (Scolnik et al, 1994).

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη του προστάτη και των όρχεων με τα αντι-AGE και αντι-RAGE αντισώματα αποκαλύπτει πρότυπο κατανομής όμοιο με αυτό στους παχύσαρκους μύες. Συσσώρευση AGE και έκφραση RAGE στους όρχεις παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα όλων των γεννητικών κυττάρων ανεξαρτήτως σταδίου διαφοροποίησης και ωρίμανσης καθώς και στα κύτταρα Leydig όλων των ομάδων της μελέτης. Η ένταση της χρώσης ήταν ισχυρότερη στο σπερματικό επιθήλιο κοντά στη βασική μεμβράνη των σωληναρίων και μειώνεται στις ωριμότερες μορφές κοντά στον αυλό των σωληναρίων. Στον προστατικό ιστό ομοιόμορφη εκλεκτική εναπόθεση των AGE και έκφραση του RAGE στο επιθήλιο των αδενίων με υψηλότερη ένταση στα κύτταρα που επενδύουν τον αυλό. Ωστόσο η έκφραση δεν διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων πειραματισμού.

Η έλλειψη ουσιαστικής διαφοράς στην έκφραση AGE και RAGE στα πειραματόζωα των δύο ομάδων δεδομένης της μη στατιστικά σημαντικής αύξησης των AGE στον ορρό των ζώων με υπερχοληστερολαιμική διατροφή, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η τροφή αυτή δεν είναι ικανή να εγκαταστήσει οξειδωτικό stress εντός του αναπαραγωγικού συστήματος σε τέτοιο βαθμό ώστε να ενεργοποιήσει τον άξονα AGE-RAGE. Έτσι δεν προχώρησαν περαιτέρω οι μορφομετρικές αναλύσεις ή η αξιολόγηση της απόπτωσης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι φυσιολογικοί C57BL6 μύες οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε δυτικού τύπου δυτική διατροφή για 24 εβδομάδες , που είναι γνωστό ότι προκαλεί παχυσαρκία, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGE) στο σπερματικό επιθήλιο και τα κύτταρα Leydig . Αν και η σπερματογένεση δεν επηρεάστηκε συνολικά, αυξημένη απόπτωση παρατηρήθηκε στα σπερματικά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι , η χορήγηση υγιέστερης διατροφής, μετά από υψηλές περιεκτικότητας σε SAFA λιπαρά για 8 εβδομάδες δεν κατάφερε να μειώσει τα επίπεδα AGE στους ιστούς. Επιπλέον, μορφολογικές αλλαγές έχουν ανιχνευθεί στον προστατικό ιστό, που αφορούν κυρίως τη μείωση της πτύχωσης του αδενικού επιθηλίου, η οποία σημαντικά αντιστράφηκε μετά τη χορήγηση τροφής πλούσιας σε MUFA.

Το γενετικά μη τροποποιημένο μοντέλο ποντικού C57BL6 χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη μας , καθώς έχει ήδη αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην εκδήλωση χαρακτηριστικών που προσομοιάζουν στην ανθρώπινη παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο (Collins et al, 2004), όταν τα ζώα έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή που περιέχει υψηλά επίπεδα SAFA, αντιπροσωπευτική της σύγχρονης δυτικού τύπου διατροφής. Το μεταβολικό προφίλ αυτών των ζώων ομοιάζει με την πολύπλοκη ανθρώπινη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση κοιλιακού λίπους, βαθμιαία εγκατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη και αυξημένη αποδοτικότητα της τροφής (βάρος που έχει αποκτηθεί / Kcal που καταναλώνεται), η οποία ορίζεται ως παθητική υπερκατανάλωση. Συνεπώς ποντίκια που τρέφονταν με μια δίαιτα υψηλή σε SAFA στη μελέτη μας είχαν σημαντικά υψηλότερο βάρος σώματος, επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL-χοληστερόλης σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Μια διατροφή πλούσια σε MUFA αντί SAFA ή με ισορροπημένη σύνθεση MUFA - SAFA είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση λιπιδικού προφίλ ανάλογου της ομάδας ελέγχου. Οι δυσμενείς επιπτώσεις της προκαλούμενης από τη διατροφή παχυσαρκίας στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα έχουν μελετηθεί εκτενώς σε C57BL6 ποντίκια, τα οποία βρέθηκαν να έχουν μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και κινητικότητα (Bakos et al, 2011),

μειωμένο δείκτη γονιμότητας (Ghanayem et al, 2010), μικρό αριθμό εμβρύων και ποσοστό εγκυμοσύνης (Mitchell et al, 2011). Ενδιαφέρον είναι ότι ο φαινότυπος υπογονιμότητας φαίνεται να κληρονομείται σε δύο διαδοχικές γενιές αρρένων απογόνων στους οποίους χορηγείται τροφή μαρτύρων (Fullston et al, 2012) .

Μια πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη γονιμότητα, στο πλαίσιο της παχυσαρκίας θα μπορούσε να είναι ο υπογοναδισμός. Ωστόσο, τα επίπεδα τεστοστερόνης δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ των πειραματικών ομάδων της μελέτης μας. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Bakos κ συν. (2011), οι οποίοι βρήκαν ότι η πατρική παχυσαρκία λόγω διατροφής επηρεάζει διάφορες πτυχές της σπερματογένεσης καθώς και της γονιμότητας χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα ανδρογόνων. Μελέτες σε ανθρώπους ως προς το ζήτημα αυτό οδηγούν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, με την πλειοψηφία να σημειώνει υπογοναδισμό σαν αποτέλεσμα της παχυσαρκίας, ενώ μία μελέτη παρουσιάζει αυξημένη βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη και οιστραδιόλη σε παχύσαρκους μη γόνιμους άνδρες (Jarow et al, 1993) και μία άλλη ότι τα επίπεδα αναπαραγωγικών ορμονών δεν επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά τη σχέση μεταξύ ΔΜΣ και της ποιότητας του σπέρματος (Qin et al, 2007). Είναι, ωστόσο, πιθανό ότι είτε οι βλαβερές συνέπειες της προκαλούμενης από τη δίαιτα παχυσαρκίας δεν είναι διακριτές στο ορμονικό προφίλ ή άλλες ενδοκρινικές διαταραχές (επίπεδα λεπτίνης και ινσουλίνης) εμπλέκονται στην αναπαραγωγική δυσλειτουργία (Ghanayem et al., 2010)

Δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας διαφορά στη διάμετρο των σπερματικών σωληναρίων στους όρχεις διαφορετικών ομάδων πειραματοζώων. Το πάχος της βασικής μεμβράνης μειώθηκε στο σύνολο των ζώων που εκτέθηκαν σε υψηλή σε λιπαρά διατροφή σε σύγκριση με τους μάρτυρες, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η σπερματογένεση. Μία λογική ερμηνεία για την παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποτελεί η επίδραση της γήρανσης στους μάρτυρες καθώς επίσης και η έλλειψη της βλαβερής επίδρασης του διαβήτη στα παχύσαρκα πειραματόζωα της εργασίας μας, σε αντίθεση με παλαιότερες (Guneli et al., 2008).

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η ανάλυση σε κυτταρικό επίπεδο των επιδράσεων της προκαλούμενης από τη δίαιτα παχυσαρκίας στο σπερματικό επιθήλιο των πειραματοζώων αποκάλυψε αυξημένο αριθμό αποπτωτικών πυρήνων σε πρώιμα στάδια σπερματογένεσης σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιήθηκε με ανοσοιστοχημική ανίχνευση μονόκλωνου DNA (single-stranded DNA regions) σε αποπτωτικούς πυρήνες που επιτρέπει την αξιόπιστη ανάλυση της απόπτωσης στο μικροπεριβάλλον του όρχεως, χωρίς τη χρήση πολύπλοκων τεχνικών *in situ* υβριδισμού. Η απόπτωση είναι μια θεμελιώδης διαδικασία θανάτου των κυττάρων σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων (Shaha et al, 2010). Η ευαισθησία των γεννητικών κυττάρων στην απόπτωση τα καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως περιβαλλοντικές τοξίνες ή οξειδωτικό stress. Η απόπτωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης έχει υποτεθεί ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα (Shukla et al, 2012) ενώ αυξημένος αποπτωτικός δείκτης έχει παρατηρηθεί στα σπερματικά σωληνάρια αρκετών ζωικών μοντέλων (Chen et al, 2011; Guneli et al, 2008).

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει τις συστηματικές επιδράσεις της παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία των βλαβερών AGE. Αυτές οι εξαιρετικά αντιδραστικές ενώσεις που δημιουργούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες από την μη αναστρέψιμη αντίδραση των πρωτεϊνών, λιπιδίων ή νουκλεϊκών οξέων με υδατάνθρακες σε μεταβολικώς ενεργά κύτταρα. Τα AGE ασκούν τις δηλητηριώδεις επιδράσεις τους είτε τροποποιώντας απευθείας πρωτεΐνες μέσω της εκτεταμένης διασταυρούμενης ομοιοπολικής διασύνδεσης, ή έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με τον ειδικό υποδοχέα τους (RAGE) στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτή η αλληλεπίδραση υποδοχέα - συνδέτη οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και ενεργοποίηση των κυττάρων επάγοντας έναν φαύλο κύκλο φλεγμονής, κυτταρικής δυσλειτουργίας και ιστικών βλαβών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν αυξημένη εναπόθεση AGE στα γαμετικά κύτταρα των μυών της ομάδας SAFA σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Mallidis et al, 2007; Mallidis et al, 2008;

O'Neill et al, 2010), AGE ανιχνεύθηκαν στο κυτταρόπλασμα του σπερματικού επιθηλίου. Η αφθονία φρουκτόζης και γλυκόζης ως πηγών ενέργειας για την ωρίμανση των γαμετών και τα υψηλά επίπεδα λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη του σπερματικού επιθηλίου το καθιστούν εξαιρετικά ευαίσθητο στην γλυκοζυλίωση. Αυτό περαιτέρω επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας από τη σημαντική συσχέτιση της AGE χρώσης σε γεννητικά κύτταρα με την ολική χοληστερόλη, την HDL -C και LDL- C, καθώς και το σωματικό βάρος των πειραματόζων. Μια σημαντική μείωση της έντασης της AGE χρώσης παρατηρήθηκε με την ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων, με την ανοσοαντιδραστικότητα AGE να απουσιάζει από τον αυλό των σωληναρίων. Πυρηνική ανοσοαντιδραστικότητα παρατηρήθηκε μόνο σε ένα μικρό αριθμό των γεννητικών κυττάρων κοντά στη βασική μεμβράνη, ενώ εκτεταμένη χρώση των πυρήνων προ-μιτωτικών κυττάρων έχει αναφερθεί σε ανθρώπινο ιστό (Mallidis et al., 2009). Η συσσώρευση AGE, μια από τις πιο σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μία από τις επιγενετικές μεταβολές του σπέρματος, που έχει προηγουμένως προταθεί ως υπεύθυνη για τη διαβίβαση του εξασθενημένου αναπαραγωγικού δυναμικού που σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά διατροφή σε δύο γενεές των απογόνων (Fullston et al., 2012).

Στο διάμεσο ορχικό ιστό, η συσσώρευση AGE ήταν ευδιάκριτη στα κύτταρα Leydig. Λαμβάνοντας υπόψη τον θεμελιώδη ρόλο των κυττάρων Leydig για την ενδοκρινική λειτουργία των αρσενικών γονάδων, η πιθανή επίδραση της γλυκοζυλίωσης στην λειτουργική τους ακεραιότητα θα μπορούσε να υποτεθεί. Αυτό το εύρημα είναι σύμφωνο με προηγούμενες αναφορές που δείχνουν αυξημένο εντοπισμό CEL και CML, που σχετίζονται με μειωμένο αριθμό κυττάρων Leydig σε διαβητικούς αρουραίους σε σύγκριση με μάρτυρες ανάλογης ηλικίας, προφανώς λόγω τοξικής δράσης των AGE (Ling et al, 2001). Αντίθετα, οι Mallidis κ.α. παρατήρησαν μόνο έκφραση RAGE σε κύτταρα Leydig και όχι CML (Mallidis et al., 2007, 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι, στη μελέτη μας η AGE χρώση ήταν υψηλότερη στα κύτταρα Leydig των SAFA και MUFA ζώων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η ισορροπημένη MUFA - SAFA διατροφή μετά από 8 εβδομάδες αποκαθιστά

επίπεδα συγκρίσιμα με την ομάδα ελέγχου. Οι ενδοκυττάρια αποθήκες των λιπιδίων που είναι αναγκαία για την στεροειδογένεση μπορεί να είναι η πηγή των προερχόμενων από λιπίδια προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης συσχετιζόμενα με τα κυκλοφορούντα λιπίδια ως αποτέλεσμα της διαφορετικής περιεκτικότητας λιπαρών οξέων της διατροφής.

Ο συν-εντοπισμός του RAGE με AGE στα σπερματικών σωληναρίων, ειδικά στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων, και στο διάμεσο διαμέρισμα των όρχεων συνεπάγεται αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το συνδέτη. Η ενεργοποίηση του AGE- RAGE άξονα οδηγεί σε διαταραχή των κυτταρικών διαδικασιών, έναρξη των προ-φλεγμονώδους και προ-αποπτωτικής σηματοδότησης και επαγωγή της περαιτέρω παραγωγής AGE μέσω του οξειδωτικού stress. Θα ήταν δελεαστικό, ως εκ τούτου, να υποθέσουμε ότι η συσσώρευση AGE στους όρχεις των παχύσαρκων ποντικών μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα RAGE με αποτέλεσμα την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων επηρεάζει τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους και με αυτόν τον τρόπο την αναπαραγωγική ικανότητα, αλλά η πιθανή σχέση παραμένει να διευκρινιστεί σε μελλοντικές μελέτες που θα χρησιμοποιούν τεχνικές μοριακής ανάλυσης.

Σχετικά με τον προσάτη των ποντικών που τρέφονται με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά τροφή, η μείωση της πτύχωσης του αδενικού επιθηλίου, που παρατηρήθηκε σε SAFA και MUFA - SAFA ζώα, υποδηλώνει ότι η αυξημένη περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα στη διατροφή προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις. Σε υποστήριξη αυτής της άποψης μια θετική συσχέτιση της πτύχωσης του επιθηλίου με παραμέτρους του προφίλ των λιπιδίων αποδείχθηκε. Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται επί απουσίας επιθηλιακής ατροφίας ή μεταβολής στην αναλογία στρώματος-επιθηλίου θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πρώιμη μορφολογική αλλοίωση που εμπλέκεται στην διαδικασία γήρανσης του οργάνου (Bianchi-Frias et al, 2010). Η επιτάχυνση της διαδικασίας γήρανσης είναι γνωστό ότι ενέχεται στην καρκινογένεση σε διάφορους ιστούς. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μας είναι σε αρμονία με τις υπάρχουσες ενδείξεις ότι όχι μόνο η περίσσεια του λίπους αλλά και η σύνθεση των λιπαρών οξέων της διατροφής

επηρεάζει το μικροπεριβάλλον του προστάτη (Escobar et al, 2009; Ploumidou et al, 2010; Shankar et al, 2012).

Πιθανοί μηχανισμοί που εξηγούν την ανώμαλη ανάπτυξη και τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του προστάτη ως αποτέλεσμα της παχυσαρκίας δεδομένης της απουσίας του υπογοναδισμού, θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν τη χρονίως ενεργοποιημένη συστηματική φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε τοπικό επίπεδο. Τα AGE, ένας κοινός παράγοντας μεταβολικού stress για πρώτη φορά βρέθηκε να συσσωρεύονται στο προστατικό επιθήλιο με κατανομή που αντιστοιχεί στην έκφραση του υποδοχέα RAGE. Η επίπτωση της συνύπαρξης και αλληλεπίδρασης AGE - RAGE στην ομοίωση και παθοφυσιολογία του προστάτη θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Η μη στατιστικά σημαντική αύξηση των υπεροξειδίων και AGE στον ορρό των πειραματοζώων πιθανώς εξηγούν την έλλειψη σαφούς διαφοροποίησης στη συσσώρευση AGE και στις ιστοπαθολογικές παραμέτρους τόσο στους όρχεις όσο και στους προστάτες των πειραματοζώων. Χωρίς τη συμβολή τους, το οξειδωτικό περιβάλλον, δεν μπορεί να εγκατασταθεί ή να ενισχυθεί στο βαθμό που απαιτείται για να προκαλέσει συστηματική βλάβη και στη συνέχεια μεταβολές στον προστάτη αδένα. Ωστόσο οι υψηλότεροι από το συνηθισμένο μεταβολικοί ρυθμοί στο μικροπεριβάλλον των όρχεων, που είναι εξαιρετικά ευνοϊκοί για το σχηματισμό AGE προκαλεί αυξημένο επίπεδο τοπικού stress, που επηρεάζει δομικά και λειτουργικά τις ανδρικές γονάδες.

Εν κατακλείδι η υψηλή σε λιπαρά διατροφή για 24 εβδομάδες οδηγεί στην εναπόθεση AGE στο σπερματικό επιθήλιο και τα κύτταρα Leydig των ποντικών. Επιπλέον αυξάνεται η απόπτωση του σπερματικού επιθηλίου. Η ιστική αρχιτεκτονική του προστάτη των ποντικών άλλαξε σημαντικά ως αποτέλεσμα της υψηλής σε SAFA ή ισορροπημένης MUFA - SAFA διατροφής σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ η MUFA διατροφή αποκατέστησε φαινότυπο όμοιο με την ομάδα ελέγχου. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο ρόλος της αλληλεπίδρασης AGE - RAGE στο αναπαραγωγικό σύστημα σε άτομα με χρόνιες μεταβολικές διαταραχές. Η κλινική σημασία των πρώιμων ευρημάτων μας, αν

επιβεβαιωθεί σε μεγάλες μελέτες σε ανθρώπους , θα μπορούσε να επιτρέψει βελτίωση της διαχείρισης των αναπαραγωγικών διαταραχών και προστατικών παθήσεων, που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Απλή διαιτητική παρέμβαση προς ένα μεσογειακό σχήμα με υψηλή περιεκτικότητα σε MUFA θα μπορούσε να αντιστρέψει τη μεταβολική διαταραχή που προκαλείται από την δυτική διατροφή, βελτιώνοντας έτσι τη λειτουργία των γονάδων και του προστάτη. Τέλος η στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού AGE - RAGE στους ιστούς μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική είτε για τη θεραπεία ή ακόμα και για την πρόληψη των επιπτώσεων της παχυσαρκίας πριν από την εμφανή εκδήλωσή τους, χωρίς να επηρεάζει το ορμονικό περιβάλλον .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdollah F, Briganti A, Suardi N, Castiglione F, Gallina A, Capitanio U, Montorsi F (2011) Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: evidence of a potential relationship, hypothesized etiology, and prevention. *Korean journal of urology* **52**: 507-516

Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice* **67**: 3-21

Aitken RJ, Baker MA (2013) Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *The International journal of developmental biology* **57**: 265-272

Aitken RJ, Curry BJ (2011) Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & redox signaling* **14**: 367-381

Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB (2011) Apoptosis in the germ line. *Reproduction* **141**: 139-150

Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA (2006) Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**: 4154-4163

Aksoy Y, Aksoy H, Altinkaynak K, Aydin HR, Ozkan A (2006) Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **75**: 75-79

Aldini G, Vistoli G, Stefek M, Chondrogianni N, Grune T, Sereikaite J, Sadowska-Bartosz I, Bartosz G (2013) Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free radical research* **47** **Suppl 1**: 93-137

Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A (2006) Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1084**: 89-117

Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, Graves DT (2007a) Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* **40**: 345-353

Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT (2007b) Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP

kinases, and the FOXO1 transcription factor. *American journal of physiology Cell physiology* **292**: C850-856

Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT (2005) Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *The Journal of biological chemistry* **280**: 12087-12095

Allmen EU, Koch M, Fritz G, Legler DF (2008) V domain of RAGE interacts with AGEs on prostate carcinoma cells. *The Prostate* **68**: 748-758

Anderson MM, Heinecke JW (2003) Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation. *Diabetes* **52**: 2137-2143

Arapostathi C, Tzanetakou IP, Kokkinos AD, Tentolouris NK, Vlachos IS, Donta IA, Perrea KN, Perrea DN, Katsilambros NL (2011) A diet rich in monounsaturated fatty acids improves the lipid profile of mice previously on a diet rich in saturated fatty acids. *Angiology* **62**: 636-640

Attaman JA, Toth TL, Furtado J, Campos H, Hauser R, Chavarro JE (2012) Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Human reproduction* **27**: 1466-1474

Avenell A, Broom J, Brown TJ, Poobalan A, Aucott L, Stearns SC, Smith WC, Jung RT, Campbell MK, Grant AM (2004) Systematic review of the long-term effects and economic consequences of treatments for obesity and implications for health improvement. *Health technology assessment* **8**: iii-iv, 1-182

Badimon JJ, Badimon L, Fuster V (1990) Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *The Journal of clinical investigation* **85**: 1234-1241

Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M (2011) The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *International journal of andrology* **34**: 402-410

Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**: 405-412

Beebe-Dimmer JL, Nock NL, Neslund-Dudas C, Rundle A, Bock CH, Tang D, Jankowski M, Rybicki BA (2009) Racial differences in risk of prostate cancer associated with metabolic syndrome. *Urology* **74**: 185-190

Bener A, Al-Ansari AA, Zirie M, Al-Hamaq AO (2009) Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus? *International urology and nephrology* **41**: 777-784

Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Gomez-Gracia E, Martinez JA, Pajares RM, Martinez-Gonzalez MA (2006) Predictors of weight gain in a Mediterranean cohort: the Seguimiento Universidad de Navarra Study 1. *The American journal of clinical nutrition* **83**: 362-370; quiz 394-365

Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS (2010) The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PloS one* **5**

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine* **83**: 876-886

Bing W, Chang S, Hypolite JA, DiSanto ME, Zderic SA, Rolf L, Wein AJ, Chacko S (2003) Obstruction-induced changes in urinary bladder smooth muscle contractility: a role for Rho kinase. *American journal of physiology Renal physiology* **285**: F990-997

Blesbois E, Douard V, Germain M, Boniface P, Pellet F (2004) Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology* **61**: 537-549

Boerke A, Brouwers JF, Olkkonen VM, van de Lest CH, Sostaric E, Schoevers EJ, Helms JB, Gadella BM (2013) Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of reproduction* **88**: 21

Bongalhardo DC, Leeson S, Buhr MM (2009) Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. *Poultry science* **88**: 1060-1069

Bravata DM, Sanders L, Huang J, Krumholz HM, Olkin I, Gardner CD, Bravata DM (2003) Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **289**: 1837-1850

Brownlow BS, Petro A, Feinglos MN, Surwit RS (1996) The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Physiology & behavior* **60**: 37-41

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 9441-9445

Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A (1995) Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry* **270**: 10828-10832

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *The Journal of clinical investigation* **87**: 432-438

Burke JP, Rhodes T, Jacobson DJ, McGree ME, Roberts RO, Girman CJ, Lieber MM, Jacobsen SJ (2006) Association of anthropometric measures with the presence and progression of benign prostatic hyperplasia. *American journal of epidemiology* **164**: 41-46

Buschemeyer WC, 3rd, Freedland SJ (2007) Obesity and prostate cancer: epidemiology and clinical implications. *European urology* **52**: 331-343

Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppas M, He C, Vlassara H (2002) Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Molecular medicine* **8**: 337-346

Cai X, Haleem R, Oram S, Cyriac J, Jiang F, Grayhack JT, Kozlowski JM, Wang Z (2001) High fat diet increases the weight of rat ventral prostate. *The Prostate* **49**: 1-8

Cartledge JJ, Eardley I, Morrison JF (2001) Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. *BJU Int* **87**: 402-407

Cellek S, Cameron NE, Cotter MA, Muneer A (2013) Pathophysiology of diabetic erectile dysfunction: potential contribution of vasa nervorum and advanced glycation endproducts. *International journal of impotence research* **25**: 1-6

Cellek S, Foxwell NA, Moncada S (2003) Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **52**: 2353-2362

Cellek S, Qu W, Schmidt AM, Moncada S (2004) Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: a new insight into selective nitrenergic neuropathy in diabetes. *Diabetologia* **47**: 331-339

Chan WH, Wu HJ, Shiao NH (2007) Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *Journal of cellular biochemistry* **100**: 1056-1069

Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews* : **MMBR 64**: 821-846

Chang IH SY, Myung SC, Kim YS. (2001) Effects of Advanced Glycation End Products on Rat Bladder Fibroblast. . *Korean J Urol* **42**: 1204-1210

Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC (1990) Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* **39**: 807-814

Chen CJ, Kuo TB, Tseng YJ, Yang CC (2009) Combined cardiac sympathetic excitation and vagal impairment in patients with non-organic erectile dysfunction. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* **120**: 348-352

Chen D, Shan YX, Dai YT (2008) Advanced glycation end products and their receptors elevate the activity of endothelin-1 in rat cavernosum. *Zhonghua Nan Ke Xue* **14**: 110-115

Chen MM, Lan XX, Li CY, Tian ZM, Chen KF (2011) [Diet-induced obesity increases the apoptosis of testicular spermatogenic cells in pubertal male rats]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* **17**: 342-347

Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, Watanabe T, Takano Y, Yamamoto H, Yamamoto Y (2005) Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol* **18**: 1385-1396

Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Ando S, Maggiolini M, Carreau S, Pezzi V (2010) 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Molecular and cellular endocrinology* **320**: 136-144

Christiansen E, Schnider S, Palmvig B, Tauber-Lassen E, Pedersen O (1997) Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes care* **20**: 881-887

Clifton PM, Noakes M, Keogh JB (2004) Very low-fat (12%) and high monounsaturated fat (35%) diets do not differentially affect abdominal fat loss in overweight, nondiabetic women. *The Journal of nutrition* **134**: 1741-1745

Coelho SB, de Sales RL, Iyer SS, Bressan J, Costa NM, Lokko P, Mattes R (2006) Effects of peanut oil load on energy expenditure, body composition, lipid profile, and appetite in lean and overweight adults. *Nutrition* **22**: 585-592

Coffey DS (2001) Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology* **57**: 31-38

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* **326** (Pt 1): 1-16

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J (2004) Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & behavior* **81**: 243-248

Corona G, Mannucci E, Ricca V, Lotti F, Boddi V, Bandini E, Balercia G, Forti G, Maggi M (2009) The age-related decline of testosterone is associated with different specific symptoms and signs in patients with sexual dysfunction. *International journal of andrology* **32**: 720-728

Crowe FL, Allen NE, Appleby PN, Overvad K, Aardestrup IV, Johnsen NF, Tjonneland A, Linseisen J, Kaaks R, Boeing H, Kroger J, Trichopoulou A, Zavitsanou A, Trichopoulos D, Sacerdote C, Palli D, Tumino R, Agnoli C, Kiemeny LA, Bueno-de-Mesquita HB, Chirlaque MD, Ardanaz E, Larranaga N, Quiros JR, Sanchez MJ, Gonzalez CA, Stattin P, Hallmans G, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Slimani N, Jenab M, Riboli E, Key TJ (2008) Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition* **88**: 1353-1363

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* **7**: 256-269

De Nunzio C, Aronson W, Freedland SJ, Giovannucci E, Parsons JK (2012) The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *European urology* **61**: 560-570

De Nunzio C, Freedland SJ, Miano R, Trucchi A, Cantiani A, Carluccini A, Tubaro A (2011a) Metabolic syndrome is associated with high grade gleason score when prostate cancer is diagnosed on biopsy. *The Prostate*

De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schroder F, Sciarra A, Tubaro A (2011b) The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *European urology* **60**: 106-117

Diamanti-Kandarakis E, Lambrinoudaki I, Economou F, Christou M, Piperi C, Papavassiliou AG, Creatsas G (2010) Androgens associated with advanced glycation end-products in postmenopausal women. *Menopause* **17**: 1182-1187

Diamanti-Kandarakis E, Piouka A, Livadas S, Piperi C, Katsikis I, Papavassiliou AG, Panidis D (2009) Anti-mullerian hormone is associated with advanced glycosylated end products in lean women with polycystic ovary syndrome. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **160**: 847-853

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creatsas G (2005) Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clinical endocrinology* **62**: 37-43

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Korkolopoulou P, Kandaraki E, Levidou G, Papalois A, Patsouris E, Papavassiliou AG (2007a) Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *Journal of molecular medicine* **85**: 1413-1420

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, Papavassiliou AG, Duleba AJ (2007b) Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochemistry and cell biology* **127**: 581-589

Dorgan JF, Judd JT, Longcope C, Brown C, Schatzkin A, Clevidence BA, Campbell WS, Nair PP, Franz C, Kahle L, Taylor PR (1996) Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. *The American journal of clinical nutrition* **64**: 850-855

Doucet E, Almeras N, White MD, Despres JP, Bouchard C, Tremblay A (1998) Dietary fat composition and human adiposity. *European journal of clinical nutrition* **52**: 2-6

Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB (1998) Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* **17**: 3207-3213

du Plessis SS, McAllister DA, Luu A, Savia J, Agarwal A, Lampiao F (2010) Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia* **42**: 206-210

Due A, Larsen TM, Hermansen K, Stender S, Holst JJ, Toubro S, Martinussen T, Astrup A (2008) Comparison of the effects on insulin resistance and glucose tolerance of 6-mo high-monounsaturated-fat, low-fat, and control diets. *The American journal of clinical nutrition* **87**: 855-862

Duvnjak L, Duvnjak M (2009) The metabolic syndrome - an ongoing story. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **60 Suppl 7**: 19-24

Eika B, Levin RM, Longhurst PA (1992) Collagen and bladder function in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin and aminoguanidine. *J Urol* **148**: 167-172

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**: 495-516

Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S (2012) [The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters]. *Actas urologicas espanolas* **36**: 153-159

Escobar EL, Gomes-Marcondes MC, Carvalho HF (2009) Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. *The Prostate* **69**: 548-558

Evan G, Littlewood T (1998) A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1322

Faist V, Erbersdobler HF (2001) Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Annals of nutrition & metabolism* **45**: 1-12

Field AE, Willett WC, Lissner L, Colditz GA (2007) Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study. *Obesity* **15**: 967-976

Firouz Daneshgari MD. (2004) Animal Models of Diabetic Complications Consortium (U01 DK61018) UPDATE REPORT (September 2001 – January 2004).

Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC (2005) Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* **26**: 123-134

Franke S, Sommer M, Ruster C, Bondeva T, Marticke J, Hofmann G, Hein G, Wolf G (2009) Advanced glycation end products induce cell cycle arrest and proinflammatory changes in osteoarthritic fibroblast-like synovial cells. *Arthritis research & therapy* **11**: R136

Frankfurt OS (1994) Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA. *Anticancer research* **14**: 1861-1869

Freedland SJ (2005) Obesity and prostate cancer: a growing problem. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 6763-6766

Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M (2012) Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Human reproduction* **27**: 1391-1400

Furber JD (2006) Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal. *Rejuvenation Res* **9**: 274-278

Garaulet M, Perez-Llamas F, Canteras M, Tebar FJ, Zamora S (2001) Endocrine, metabolic and nutritional factors in obesity and their relative significance as studied by factor analysis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **25**: 243-251

Gehlert DR (1999) Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides* **33**: 329-338

Gempel KE, Gerbitz KD, Olgemoller B, Schleicher ED (1993) In-vitro carboxymethylation of low density lipoprotein alters its metabolism via the high-affinity receptor. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **25**: 250-252

Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U (2010) Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biology of reproduction* **82**: 96-104

Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H (2004) Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association* **104**: 1287-1291

Gorbachinsky I, Akpınar H, Assimos DG (2010) Metabolic syndrome and urologic diseases. *Reviews in urology* **12**: e157-180

Greenblum S, Turnbaugh PJ, Borenstein E (2012) Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 594-599

Gromadzka-Ostrowska J, Przepiorka M, Romanowicz K (2002) Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. *Reproductive biology* **2**: 277-293

Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N (2008) Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* **40**: 354-360

Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U (2007) Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**: 2276-2283

Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB (2008) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes research and clinical practice* **82 Suppl 1**: S42-45

Hammarsten J, Hogstedt B (2004) Clinical, haemodynamic, anthropometric, metabolic and insulin profile of men with high-stage and high-grade clinical prostate cancer. *Blood pressure* **13**: 47-55

Hammarsten J, Hogstedt B, Holthuis N, Mellstrom D (1998) Components of the metabolic syndrome-risk factors for the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate cancer and prostatic diseases* **1**: 157-162

Hammes HP, Weiss A, Fuhrer D, Kramer HJ, Papavassilis C, Grimminger F (1996) Acceleration of experimental diabetic retinopathy in the rat by omega-3 fatty acids. *Diabetologia* **39**: 251-255

Heine RJ, Mulder C, Popp-Snijders C, van der Meer J, van der Veen EA (1989) Linoleic-acid-enriched diet: long-term effects on serum lipoprotein and apolipoprotein concentrations and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetic patients. *The American journal of clinical nutrition* **49**: 448-456

Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D (2005) Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 5146-5152

Hermeking H, Eick D (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**: 2091-2093

Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **1**: 52

Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SG (2013) Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoasthenoteratospermic men. *Iranian Red Crescent medical journal* **15**: 780-785

Hsuuw YD, Chang CK, Chan WH, Yu JS (2005) Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *Journal of cellular physiology* **205**: 379-386

Huang PL (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms* **2**: 231-237

Hughes LM, Griffith R, Carey A, Butler T, Donne SW, Beagley KW, Aitken RJ (2009) The spermstatic and microbicidal actions of quinones and maleimides: toward a dual-purpose contraceptive agent. *Molecular pharmacology* **76**: 113-124

Hui Q, Pan DLL, Lindsay Eggers, David Sybert, Vincent M. Monnier, Firouz Daneshgari and Margot S. Damaser (2007). Advanced Glycation End Products and Urodynamic Function after Pudendal Nerve Crush in Diabetic Female Rats. *SUFU*.

Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S (2011) Vardenafil, an inhibitor of phosphodiesterase-5, blocks advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression via elevation of cGMP. *Clinical and experimental medicine* **11**: 131-135

Ishiguro H, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Fujinami K, Kubota Y, Uemura H (2005) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate* **64**: 92-100

Jackson MD, Walker SP, Simpson-Smith CM, Lindsay CM, Smith G, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Coard KC, Aiken WD, Tulloch T, Paul TJ, Wan RL (2012) Associations of whole-blood fatty acids and dietary intakes with prostate cancer in Jamaica. *Cancer causes & control : CCC* **23**: 23-33

Jamsai D, O'Bryan MK (2010) Mouse models as tools in fertility research and male-based contraceptive development. *Handbook of experimental pharmacology*: 179-194

Jamsai D, O'Bryan MK (2011) Mouse models in male fertility research. *Asian journal of andrology* **13**: 139-151

Januszewski AS, Alderson NL, Metz TO, Thorpe SR, Baynes JW (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. *Biochemical Society transactions* **31**: 1413-1416

Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT (1993) Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology* **42**: 171-174

Jiaan DB, Seftel AD, Fogarty J, Hampel N, Cruz W, Pomerantz J, Zuik M, Monnier VM (1995) Age-related increase in an advanced glycation end product in penile tissue. *World J Urol* **13**: 369-375

Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* **1**: 2-25

Kahn BB, Flier JS (2000) Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **106**: 473-481

Kapantais E, Tzotzas T, Ioannidis I, Mortoglou A, Bakatselos S, Kaklamanou M, Lanaras L, Kaklamanos I (2006) First national epidemiological survey on the prevalence of obesity and abdominal fat distribution in Greek adults. *Annals of nutrition & metabolism* **50**: 330-338

Karimi J, Goodarzi MT, Tavilani H, Khodadadi I, Amiri I (2012) Increased receptor for advanced glycation end products in spermatozoa of diabetic men and its association with sperm nuclear DNA fragmentation. *Andrologia* **44 Suppl 1**: 280-286

Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, Lakatta EG (2001) Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* **104**: 1464-1470

Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G (2011) Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine* **9**: 48

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE (2008) The metabolic syndrome and male infertility. *Journal of andrology* **29**: 251-259

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239-257

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, et al. (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American journal of epidemiology* **124**: 903-915

Kim JH, Hong CO, Koo YC, Kim SJ, Lee KW (2011) Oral administration of ethyl acetate-soluble portion of *Terminalia chebula* conferring protection from streptozotocin-induced diabetic mellitus and its complications. *Biological & pharmaceutical bulletin* **34**: 1702-1709

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136

Kohler TS, McVary KT (2009) The relationship between erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms and the role of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *European urology* **55**: 38-48

Koksal IT, Usta MF, Akkoyunlu G, Toptas B, Gulkesen KH, Erdogru T, Tuncer M, Baykal A, Ersoy F, Demir R, Baykara M (2003) The potential role of advanced glycation end product and iNOS in chronic renal failure-related testicular dysfunction. An experimental study. *Am J Nephrol* **23**: 361-368

Kopp RP, Han M, Partin AW, Humphreys E, Freedland SJ, Parsons JK (2011) Obesity and prostate enlargement in men with localized prostate cancer. *BJU international* **108**: 1750-1755

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ (2008) Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **93**: 3199-3207

Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ (2011) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *The Biochemical journal* **436**: 687-698

Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Christodoulou P, Patsouris E, Thomas-Tsangli E, Kapralos P, Davaris P (2000) Apoptosis in bladder carcinomas detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA: relation to cell cycle regulators and survival. *Urology* **56**: 516-520

Korkolopoulou PA, Konstantinidou AE, Patsouris ES, Christodoulou PN, Thomas-Tsangli EA, Davaris PS (2001) Detection of apoptotic cells in archival tissue from diffuse astrocytomas using a monoclonal antibody to single-stranded DNA. *The Journal of pathology* **193**: 377-382

Korner A, Bluher S, Kapellen T, Garten A, Klammt J, Kratzsch J, Kiess W (2005) Obesity in childhood and adolescence: a review in the interface between adipocyte physiology and clinical challenges. *Hormones* **4**: 189-199

Koukoulis GN, Sakka C, Katsaros F, Goutou M, Tsirona S, Tsiapali E, Piterou A, Stefanidis I, Stathakis N (2010) High rates of obesity prevalence in adults living in central Greece: data from the ARGOS study. *Hormones* **9**: 253-262

Kozlowski R, Kershen RT, Siroky MB, Krane RJ, Azadzi KM (2001) Chronic ischemia alters prostate structure and reactivity in rabbits. *The Journal of urology* **165**: 1019-1026

Kuniyasu H, Chihara Y, Kondo H, Ohmori H, Ukai R (2003) Amphotericin induction in prostatic stromal cells by androgen deprivation is associated with metastatic prostate cancer. *Oncol Rep* **10**: 1863-1868

Kupelian V, McVary KT, Kaplan SA, Hall SA, Link CL, Aiyer LP, Mollon P, Tamimi N, Rosen RC, McKinlay JB (2009) Association of lower urinary tract symptoms and the metabolic syndrome: results from the Boston Area Community Health Survey. *The Journal of urology* **182**: 616-624; discussion 624-615

L.R. Kavoussi AWP, A.C. Novick, C.A. Peters (2012) *Campbell-Walsh Urology*, 10th edn.: Elsevier-Saunders.

La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE (2012) Diabetes mellitus and sperm parameters. *Journal of andrology* **33**: 145-153

Li SY, Sigmon VK, Babcock SA, Ren J (2007) Advanced glycation endproduct induces ROS accumulation, apoptosis, MAP kinase activation and nuclear O-GlcNAcylation in human cardiac myocytes. *Life sciences* **80**: 1051-1056

Lin L, Park S, Lakatta EG (2009) RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 1403-1413

Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K (2001) Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **81**: 845-861

Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K (1998) Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. *Lab Invest* **78**: 1591-1606

Lloyd JC, Antonelli JA, Phillips TE, Masko EM, Thomas JA, Poulton SH, Pollak M, Freedland SJ (2010) Effect of isocaloric low fat diet on prostate cancer xenograft progression in a hormone deprivation model. *The Journal of urology* **183**: 1619-1624

Mallidis C, Agbaje I, Rogers D, Glenn J, McCullough S, Atkinson AB, Steger K, Stitt A, McClure N (2007) Distribution of the receptor for advanced glycation end products in the human male reproductive tract: prevalence in men with diabetes mellitus. *Human reproduction* **22**: 2169-2177

Mallidis C, Agbaje IM, Rogers DA, Glenn JV, Pringle R, Atkinson AB, Steger K, Stitt AW, McClure N (2008) Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int J Androl*

Mallidis C, Czerwiec A, Filippi S, O'Neill J, Maggi M, McClure N (2011) Spermatogenic and sperm quality differences in an experimental model of metabolic syndrome and hypogonadal hypogonadism. *Reproduction* **142**: 63-71

Malnick SD, Knobler H (2006) The medical complications of obesity. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **99**: 565-579

Maron DJ, Fair JM, Haskell WL (1991) Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project Investigators and Staff. *Circulation* **84**: 2020-2027

Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M (2009) Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in human bladder with specific monoclonal antibody. *Int J Urol* **16**: 402-405; discussion 405-406

Matsumoto K. YM, Masunaga K. , Ueda S. , Tanaka M. , Takeya M. , Nagai R. ,Horiuchi S. (2002). AGE Accelerating accumulation Advanced Glycation End products(AGE) in human urinary bladder. *ICS*; Heidelberg, Germany.

McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber JP, Rubertone MV, Erickson RL (2008) Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **100**: 663-671

McVary KT, McKenna KE (2004) The relationship between erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms: epidemiological, clinical, and basic science evidence. *Current urology reports* **5**: 251-257

McVary KT, Rademaker A, Lloyd GL, Gann P (2005) Autonomic nervous system overactivity in men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology* **174**: 1327-1433

Medina JJ, Parra RO, Moore RG (1999) Benign prostatic hyperplasia (the aging prostate). *The Medical clinics of North America* **83**: 1213-1229

Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A (2008) The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovascular diabetology* **7**: 29

Meistrich ML, Hess RA (2013) Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods in molecular biology* **927**: 299-307

Melanson EL, Astrup A, Donahoo WT (2009) The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. *Annals of nutrition & metabolism* **55**: 229-243

Merhi Z (2014) Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Human reproduction* **29**: 135-145

Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG (2013) The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism: clinical and experimental* **62**: 457-478

Mills TM, Chitaley K, Lewis RW, Webb RC (2002) Nitric oxide inhibits RhoA/Rho-kinase signaling to cause penile erection. *European journal of pharmacology* **439**: 173-174

Mishra DP, Shaha C (2005) Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* **280**: 6181-6196

Mitchell M, Bakos HW, Lane M (2011) Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. *Fertility and sterility* **95**: 1349-1353

Monnier VM (2003) Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Archives of biochemistry and biophysics* **419**: 1-15

Moussavi N, Gavino V, Receveur O (2008) Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity* **16**: 7-15

Murdolo G, Smith U (2006) The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **16 Suppl 1**: S35-38

Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD (2000) The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11371-11376

Nagai R, Mera K, Nakajou K, Fujiwara Y, Iwao Y, Imai H, Murata T, Otagiri M (2007) The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochimica et biophysica acta* **1772**: 1192-1198

Nair R, Shaha C (2003) Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased expression of spermatogenic cell Fas/FasL system. *The Journal of biological chemistry* **278**: 6470-6481

Nakamura K, Yamagishi SI, Matsui T, Adachi H, Takeuchi M, Imaizumi T (2007) Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are correlated with AGEs in both diabetic and non-diabetic subjects. *Clinical and experimental medicine* **7**: 188-190

Negre-Salvayre A, Salvayre R, Auge N, Pamplona R, Portero-Otin M (2009) Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling* **11**: 3071-3109

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NM, Achoki T, AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anwar P, Banerjee A, Barquera S, Basu S,

Bennett DA, Bhutta Z, Blore J, Cabral N, Nonato IC, Chang JC, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DF, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Hussein A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SE, Kengne AP, Khader YS, Khang YH, Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KM, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T, Oti SO, Pedroza A, Prabhakaran D, Roy N, Sampson U, Seo H, Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shieue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJ, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang SX, Weiderpass E, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon SJ, Zhao Y, Zhou M, Zhu S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E (2014) Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*

Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD (2007) Men's body mass index and infertility. *Human reproduction* **22**: 2488-2493

Nicholson TM, Rieke EA, Marker PC, Miano JM, Mayer RD, Timms BG, vom Saal FS, Wood RW, Rieke WA (2012) Testosterone and 17beta-estradiol induce glandular prostatic growth, bladder outlet obstruction, and voiding dysfunction in male mice. *Endocrinology* **153**: 5556-5565

Noh H, King GL (2007) The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney international Supplement*: S49-53

O'Brien J, Morrissey PA (1989) Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical reviews in food science and nutrition* **28**: 211-248

O'Neill J, Czerwicz A, Agbaje I, Glenn J, Stitt A, McClure N, Mallidis C (2010) Differences in mouse models of diabetes mellitus in studies of male reproduction. *International journal of andrology* **33**: 709-716

Oborna I, Malickova K, Fingerova H, Brezinova J, Horka P, Novotny J, Bryndova H, Filipcikova R, Svobodova M (2011) A randomized controlled trial of lycopene treatment on soluble receptor for advanced glycation end products in seminal and blood plasma of normospermic men. *American journal of reproductive immunology* **66**: 179-184

Ohwaki K, Endo F, Yano E (2009) Relationship between body mass index and infertility in healthy male Japanese workers: a pilot study. *Andrologia* **41**: 100-104

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology* **2**: 411-429

Otukonyong EE, Dube MG, Torto R, Kalra PS, Kalra SP (2005) High-fat diet-induced ultradian leptin and insulin hypersecretion are absent in obesity-resistant rats. *Obesity research* **13**: 991-999

Ozden C, Ozdal OL, Urgancioglu G, Koyuncu H, Gokkaya S, Memis A (2007) The correlation between metabolic syndrome and prostatic growth in patients with benign prostatic hyperplasia. *European urology* **51**: 199-203; discussion 204-196

Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M (2012) Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis* **2**: 253-263

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Risvas G, Kontogianni MD, Zampelas A, Stefanadis C (2004) Epidemiology of overweight and obesity in a Greek adult population: the ATTICA Study. *Obesity research* **12**: 1914-1920

Papachroni KK, Piperi C, Levidou G, Korkolopoulou P, Pawelczyk L, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG (2010) Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**: 2460-2469

Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR (2007) Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12**: 1085-1100

Park SY, Wilkens LR, Henning SM, Le Marchand L, Gao K, Goodman MT, Murphy SP, Henderson BE, Kolonel LN (2009) Circulating fatty acids and prostate cancer risk in a nested case-control study: the Multiethnic Cohort. *Cancer causes & control : CCC* **20**: 211-223

Parsons JK (2007) Modifiable risk factors for benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms: new approaches to old problems. *The Journal of urology* **178**: 395-401

Parsons JK, Carter HB, Partin AW, Windham BG, Metter EJ, Ferrucci L, Landis P, Platz EA (2006) Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**: 2562-2568

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS (2004) Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism: clinical and experimental* **53**: 454-457

Peyroux J, Sternberg M (2006) Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie-biologie* **54**: 405-419

Ploumidou K, Kyroudi-Voulgari A, Perea D, Anastasiou I, Mitropoulos D (2010) Effect of a hypercholesterolemic diet on serum lipid profile, plasma sex steroid levels, and prostate structure in rats. *Urology* **76**: 1517 e1511-1515

Posch K, Simecek S, Wascher TC, Jurgens G, Baumgartner-Parzer S, Kostner GM, Graier WF (1999) Glycated low-density lipoprotein attenuates shear stress-induced nitric oxide synthesis by inhibition of shear stress-activated L-arginine uptake in endothelial cells. *Diabetes* **48**: 1331-1337

Qin DD, Yuan W, Zhou WJ, Cui YQ, Wu JQ, Gao ES (2007) Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian journal of andrology* **9**: 827-834

Raab RM, Bullen J, Kelleher J, Mantzoros C, Stephanopoulos G (2005) Regulation of mouse hepatic genes in response to diet induced obesity, insulin resistance and fasting induced weight reduction. *Nutrition & metabolism* **2**: 15

Rahman NU, Phonsombat S, Bochinski D, Carrion RE, Nunes L, Lue TF (2007) An animal model to study lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction: the hyperlipidaemic rat. *BJU international* **100**: 658-663

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2012) The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascular pharmacology* **57**: 160-167

Rasmussen BM, Vessby B, Uusitupa M, Berglund L, Pedersen E, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell L, Hermansen K, Group KS (2006) Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects. *The American journal of clinical nutrition* **83**: 221-226

Reaven GM (2011) The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? *Journal of internal medicine* **269**: 127-136

Rees RW, Ralph DJ, Royle M, Moncada S, Cellet S (2001) Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *British journal of pharmacology* **133**: 455-458

Riehl A, Nemeth J, Angel P, Hess J (2009) The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell communication and signaling : CCS* **7**: 12

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO journal* **16**: 2262-2270

Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA (2005) Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *International journal of obesity* **29**: 310-316

Roqueta-Rivera M, Stroud CK, Haschek WM, Akare SJ, Segre M, Brush RS, Agbaga MP, Anderson RE, Hess RA, Nakamura MT (2010) Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *Journal of lipid research* **51**: 360-367

Rose DP, Komninou D, Stephenson GD (2004) Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **5**: 153-165

Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA (2010) Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clinical nutrition* **29**: 100-105

Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L (2006) Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *International journal of obesity* **30**: 350-358

Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davi G (2009) Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutical implications. *Current medicinal chemistry* **16**: 940-952

Schemmel R, Mickelsen O, Gill JL (1970) Dietary obesity in rats: Body weight and body fat accretion in seven strains of rats. *The Journal of nutrition* **100**: 1041-1048

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circulation research* **84**: 489-497

Scolnik MD, Servadio C, Abramovici A (1994) Comparative study of experimentally induced benign and atypical hyperplasia in the ventral prostate of different rat strains. *Journal of andrology* **15**: 287-297

Sebekova K, Somoza V (2007) Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects--PRO. *Molecular nutrition & food research* **51**: 1079-1084

Seftel AD, Vaziri ND, Ni Z, Razmjouei K, Fogarty J, Hampel N, Polak J, Wang RZ, Ferguson K, Block C, Haas C (1997) Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS. *Urology* **50**: 1016-1026

Shah M, Adams-Huet B, Garg A (2007) Effect of high-carbohydrate or high-cis-monounsaturated fat diets on blood pressure: a meta-analysis of intervention trials. *The American journal of clinical nutrition* **85**: 1251-1256

Shaha C, Tripathi R, Mishra DP (2010) Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **365**: 1501-1515

Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blucher M, Stumvoll M, Stampfer MJ, Dietary Intervention Randomized Controlled Trial G (2008) Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *The New England journal of medicine* **359**: 229-241

Shankar E, Vykhovanets EV, Vykhovanets OV, Maclennan GT, Singh R, Bhaskaran N, Shukla S, Gupta S (2012) High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF-kappaB. *The Prostate* **72**: 233-243

Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD (2004) Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research* **64**: 2270-2305

Shekarriz M, Thomas AJ, Jr., Agarwal A (1995) Effects of time and sperm concentration on reactive oxygen species formation in human semen. *Archives of andrology* **34**: 69-75

Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S (2012) Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in bioscience* **4**: 746-754

Siddiqi K, Lewis RW (2008) Surgical therapy for the treatment of erectile dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* **5**: 174-175

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**: 129-146

Sirtori CR, Tremoli E, Gatti E, Montanari G, Sirtori M, Colli S, Gianfranceschi G, Maderna P, Dentone CZ, Testolin G, et al. (1986) Controlled evaluation of fat intake in the Mediterranean diet: comparative activities of olive oil and corn oil on plasma lipids and platelets in high-risk patients. *The American journal of clinical nutrition* **44**: 635-642

Soares MJ, Cummings SJ, Mamo JC, Kenrick M, Piers LS (2004) The acute effects of olive oil v. cream on postprandial thermogenesis and substrate oxidation in postmenopausal women. *The British journal of nutrition* **91**: 245-252

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N (2008) Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **109**: 323-330

Soygur T, Kupeli B, Aydos K, Kupeli S, Arikan N, Muftuoglu YZ (1996) Effect of obesity on prostatic hyperplasia: its relation to sex steroid levels. *International urology and nephrology* **28**: 55-59

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S (2003) Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell death and differentiation* **10**: 808-822

Strom SS, Yamamura Y, Forman MR, Pettaway CA, Barrera SL, DiGiovanni J (2008) Saturated fat intake predicts biochemical failure after prostatectomy. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **122**: 2581-2585

Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S (2008) Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* **14**: 953-961

Summers LK, Fielding BA, Bradshaw HA, Ilic V, Beysen C, Clark ML, Moore NR, Frayn KN (2002) Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia* **45**: 369-377

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M (1995) Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism: clinical and experimental* **44**: 645-651

Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN (1988) Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**: 1163-1167

Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Matsumoto N, Kobayashi S (2001) Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Endocrine research* **27**: 109-117

Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF (1988) Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Journal of molecular biology* **203**: 495-505

Tande AJ, Platz EA, Folsom AR (2006) The metabolic syndrome is associated with reduced risk of prostate cancer. *American journal of epidemiology* **164**: 1094-1102

Tatone C, Amicarelli F (2013) The aging ovary--the poor granulosa cells. *Fertility and sterility* **99**: 12-17

Tavilani H, Doosti M, Abdi K, Vaisiraygani A, Joshaghani HR (2006) Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia* **38**: 173-178

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England journal of medicine* **348**: 2599-2608

Trichopoulou A, Gnardellis C, Benetou V, Lagiou P, Bamia C, Trichopoulos D (2002) Lipid, protein and carbohydrate intake in relation to body mass index. *European journal of clinical nutrition* **56**: 37-43

Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **9**: 869-873

Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Koukos S, Shimizu S, Satoh K, Takenaka A, Sofikitis N (2012) Antioxidant treatment with edaravone or taurine ameliorates diabetes-induced testicular dysfunction in the rat. *Molecular and cellular biochemistry* **369**: 195-204

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480-484

Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H (2005) Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**: 461-466

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association* **110**: 911-916 e912

Usta MF, Bivalacqua TJ, Koksai IT, Toptas B, Surmen S, Hellstrom WJ (2004) The protective effect of aminoguanidine on erectile function in diabetic rats is not related to the timing of treatment. *BJU Int* **94**: 429-432

Usta MF, Bivalacqua TJ, Yang DY, Ramanitharan A, Sell DR, Viswanathan A, Monnier VM, Hellstrom WJ (2003) The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin diabetic rats. *J Urol* **170**: 1437-1442

Usta MF, Kendirci M, Gur S, Foxwell NA, Bivalacqua TJ, Celtek S, Hellstrom WJ (2006) The breakdown of preformed advanced glycation end products reverses erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: preventive versus curative treatment. *J Sex Med* **3**: 242-250; discussion 250-242

Usta MF, Tuncer M, Baykal A, Ciftcioglu MA, Erdogan T, Koksall IT, Ersoy FF, Baykara M (2002) Impact of chronic renal failure and peritoneal dialysis fluids on advanced glycation end product and iNOS levels in penile tissue: an experimental study. *Urology* **59**: 953-957

Valkenburg KC, Williams BO (2011) Mouse models of prostate cancer. *Prostate cancer* **2011**: 895238

Vazzana N, Santilli F, Cucurullo C, Davi G (2009) Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Internal and emergency medicine* **4**: 389-401

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends in biochemical sciences* **22**: 388-393

Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J (2009) Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**: 4483-4491

Wada R, Yagihashi S (2005) Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* **1043**: 598-604

Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell* **8**: 311-323

West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL (1992) Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *The American journal of physiology* **262**: R1025-1032

Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 652-661

Williams P, Robinson D, Bailey A (1979) High-density lipoprotein and coronary risk factors in normal men. *Lancet* **1**: 72-75

Wolff SP (1993) Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British medical bulletin* **49**: 642-652

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (2008) Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* **4**: 285-293

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochemical pharmacology* **79**: 1379-1386

Yono M, Yamamoto Y, Yoshida M, Ueda S, Latifpour J (2007) Effects of doxazosin on blood flow and mRNA expression of nitric oxide synthase in the spontaneously hypertensive rat genitourinary tract. *Life sciences* **81**: 218-222

Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ, Liu YX (2001) Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta pharmacologica Sinica* **22**: 1028-1033

Zucchetto A, Tavani A, Dal Maso L, Gallus S, Negri E, Talamini R, Franceschi S, Montella M, La Vecchia C (2005) History of weight and obesity through life and risk of benign prostatic hyperplasia. *International journal of obesity* **29**: 798-803

P. Αγγελοπούλου ΒΚ (2000) Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση των γεννητικών κυττάρων. *ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ* **17**: 477-490