

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Γ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΘΩΡΑΚΟΣ «ΣΩΤΗΡΙΑ»**

Διευθύντρια Κλινικής :Καθηγήτρια Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη

---

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2012-2013**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Γ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΘΩΡΑΚΟΣ «ΣΩΤΗΡΙΑ»**

Διευθύντρια Κλινικής :Καθηγήτρια Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2012-2013**

**ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΚΑΙ  
ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ  
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΤΙΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ  
ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΧΑΡΙΚΛΕΙΑΣ ΧΡΗΣΤΑΚΟΥ**

ΙΑΤΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2013

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής :11/12/2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:19/07/2007

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΠΑΓΚΑΛΗΣ ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ	Μέλος εξεταστικής Επιτροπής
ΔΙΑΜΑΝΤΗ- ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ ΕΥΑΝΘΙΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ	Επιβλέπουσα
ΤΕΝΤΟΛΟΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ	Μέλος εξεταστικής Επιτροπής

*«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Νόμος 5343/32, άρθρο 202 §2 και ν. 1268/82, άρθρο 50 §8).*

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΑΣ**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ - ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

*Στους γονείς μου*

*Στους καθηγητές μου*

## **ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

### **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

### **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

### **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **1. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ)**

##### **1.1 Γενικά**

##### **1.2 Επιδημιολογία**

##### **1.3 Αιτιοπαθογένεια -Παθοφυσιολογία**

###### **1.3.1 Υπερανδρογοναιμία**

###### **1.3.2 Ανωοθυλακιορρηξία**

###### **1.3.3 Αντίσταση στην ινσουλίνη**

###### **1.3.4 Χρόνια Φλεγμονή –αυξημένο γλυκοξείδωτικό φορτίο**

###### **1.3.5 Διαταραχή υποθαλαμοϋποφυσιακής λειτουργίας**

##### **1.4 Κλινικοεργαστηριακή διάγνωση ΣΠΩ**

###### **1.4.1 Βιοχημική υπερανδρογοναιμία**

###### **1.4.2 Κλινικός υπερανδρογονισμός**

###### **1.4.3 Χρόνια ανωοθυλακιορρηξία**

###### **1.4.4 Πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών**

###### **1.4.5 Αποκλεισμός άλλων νοσημάτων που προκαλούν παρόμοια κλινική εικόνα**

##### **1.5 Κλινικές επιπτώσεις ΣΠΩ**

###### **1.5.1 Αναπαραγωγικές διαταραχές**

###### **1.5.2 Μεταβολικές και καρδιαγγειακές διαταραχές**

###### **1.5.3 Παθοφυσιολογία μεταβολικών και καρδιαγγειακών διαταραχών στο ΣΠΩ**

###### **1.5.3.1 Σπλαγγχνική παχυσαρκία-Χρόνια φλεγμονή**

###### **1.5.3.2 Ινσουλινοαντίσταση**

###### **1.5.3.3 Υπερανδρογοναιμία**

#### **2. Δείκτες χρόνιας φλεγμονής: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein,CRP)**

##### **2.1 Γενικά-Μηχανισμοί παραγωγής**

##### **2.2 Η CRP ως παράγων κινδύνου για μεταβολικές διαταραχές και αθηρωματική νόσο**

#### **3. Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)**

##### **3.1 Γενικά- Μηχανισμοί παραγωγής των AGEs**

##### **3.2 Μηχανισμοί δράσης των AGEs**

###### **3.2.1 Ρόλος των AGEs στην αθηρωματική νόσο**

###### **3.2.2 Ρόλος των AGEs στις μεταβολικές διαταραχές**

###### **3.2.3 Πιθανός ρόλος των AGEs στις διαταραχές αναπαραγωγικής λειτουργίας**



4. **Φαρμακευτική παρέμβαση στο ΣΠΩ**
  - 4.1 **Συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία**
    - 4.1.1 **Κατηγορίες αντισυλληπτικών**
    - 4.1.2 **Μηχανισμοί δράσης των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων (γενικά και στο ΣΠΩ)**
    - 4.1.3 **Μεταβολικές και καρδιαγγειακές επιπτώσεις των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων στο γενικό πληθυσμό**
    - 4.1.4 **Μεταβολικές και καρδιαγγειακές επιπτώσεις των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων στις γυναίκες με ΣΠΩ**
  - 4.2 **Μεθορμίνη**
    - 4.2.1 **Μηχανισμοί δράσης μεθορμίνης**
      - 4.2.1.1 **Δράση στους ιστούς-στόχους της ινσουλίνης: Ήπαρ, σκελετικοί μύες και λιπώδης ιστός**
      - 4.2.1.2 **Δράση στο ενδοθήλιο**
      - 4.2.1.3 **Δράση στους μηχανισμούς φλεγμονής και γλυκοξείδωσης**
    - 4.2.2 **Δράσεις της μεθορμίνης στο ΣΠΩ**
      - 4.2.2.1 **Μεταβολικές και καρδιαγγειακές δράσεις**
      - 4.2.2.2 **Δράσεις στις ενδοκρινικές και αναπαραγωγικές διαταραχές**

#### **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1. **Σκοπός μελέτης**
2. **Υλικό-Μέθοδοι**
  - 2.1 **Πληθυσμός μελέτης**
  - 2.2 **Πρωτόκολλο μελέτης**
  - 2.3 **Μέθοδοι εργαστηριακού προσδιορισμού**
  - 2.4 **Στατιστική ανάλυση**
3. **Αποτελέσματα**
4. **Συζήτηση - Συμπεράσματα**
5. **Περίληψη-Abstract**
6. **Βιβλιογραφικές αναφορές**

## **ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΧΡΗΣΤΑΚΟΥ

ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 1982

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: ΑΘΗΝΑ

ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΤΑΧΥΔΡΟΜΕΙΟ: [christakoucl@yahoo.gr](mailto:christakoucl@yahoo.gr)

### **ΕΓΚΥΚΛΙΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ**

1993-1999: Αρσάκειο-Τοσίτσειο Εκάλης, Γυμνάσιο-Λύκειο

### **ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ**

1999-2005: Ιατρική Σχολή Αθηνών. Βαθμός πτυχίου: “Λίαν καλώς”.

### **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΟ**

2006-2009: Κλινική έρευνα: Ενδοκρινολογικό Τμήμα Α΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ «Λαϊκό», Ειδικό Ιατρείο Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών και Προβλημάτων Μεταβολισμού, Ευγενίδειο Θεραπευτήριο.

2009 μέχρι σήμερα: Κλινική έρευνα: Γ΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΓΝΝΘ «Σωτηρία».

Δεκέμβριος 2008-Δεκέμβριος 2010: Ειδικότητα Παθολογίας, Νοσοκομείο «Άγιος Σάββας»

Απρίλιος 2011- Δεκέμβριος 2011: Υπηρεσία υπάιθρου. Κέντρο Υγείας Ιστιαίας

Ιανουάριος 2012 μέχρι σήμερα: Έμμισθος επιστημονικός συνεργάτης ΔΚΘΑ «Υγεία», Ογκολογικό τμήμα, Διευθυντής Αθανάσιος Αλεξόπουλος

### **Βραβεία-Διακρίσεις**

2010: Βραβείο Ελληνικής Ενδοκρινολογικής Εταιρίας για την εργασία με τίτλο: «Χαμηλότερα επίπεδα ολικής Οστεοκαλσίνης και υψηλότερα επίπεδα της καρβοξυλιωμένης της μορφής στο Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών σε συσχέτιση με τα χαρακτηριστικά του Συνδρόμου».

Διαμάντη-Κανδαράκη Ε., Λιβαδάς Σ., Οικονόμου Φ., Κανδαράκη Ε., Χρηστάκου Χ., Κατσίκης Η., Πιπέρη Χ., Μάντζιου Α., Παπαβασιλείου Α., Πανίδης Δ.

2008: Βραβείο στη μνήμη του Ι. Γιαννάτου από την Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία (35ο Πανελλήνιο Ενδοκρινολογικό Συνέδριο) για την εργασία με τίτλο: «Η αύξηση των αθηρογόνων μορίων, προϊόντων προχωρημένης γλυκο-ζυλίωσης (AGEs) του ορού, είναι ειδικό εύρημα μόνο σε γυναίκες με το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών, συγκριτικά με εκείνες που παρουσιάζουν μεμονωμένα τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου».

Διαμάντη-Κανδαράκη Ε., Κατσίκης Η., Πιπέρη Χ., Κανδαράκη Ε., Πιούκα Α., Χρηστάκου Χ., Παπαβασιλείου Α. Γ., Πανίδης Δ.

2003: Υποτροφία Ι.Κ.Υ. για άριστη επίδοση στο 4ο έτος σπουδών.

**Κριτής σε επιστημονικά περιοδικά**  
European Journal of Endocrinology

**Ανακοινώσεις σε επιστημονικά συνέδρια**

Διεθνή (n=10)

Ελληνικά (n=12)

**ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ**

**Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά**

1. Christakou C, Kollias A, Piperi C, Katsikis I, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E. The benefit-to-risk ratio of common treatments in PCOS: effect of oral contraceptives versus metformin on atherogenic markers. *Hormones*, in press.
2. Christakou C, Diamanti-Kandarakis E. Structural, Biochemical and Non-Traditional Cardiovascular Risk Markers in PCOS. *Curr Pharm Des.* 2013;19(32):5764-74.
3. Christakou C, Economou F, Livadas S, Piperi C, Adamopoulos C, Marinakis E, Diamanti-Kandarakis E. Strong and positive association of endothelin-1 with AGEs in PCOS: a causal relationship or a bystander? *Hormones (Athens).* 2011;10(4):292-7.
4. Diamanti-Kandarakis E, Christakou C, Marinakis E. Phenotypes and environmental factors: their influence in PCOS. *Curr Pharm Des.* 2012;18(3):270-82. Review.
5. Tantalaki E., Piperi C., Livadas S., Kollias A., Adamopoulos C., Koulouri A., Christakou C. & Diamanti-Kandarakis E. Impact of dietary advanced glycation end products modifications on metabolic and hormonal profile in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2012;33 (03\_Meeting Abstracts): SUN-42
6. Livadas S, Chaskou S, Kandaraki AA, Skourletos G, Economou F, Christou M, Boutzios G, Karachalios A, Zerva A, Xyrafis X, Christakou C, Pighou AK, Diamanti-Kandarakis E. Anxiety is associated with hormonal and metabolic profile in women with polycystic ovarian syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; 75(5):698-703.
7. Economou F, Xyrafis X, Christakou C, Diamanti-Kandarakis E. The pluripotential effects of hypolipidemic treatment for polycystic ovary syndrome (PCOS): dyslipidemia, cardiovascular risk factors and beyond. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (9):908-21. Review.
8. Diamanti-Kandarakis E, Economou F, Palimeri S, Christakou C. Metformin in polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1205:192-8. Review.
9. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162(2):193-212.
10. Economou F, Xyrafis X, Livadas S, Androulakis II, Argyrakopoulou G, Christakou CD, Kandaraki E, Palioura E, Diamanti-Kandarakis E. In overweight/obese but not in normal-weight women, polycystic ovary syndrome is associated with elevated liver enzymes compared to controls. *Hormones (Athens).* 2009; 8(3):199-206.
11. Kandaraki E, Christakou C, Diamanti-Kandarakis E. Metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome...and vice versa. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009; 53(2): 227-37. Review.
12. Diamanti-Kandarakis E, Kandaraki E, Christakou C, Panidis D. The effect of pharmaceutical intervention on lipid profile in polycystic ovary syndrome. *Obes Rev.* 2009; 10(4):431-41. Review.

13. Diamanti-Kandarakis E, Xyrafis X, Boutzios G, Christakou C. Pancreatic beta-cells dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Panminerva Med.* 2008; 50(4): 315-25.
14. Christakou CD, Diamanti-Kandarakis E. Role of androgen excess on metabolic aberrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *Womens Health (Lond Engl).* 2008;4(6):583-94.
15. Diamanti-Kandarakis E, Christakou C, Palioura E, Kandaraki E, Livadas S. Does polycystic ovary syndrome start in childhood? *Pediatr Endocrinol Rev.* 2008; 5 (4):904-11. Review.
16. Diamanti-Kandarakis E, Christakou C, Kandarakis H. Polycystic ovarian syndrome: the commonest cause of hyperandrogenemia in women as a risk factor for metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol.* 2007;32(1):35-47. Review.
17. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Alexandraki KI. Early onset adiposity: a pathway to polycystic ovary syndrome in adolescents? *Hormones (Athens).* 2007;6(3):210-7.
18. Livadas S., Tantalaki E., Economou F., Palioura E., Boutzios G., Xyrafis X., Christakou C., Diamanti-Kandarakis E. Brown tumor due to hyperparathyroidism. *Arch. Hel. Med.* 2007; 24(4):399-399
19. Diamanti-Kandarakis E, Christakou C. Prevalence, definition and clinical manifestations of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Nutr* 2006; 53(Suppl 1):25–33.

#### **Δημοσιεύσεις σε ελληνικά επιστημονικά περιοδικά**

1. Xyrafis X., Livadas S., Boutzios G., Tantalaki E., Economou F., Christou M., Christakou C., Palioura E., Kouskouti C., Kandaraki E., Tsagkaraki G., Diamanti-Kandarakis E. HAIR-AN syndrome *Arch. Hel. Med.* 2007; 24(6):634-634.
2. Livadas S., Tantalaki E, Economou F, Palioura E, Boutzios G, Xyrafis X, Christakou C, Diamanti-Kandarakis E. Brown tumor due to hyperparathyroidism *Arch. Hel. Med.* 2007; 24(4):399-399

#### **Κεφάλαια σε διεθνή επιστημονικά συγγράμματα**

1. Evanthia Diamanti-Kandarakis, Charikleia D. Christakou “Insulin Resistance in PCOS” in *Diagnosis and Management of Polycystic Ovary Syndrome*, Diamanti-Kandarakis E. and Farid N. & (eds), 2009, SpringerLink.
2. Charikleia Christakou, Evanthia Diamanti-Kandarakis. “Metformin: The Therapeutic Actions and Clinical Implications in PCOS” in *Advances in Medicine and Biology*. Vol 47, Berhardt L.(ed.),2012, Nova Publishers.

#### **Κεφάλαια σε ελληνικά επιστημονικά συγγράμματα**

1. Διαμάντη Κανδαράκη Ευανθία, Χρηστάκου Χαρίκλεια. «Διαγνωστικές δοκιμασίες διαταραχών γοναδικής λειτουργίας στον άνδρα» στο σύγγραμμα *Εφαρμοσμένη Ενδοκρινολογία*. Εκδότης: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008
2. Διαμάντη Κανδαράκη Ευανθία, Χρηστάκου Χαρίκλεια. «Διαγνωστικές δοκιμασίες διαταραχών γοναδικής λειτουργίας στη γυναίκα» στο σύγγραμμα *Εφαρμοσμένη Ενδοκρινολογία*. Εκδότης: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008.
3. Διαμάντη Κανδαράκη Ευανθία, Χρηστάκου Χαρίκλεια, Κανδαράκη Ελένη. «Το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών: Παθοφυσιολογικοί και μοριακοί μηχανισμοί»

στο σύγγραμμα «Ανωθυλακιορρηξία και διαταραχές της εμμήνου ρύσεως».  
Εκδότες: Πανίδης Δ, Ζουρνατζή Β, Δίνας Κ, Τζαφέττας Ι.Θεσσαλονίκη 2009.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί το πόνημα της επί σειρά ετών εργασίας και συνεργασίας μου με μια πληθώρα ανθρώπων, ο καθένας από τους οποίους είχε σημαντική συμβολή στο τελικό αποτέλεσμα. Καταρχήν, οφείλω ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κα Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη για την καθοριστική συμβολή στην διαμόρφωση αυτής της διατριβής και την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγησή της. Την ευχαριστώ για την τιμή που μου έκανε να εργασθώ και να μαθητεύσω κοντά της κατά τη διάρκεια των τελευταίων επτά ετών θέτοντας τα θεμέλια της αγάπης και της γνώσης για την Ενδοκρινολογία και την κλινική έρευνα. Κυρίως θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την διδασκαλία της, η οποία δεν περιορίζεται στη μετάδοση γνώσεων, αλλά βασίζεται στην έμπρακτη αφοσίωση στην ιατρική επιστήμη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Πανίδα για την ουσιαστική συμβολή του στη συλλογή των περιστατικών και την επίβλεψη της μελέτης. Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεράσιμο Πάγκαλη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Τεντολούρη για την επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχαν ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χριστίνα Πιπέρη, η οποία ήταν η επιστημονική υπεύθυνος για τις εργαστηριακές αναλύσεις που έγιναν στο εργαστήριο της Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον συνάδελφο ιατρό κ. Αναστάσιο Κόλλια για την ουσιαστική συμβολή του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο ιατρό, κα Ελένη Κανδαράκη, για την ηθική συμπαράστασή της στην ολοκλήρωση της διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ για την προθυμία και τη συνεργασία τους τις ασθενείς με ΣΠΩ που συμμετείχαν στη μελέτη.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες σημειώθηκαν βήματα προόδου όσον αφορά στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του Συνδρόμου Πολυκυστικών Ωοθηκών (ΣΠΩ), που αποτελεί τη συχνότερη ενδοκρινοπάθεια των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Σημαντικές εξελίξεις ήταν η διαπίστωση ότι το σύνδρομο αποτελεί έναν συνδυασμό αναπαραγωγικών και μεταβολικών διαταραχών καθώς επίσης η παθογενετική σύνδεση του ΣΠΩ με την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Επιπλέον, στο ΣΠΩ έχουν παρατηρηθεί βιοχημικές διαταραχές που αφορούν το αγγειακό ενδοθήλιο και τους δείκτες φλεγμονής. Νεότερα προαθηρογόνα μόρια, όπως τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced glycation end products, AGEs) ανευρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στις γυναίκες με ΣΠΩ ανεξαρτήτως του μεταβολικού φαινοτύπου τους. Το σύνολο αυτών των διαταραχών πιθανόν συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου για την εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων σ' αυτόν τον πληθυσμό. Οι νέες παθοφυσιολογικές διαστάσεις του συνδρόμου έθεσαν τα θεμέλια, για να διευρυνθεί η θεραπευτική προσέγγιση του ΣΠΩ, με στόχο την σφαιρική αντιμετώπιση των πολλαπλών κλινικών εκδηλώσεων και τη μείωση του μεταβολικού και καρδιαγγειακού κινδύνου που το συνοδεύουν. Σ' αυτά τα πλαίσια, αφενός επανεξετάζεται ο ρόλος των διαθέσιμων φαρμακευτικών παρεμβάσεων, που ήδη εφαρμόζονται στο ΣΠΩ και αφετέρου αναζητούνται νέες φαρμακευτικές παρεμβάσεις, που θα συνδυάζουν ταυτόχρονες θεραπευτικές δράσεις σε όλο παθοφυσιολογικό το φάσμα του ΣΠΩ.

Ως προς τις ήδη υπάρχουσες φαρμακευτικές επιλογές, επανεξετάζεται ο ρόλος των ευρύτερα χρησιμοποιούμενων φαρμακευτικών παρεμβάσεων στις γυναίκες με ΣΠΩ, δηλαδή των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων (ΣΑΔ) και της μετφορμίνης. Ορισμένες από τις υπάρχουσες μελέτες έδειξαν ότι τα ΣΑΔ μπορεί να επιδεινώνουν το μεταβολικό φαινότυπο και τους δείκτες φλεγμονής, ενώ η ακριβής επίδρασή τους στα επίπεδα AGEs ορού δεν έχει διερευνηθεί. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να διαφοροποιούνται μεταξύ διαφορετικών ΣΑΔ και έχουν ιδιαίτερη σημασία σε ασθενείς πιθανού υψηλού κινδύνου για μεταβολικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως οι ασθενείς με ΣΠΩ. Επιπλέον, η μετφορμίνη, ο πλέον διαδεδομένος ινσουλινο-ευαισθητοποιητής, στοχεύει στη συνδυασμένη διόρθωση των αναπαραγωγικών και μεταβολικών διαταραχών του συνδρόμου. Οι πολύπλευρες θεραπευτικές δράσεις της μετφορμίνης πιθανόν βασίζονται στην ιδιότητα της τελευταίας να βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση και να ασκεί πιθανές απευθείας δράσεις στις διεργασίες της χρόνιας φλεγμονής και της γλυκοζυλίωσης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα σύγκρισης της μετφορμίνης και των αντισυλληπτικών δισκίων ως προς τις επιδράσεις τους στα επίπεδα AGEs ορού σε γυναίκες με ΣΠΩ.

Η παρούσα μελέτη ήταν προοπτική τύπου παρέμβασης και εκπονήθηκε με σκοπό να διερευνήσει την επίδραση των ΣΑΔ και της μετφορμίνης σε δύο αθηρογόνους δείκτες και συγκεκριμένα την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και τα AGEs ορού στις λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ. Τα ερωτήματα που ετέθησαν προς απάντηση ήταν: α) ποια η επίδραση των ΣΑΔ συγκριτικά με τη μετφορμίνη στους αθηρογόνους δείκτες, β) ποιος τύπος ΣΑΔ ασκεί δυσμενέστερες επιδράσεις, γ) αν η μετφορμίνη ασκεί θετικές επιδράσεις στο σύνολο των αθηρογόνων δεικτών. Η παρούσα μελέτη πιθανόν προσφέρει χρήσιμα δεδομένα ως προς τα ανωτέρω ερωτήματα ειδικά στις λεπτόσωμες ασθενείς με ΣΠΩ. Οι λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ αποτελούν τον κατάλληλο πληθυσμό για τη συγκεκριμένη σύγκριση, διότι αφενός αναμένεται να έχουν αυξημένα επίπεδα AGEs συγκριτικά με τις

μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και του ίδιου δείκτη μάζας σώματος. Αφετέρου, οι όποιες μεταβολές των AGEs μπορούν να μελετηθούν χωρίς την παρεμβολή συγχυτικών παραγόντων, όπως η παχυσαρκία και οι συνοδές μεταβολικές διαταραχές.

Στη μελέτη εντάχθηκαν 120 λεπτόσωμες ασθενείς με ΣΠΩ, οι οποίες προσήλθαν στα Ενδοκρινολογικά Τμήματα δύο Πανεπιστημιακών Νοσοκομείων στην Αθήνα και στη Θεσσαλονίκη. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες εξάμηνης φαρμακευτικής παρέμβασης με συνδυασμό αιθυνλικής οιστραδιόλης και οξεϊκής κυπροτερόνης (OCP1, n=40) ή συνδυασμό αιθυνλικής οιστραδιόλης και δροσπιρενόνης (OCP2, n=40) ή μετφορμίνη (MET, n=40). Σ' αυτές τις τρεις ομάδες προσδιορίστηκαν τα επίπεδα AGEs ορού και CRP κατά την έναρξη της μελέτης, καθώς επίσης τρεις και έξι μήνες μετά την φαρμακευτική παρέμβαση. Για τον προσδιορισμό των AGEs ορού εφαρμόστηκε η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος ELISA.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος αναφέρονται οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί του ΣΠΩ, με έμφαση στους μηχανισμούς που συνδέουν το ΣΠΩ με αυξημένο κίνδυνο μεταβολικών και καρδιαγγειακών διαταραχών. Επίσης, παρατίθενται τα βιβλιογραφικά δεδομένα που δείχνουν τα αυξημένα επίπεδα των παραγόντων της φλεγμονής και των AGEs ορού στις γυναίκες με ΣΠΩ και συζητούνται οι δράσεις αυτών των μορίων γενικά και ειδικότερα στο παθοφυσιολογικό φάσμα του συνδρόμου. Τέλος, αναλύονται οι δράσεις και οι μηχανισμοί δράσης των ΣΑΔ και της μετφορμίνης στις γυναίκες με ΣΠΩ εστιάζοντας στις μεταβολικές παραμέτρους, τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου και ιδιαίτερα στους δείκτες φλεγμονής και γλυκοοξειδωσης.

Στο ειδικό μέρος περιλαμβάνεται το υλικό (ομάδες ασθενών), οι μέθοδοι προσδιορισμού των εργαστηριακών παραμέτρων, τα αποτελέσματα αυτών, καθώς και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, συζητούνται τα ευρήματά μας στο πλαίσιο των διεθνών βιβλιογραφικών δεδομένων, παρουσιάζονται οι μελλοντικές προοπτικές που προκύπτουν και τέλος, παρατίθενται η περίληψη και οι βιβλιογραφικές αναφορές.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

17β-E2: 17β-οιστραδιόλη  
17βHSD: 17β –υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση  
17OHP: 17- υδροξυπρογεστερόνη  
20-HETE:20-υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ  
3βHSD: 3β –υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση  
ACC: ακετυλο-CoA καρβοξυλάση  
ACTH: αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη  
AGEs: advanced glycation end products, τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης  
Akt: Πρωτεϊνική κινάση B  
AMH: Αντιμυλλεριανη ορμόνη  
AMPK 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase  
ANG II:αγγειοτενσίνη II  
CML: Καρβοξυμεθυλυσίνη  
COCs συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία  
CPA: cyproterone acetate, οξείκη κυπροτερόνη  
CRP: C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη  
DNA: Δεσοξυριβονουκλικό οξύ  
DRSP: δροσπιρενόνη  
ERα: estrogen receptor-α, υποδοχέας οιστρογόνων-α  
CYP17 (P-450c17): 17-20 λυάση/17-υδροξυλάση  
DHEA: δεϋδροεπιανδροστερόνη  
DHEAS: θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη  
DHT: Διϋδροτεστοστερόνη  
E2: οιστραδιόλη  
ECM: Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία  
EE: αιθυνλική οιστραδιόλη  
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ανοσοενζυμική προσροφητική μέθοδος  
eNOS: endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου  
ERK: Extracellular regulated kinase, Εξωκυττάρια ρυθμιζόμενη κινάση  
ET-1: ενδοθηλίνη-1  
FFAs: Free fatty acids, Ελεύθερα λιπαρά οξέα  
FSH: Follicle stimulating hormone, Ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη  
GnRH: Gonadotropin releasing hormone, Εκλυτική Ορμόνη των γοναδοτροφινών  
GLO: Glyoxalase, γλυοξαλάση  
GLUT-4: glucose transporter-4,πρωτεΐνη-μεταφορέας γλυκόζης-4  
HDL(-C): high density lipoprotein(-cholesterol), υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (-χοληστερόλη)  
IGF: insulin growth factor, αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης  
IGT: Impaired glucose tolerance  
IL-1: Ιντερλευκίνη -1  
IL-6: Ιντερλευκίνη -6  
iNOS: inducible nitric oxide synthase, επαγώγιμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου

IRS-1: insulin receptor substrate 1, υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης-1  
 LDL: low density lipoprotein, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη  
 LH: Luteinizing hormone, Ωχρινοτρόπος ορμόνη  
 LOX: lysyl oxidase  
 MAPK: Mitogen activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα  
 MCP1: monocyte chemotactic protein-1, χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων -1  
 MEK: Mitogen-activated protein/ extracellular signal-regulated kinase kinase  
 MG: Methylglyoxal, μεθυλγλυοξάλη  
 MMP-2: Μεταλλοπρωτεΐνάση-2  
 MMP-9: Μεταλλοπρωτεΐνάση-9  
 mTOR: mammalian target of rapamycin  
 NADPH: Νικοτιναμινοαδενινο-φωσφορικό δινουκλεοτίδιο  
 NF-κB: Nuclear factor κB, Πυρηνικός παράγοντας κB  
 NO: nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου  
 OCPs: Από του στόματος αντισυλληπτικά δισκία  
 OGTT: Oral glucose tolerance test, Καμπύλη Γλυκόζης με λήψη από του στόματος γλυκόζης  
 oxLDL: οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, oxidized low density lipoprotein  
 P450<sub>scc</sub> (CYP11A1): Cholesterol side-chain cleavage enzyme  
 PDK-1: Phosphoinositide-dependent Kinase-1, εξαρτώμενη από την φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη κινάση-1  
 PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, Κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3  
 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate  
 PI(4,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
 PKB: Πρωτεϊνική κινάση B  
 PKC: Πρωτεϊνική κινάση C  
 PKCζ: Πρωτεϊνική κινάση Cζ  
 RAS: Renin Angiotensin System, σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης  
 ROS: Reactive oxygen species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου  
 Ser: Σερίνη  
 SHBG: δεσμευτική σφαιρίνη των στεροειδών του φύλου  
 SOD: superoxide dismutase, δισμουτάση του υπεροξειδίου  
 StAR: Steroid acute regulatory protein  
 Testo: Τεστοστερόνη  
 TGF-β: Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β  
 TNFα: Tumor Necrosis Factor-α, Παράγοντας νέκρωσης του όγκου-α  
 VCAM: Vascular cell adhesion molecule  
 VEGF: Vascular endothelial growth factor  
 WHO: World health organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας  
 WHR: waist to hip ratio, λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων  
 AEE: Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο  
 Δ4Α: Δ4-Ανδροστενδιόνη  
 ΔΑΓ: Διαταραχή Ανοχής Γλυκόζης  
 ΔΜΣ: Δείκτης μάζας σώματος  
 ΕΒΦΘ: Εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση

ΟΕΜ: Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου  
ΣΑΔ: Συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία  
ΣΔτ2: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2  
ΣΝ: Στεφανιαία νόσος  
ΣΠΩ: Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ)

#### 1.1 Γενικά –Ορισμός

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (ΣΠΩ) αποτελεί συχνή ενδοκρινοπάθεια των γυναικών που συνδυάζει αναπαραγωγικές και μεταβολικές διαταραχές. Άλλες ονομασίες του συνδρόμου είναι: σύνδρομο Stein-Leventhal, χρόνια υπερανδρογονική ανωοθυλακιορρηξία, λειτουργικός ωοθηκικός υπερανδρογονισμός. Η πρώτη περιγραφή του συνδρόμου έγινε το 1935 από τους Stein & Leventhal που κατέγραψαν επτά περιπτώσεις γυναικών με αραιο/αμηνόρροια, παχυσαρκία, υπερτρίχωση και αμφοτερόπλευρη πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών (Stein & Leventhal 1935).

Ο ορισμός του συνδρόμου υπήρξε θέμα συνεχούς συζήτησης μεταξύ των ειδικών λόγω της απουσίας διεθνώς αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων. Το 1990 τέθηκαν τα πρώτα κριτήρια διάγνωσης του συνδρόμου από το National Institute of Health and Human Development Child Health (NIH) (Zawadski & Dunaif 1992). Ο πρώτος ορισμός του ΣΠΩ περιλαμβάνει το συνδυασμό βιοχημικής ή κλινικής υπερανδρογοναιμίας (υπερανδρογονισμού) και χρόνιας ανωοθυλακιορρηξίας, εφόσον έχουν αποκλεισθεί όλες οι άλλες νοσολογικές οντότητες που εμφανίζουν παρόμοια κλινική εικόνα (Zawadski & Dunaif 1992) (Πίνακας 1).

Ακολούθησαν δύο τροποποιημένοι ορισμοί του συνδρόμου, που περιλαμβάνουν την πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών ως διαγνωστικό κριτήριο του ΣΠΩ (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group 2003; Azziz et al., 2006a). Το 2003 στο Rotterdam Consensus Workshop ορίστηκε ότι για τη διάγνωση του ΣΠΩ απαιτείται ο συνδυασμός δύο εκ των ακόλουθων τριών κριτηρίων: α) αραιοαμηνόρροια ή χρόνια ανωοθυλακιορρηξία, β) κλινική ή βιοχημική υπερανδρογοναιμία και γ) Πολυκυστική Μορφολογία Ωοθηκών. Αυτός ο ορισμός εισήγαγε δύο νέους φαινότυπους, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τον συνδυασμό της πολυκυστικής μορφολογίας των ωοθηκών με την παρουσία υπερανδρογονισμού/ υπερανδρογοναιμίας ή ανωοθυλακιορρηξίας (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group 2003). Ο τελευταίος φαινότυπος που συνδυάζει την πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών με την ανωοθυλακιορρηξία, αλλά έχει φυσιολογικά επίπεδα ανδρογόνων, τελεί υπό αμφισβήτηση από σημαντική μερίδα των ειδικών (Azziz et al., 2006b).

Στον πλέον πρόσφατο διαγνωστικό ορισμό του ΣΠΩ από την Androgen Excess Society το 2006 ο υπερανδρογονισμός (κλινική ή/και βιοχημική υπερανδρογοναιμία) είναι απαραίτητο κριτήριο για τη διάγνωση του ΣΠΩ. Ο νεότερος ορισμός αποτελεί συγκερασμό των δύο προηγούμενων ορισμών του συνδρόμου (Azziz et al., 2006a) (Πίνακας 1). Όλοι οι ορισμοί προϋποθέτουν τον αποκλεισμό άλλων αιτιών υπερανδρογοναιμίας (Πίνακας 2).

## Πίνακας 1

<b>Διαγνωστικά κριτήρια του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών</b>
<b>NIH κριτήρια 1990</b>
Χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και Υπερανδρογονισμός (Κλινικά σημεία και/ή βιοχημικά ευρήματα υπερανδρογοναιμίας)
<b>Rotterdam κριτήρια 2003</b>
<b>Δύο από τα τρία:</b> – Όλιγο- ή ανωοθυλακιορρηξία – Κλινικά ή βιοχημικά σημεία υπερανδρογοναιμίας – Πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών
<b>Androgen Excess Society κριτήρια 2006</b>
1.Υπερανδρογονισμός : Υπερτρίχωση και / ή υπερανδρογοναιμία <b>Και</b> 2.Ωοθηκική δυσλειτουργία : Όλιγο- ανωοθυλακιορρηξία και/ή πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών

### 1.2 Επιδημιολογία

Το ΣΠΩ είναι η συχνότερη ενδοκρινοπάθεια των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Η επίπτωση του συνδρόμου στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας βρέθηκε 6,8% στη ελληνική νήσο Λέσβο (*Diamanti-Kandarakis et al., 1999*), ενώ ανάλογα ήταν τα ευρήματα επιδημιολογικών μελετών στην Ισπανία (*Asuncion et al., 2000*) και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (*Azziz et al., 2004*). Ως εκ τούτου, η επίπτωση του συνδρόμου στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας θεωρείται 6,5-6,8% διεθνώς. Σ' αυτές τις μελέτες η διάγνωση του ΣΠΩ έγινε με τα κριτήρια NIH 1990 (*Zawadski & Dunaif 1992*). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (*Yildiz et al., 2012*) που χρησιμοποίησε τα νεότερα κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΠΩ, η επίπτωση του συνδρόμου βρέθηκε 20% με βάση τα Rotterdam κριτήρια και 15% με βάση τα Androgen Excess Society criteria.

### 1.3 Παθογένεια-Παθοφυσιολογία

Στην παθογένεια και παθοφυσιολογία του ΣΠΩ ενέχονται τρεις κύριες διαταραχές, η υπερανδρογοναιμία, η διαταραχή της ωοθυλακιογένεσης και η αντίσταση στην ινσουλίνη, καθεμιά από τις οποίες συμβάλλουν σε άλλοτε άλλο βαθμό στην παθοφυσιολογία και στην κλινική εικόνα του ΣΠΩ. Επιπρόσθετο ρόλο φαίνεται να έχουν η χρόνια φλεγμονή και το αυξημένο γλυκοξείδωτικό φορτίο.

#### 1.3.1 Υπερανδρογοναιμία

Η βιοχημική υπερανδρογοναιμία στο ΣΠΩ εμφανίζεται στην πλειοψηφία των γυναικών με ΣΠΩ (*Azziz et al., 2006a*). Οι διαταραχές της στεροειδογένεσης στα επινεφρίδια και στις ωοθήκες θεωρούνται πρωτογενής διαταραχή του συνδρόμου.

Λειτουργική επινεφριδική υπερανδρογοναιμία, δηλαδή αυξημένη παραγωγή επινεφριδικών ανδρογόνων μετά από διέγερση με αδρενοκορτικοτρόπο ορμόνη (ACTH), παρατηρείται στο 50% των γυναικών με ΣΠΩ. Η επινεφριδική υπερανδρογοναιμία στο ΣΠΩ αποδίδεται σε υπερδραστηριότητα του ενζύμου P-450c17 (CYP17), το οποίο διαθέτει διπλή δράση, 17α-υδροξυλάσης και 17,20 λυάσης (*Rosenfield 1999*).

Η ωοθηκική υπερπαραγωγή ανδρογόνων θεωρείται ως η κυριότερη πηγή της βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας στο ΣΠΩ. Τα κύτταρα της θήκης των ωοθηκών

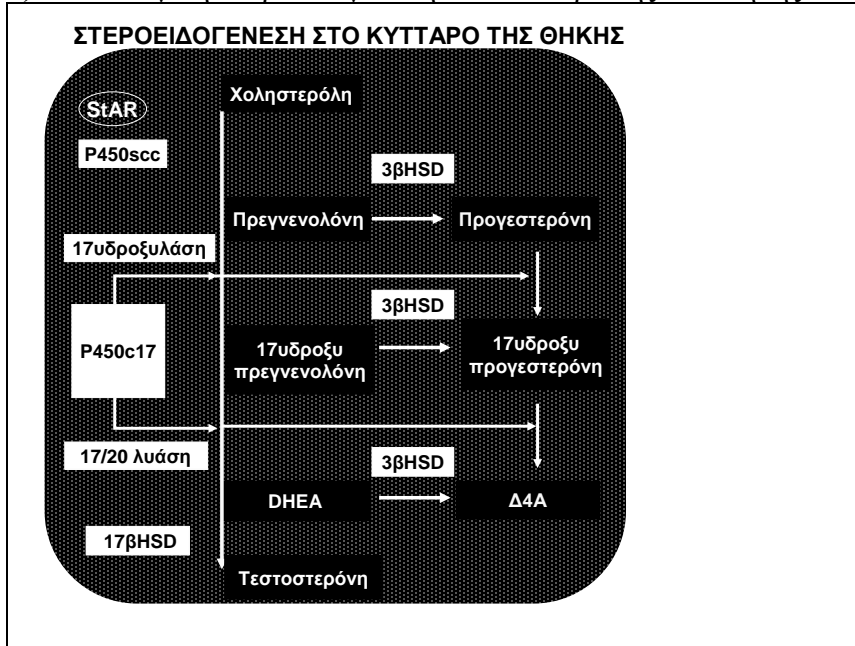
διαθέτουν τα ένζυμα της στεροειδογένεσης και παράγουν de novo ανδρογόνα από χοληστερόλη σε απάντηση στη διέγερση από την ωχρινότροπο ορμόνη (Luteinizing hormone, LH).

Για τη φυσιολογική ωθητική στεροειδογένεση, οι ωθήκες προσλαμβάνουν χοληστερόλη από τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low density lipoprotein, LDL) του πλάσματος. Η μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια, όπου θα λειτουργήσει ως το αρχικό υπόστρωμα της στεροειδογένεσης, γίνεται με την Steroid acute regulatory protein (StAR). Ακολούθως, η χοληστερόλη υφίσταται διάσπαση της πλευρικής αλύσου και σχηματίζει πρεγνενολόνη με τη δράση του ενζύμου δεσμολάση της χοληστερόλης (Cholesterol side-chain cleavage enzyme, P-450c17), που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11A1. Η πρεγνενολόνη μετατρέπεται σε προγεστερόνη (P) με τη δράση του ενζύμου 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (3β-HSD). Η πρεγνενολόνη και η προγεστερόνη μετατρέπονται σε 17α-υδροξυλιωμένα παράγωγα με το ένζυμο P-450c17 (CYP17). Αυτό το ένζυμο έχει διπλή δράση. Αφενός, όπως περιγράφηκε, δρα ως 17α-υδροξυλάση. Αφετέρου δρα ως 17,20-λυάση μετατρέποντας την 17-υδροξυπρεγνενολόνη και την 17-υδροξυπρογεστερόνη (17OHP) σε δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και Δ4-ανδροστενδιόνη (Δ4A), αντίστοιχα. Στη συνέχεια, η Δ4A μετατρέπεται σε τεστοστερόνη από το ένζυμο 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (17β-HSD) (**Σχήμα 1α**). Η Δ4A και η τεστοστερόνη αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες για τα οιστρογόνα, οιστρόνη και οιστραδιόλη (E2), αντίστοιχα, που παράγονται στην κοκκιώδη στιβάδα των ωοθυλακίων με την δράση της P-450 αρωματάσης (P450arom).

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων έσω θήκης που απομονώθηκαν από γυναίκες με ΣΠΩ, βρέθηκε αυξημένη παραγωγή DHEA, 17OHP και Δ4A συγκριτικά με τα κύτταρα έσω θήκης που απομονώθηκαν από γυναίκες χωρίς ΣΠΩ (Gilling-Smith *et al.*, 1994). Οι Nelson και συνεργάτες έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή αυτών των στεροειδών αποτελεί εγγενή και σταθερό βιοχημικό φαινότυπο στο ΣΠΩ (Nelson *et al.*, 1999). Διάφορες μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών με ΣΠΩ παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των γονιδίων CYP17 και CYP11A1 και αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα του P-450c17 και της 3β-HSD, σε σύγκριση με τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθυλακίων γυναικών χωρίς ΣΠΩ (Nelson *et al.*, 2001; Wickenheisser *et al.*, 2000; Wickenheisser *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004). Δεδομένου ότι αυτές οι μελέτες έγιναν με διατήρηση ανθρώπινων κυττάρων έσω θήκης σε μακροχρόνια καλλιέργεια, η αυξημένη στεροειδογενετική δραστηριότητα ήταν ανεξάρτητη από *in vivo* ερεθίσματα, όπως η ορμονική διέγερση της αυξημένης LH ή της υπερινσουλιναϊμίας που παρατηρούνται στο ΣΠΩ (Nelson *et al.*, 1999). Συνεπώς, φαίνεται ότι πολλά από τα ένζυμα της ωθητικής στεροειδογένεσης υπερεκφράζονται και υπερλειτουργούν στο ΣΠΩ οδηγώντας στην αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων (**Σχήμα 1β**).

## Σχήμα 1

α) Φυσιολογική στεροειδογένεση στα κύτταρα της έσω θήκης



β) Στεροειδογένεση στα κύτταρα της έσω θήκης στο ΣΠΩ



Συνομογραφίες: *3β-HSD*:3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση; *17β-HSD*:17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση; *DHEA*:δεϋδροεπιανδροστερόνη; *P450c17 (CYP17)*:17α-υδροξυλάση/17,20-λυάση; *P450scc(CYP11A1)*:Cholesterol side-chain cleavage enzyme; *StAR*:steroidogenic acute regulatory protein; *Δ4Α*:Δ4-Ανδροστενεδιόνη.

Επίσης, η υπερανδρογοναιμία εμφανίζει αυξημένη συχνότητα στις οικογένειες των γυναικών με το σύνδρομο (*Escobar-Morreale et al., 2005*). Αυτά τα δεδομένα καθώς και οι παρατηρήσεις από τα προαναφερόμενα *in vitro* πειράματα υποδηλώνουν ότι η υπερανδρογοναιμία είναι γενετικά καθορισμένη στο ΣΠΩ. Η γενετική βάση της υπερανδρογοναιμίας φαίνεται να είναι πολυγονιδιακή και δεν μπορεί να αποδοθεί σε μεμονωμένες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς στεροειδογενετικών γονιδίων (*Escobar-Morreale et al., 2005*).

Ωστόσο, τα κύτταρα της έσω θήκης των γυναικών με ΣΠΩ φαίνεται να δέχονται την επίδραση παραγόντων εξωθηκικής προέλευσης, οι οποίοι επιδεινώνουν την πιθανή εγγενή διαταραχή της ωθηκικής σύνθεσης ανδρογόνων. Ο κυριότερος από αυτούς τους παράγοντες είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη με τη συνοδό υπερινσουλιναιμία, οι οποίες θα συζητηθούν στην αντίστοιχη υποενότητα (1.3.3).

### 1.3.2 Ανωθυλακιορρηξία

Η χρόνια ανωθυλακιορρηξία στο ΣΠΩ φαίνεται ότι οφείλεται α) στην αναστολή της ωθυλακιογένεσης στο στάδιο του πρωτογενούς ωθυλακίου και β) στην πρόωμη ωχρινοποίηση των ωθυλακίων. Στην παθογένεια του φαινομένου ενέχονται ενδο και εξωθηκικοί παράγοντες (*Jonard & Dewailly 2004*) (**Σχήμα 2**).

Η ωθυλακιογένεση είναι μακροχρόνια, δυναμική διεργασία, κατά την οποία ωθυλάκια από την ωθηκική δεξαμενή των αρχέγονων ωθυλακίων στρατολογούνται σε «τροχιά» ανάπτυξης. Κατά την ανάπτυξή τους τα ωθυλάκια αυξάνονται σε μέγεθος με πολλαπλασιασμό των κυττάρων της έσω θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας και σχηματισμό μιας εσωτερικής κοιλότητας, του άντρου. Τα αναπτυσσόμενα ωθυλάκια χαρακτηρίζονται διαδοχικά ως πρωτογενή ωθυλάκια, δευτερογενή ωθυλάκια και δευτερογενή ωθυλάκια με άντρο. Οι ομάδες των ωθυλακίων που έχουν φτάσει στο τέλος της ωθυλακιογένεσης έχουν επιτύχει επαρκή ανάπτυξη της κοκκιώδους στιβάδας, η οποία εκφράζει τους αντίστοιχους υποδοχείς και ευαισθησία στη δράση της ωθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone, FSH). Στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, ομάδες αναπτυσσόμενων ωθυλακίων, που έχουν αποκτήσει ευαισθησία στην FSH, εισέρχονται στην διαδικασία της επιλογής, με καταληκτικό σημείο την ωθυλακιορρηξία του κυρίαρχου ωθυλακίου, που ακολουθεί τη μεσοκυκλική εκκριτική αιχμή της LH. Η διεργασία της στράτευσης και της ανάπτυξης των ωθυλακίων είναι πολύπλοκη και υφίσταται ρυθμιστικές επιδράσεις από μια σειρά ενδο-ωθηκικών και εξω-ωθηκικών παραγόντων, όπως οι γοναδοτροπίνες, τα ανδρογόνα, η ινσουλίνη, η αντιμυλλερική ορμόνη (Antimüllerian hormone, AMH) και αυξητικοί παράγοντες (**Σχήμα 2**) (*Jonard & Dewailly 2004*).

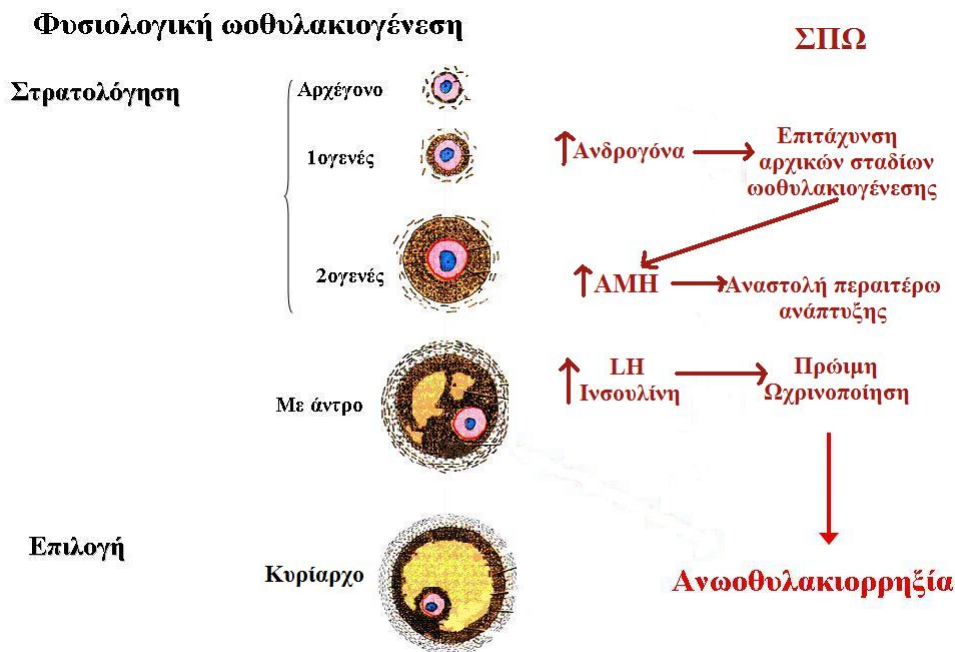
Ιστολογικές μελέτες των ωθηκών έδειξαν ότι ο αριθμός των αναπτυσσόμενων ωθυλακίων μπορεί να είναι διπλάσιος ως εξαπλάσιος στις γυναίκες με ΣΠΩ, παρόλο που ο αριθμός των αρχέγονων ωθυλακίων δεν διαφέρει μεταξύ των φυσιολογικών γυναικών και των ασθενών με ΣΠΩ (*Webber et al., 2003; Maciel et al., 2004*). Ο αυξημένος αριθμός των μικρών αναπτυσσόμενων ωθυλακίων, εύρημα που μπορεί να συμβαδίζει με την υπερηχογραφική εικόνα των πολυκυστικών ωθηκών, παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της τεστοστερόνης και της Δ4Α στον ορό (*Pache et al., 1993; Jonard et al., 2003*). Αυτά τα δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι η αυξημένη ενδοωθηκική ανδρογονική δραστηριότητα είναι υπεύθυνη για την αρχική επιτάχυνση



της εξέλιξης αυτών των ωοθυλακίων (Vendola et al., 1998; Jonard and Dewailly 2004). Ο αυξημένος αριθμός ωοθυλακίων παράγει μεγαλύτερα ποσά AMH, η οποία με αυτοκρινή και παρακρινή δράση αναστέλλει την περαιτέρω διαφοροποίηση των κυττάρων της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθυλακίων και μειώνει την ευαισθησία τους στην FSH (Jonard and Dewailly 2004). Ως αποτέλεσμα, διαταράσσεται η διαδικασία επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου οδηγώντας σε ανωοθυλακιορρηξία, ενώ τα ωοθυλάκια βρίσκονται σε αναστολή της ανάπτυξής τους (Jonard and Dewailly 2004). Η αναστολή της ωοθυλακιογένεσης στο ΣΠΩ θεωρείται αναστρέψιμη, δεδομένου ότι με την εξωγενή χορήγηση FSH επιτυγχάνεται περαιτέρω ανάπτυξη των ωοθυλακίων και ωοθυλακιορρηξία (Jonard and Dewailly 2004).

Για την αναστολή της ωοθυλακιογένεσης στο ΣΠΩ ενοχοποιούνται και εξωθητικοί μηχανισμοί, όπως η υπερινσουλιαιμία. Η υπερινσουλιαιμία αφενός φαίνεται να επιδεινώνει την ενδοωοθηκική υπερανδρογοναιμία και αφετέρου πιθανόν συντελεί στην πρώιμη και αυξημένη ευαισθησία των ωοθυλακίων στη δράση της LH (Σχήμα 2) (Jonard and Dewailly 2004).

**Σχήμα 2** Φυσιολογική ωοθυλακιογένεση και διαταραχές ωοθυλακιογένεσης στο ΣΠΩ



Συντομογραφίες: AMH: Αντιμυλλεριανή ορμόνη, LH: Ωχρινοτρόπος ορμόνη

### 1.3.3 Αντίσταση στην ινσουλίνη

Το ΣΠΩ χαρακτηρίζεται από αντίσταση των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη, η οποία παρατηρείται στις γυναίκες με ΣΠΩ, σε σύγκριση με μάρτυρες της ίδιας ηλικίας και ίδιου Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) (Dunaif et al., 1989). Ως αντίσταση στην ινσουλίνη ορίζεται η μειωμένη ευαισθησία ή απαντητικότητα των περιφερικών ιστών στις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί παθοφυσιολογική συνιστώσα του ΣΠΩ, ανεξάρτητη του σωματικού βάρους (Dunaif et al., 1989). Ωστόσο, η παχυσαρκία, που παρατηρείται σε ποσοστό 50-80% των ασθενών, επιδεινώνει την ινσουλινοαντίσταση (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012). Οι λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν μια εγγενή και γενετικά καθορισμένη μορφή αντίστασης στην ινσουλίνη. Οι παχύσαρκες ασθενείς παρουσιάζουν δύο επιπροστιθέμενες συνιστώσες, την εγγενή που χαρακτηρίζει το σύνδρομο και την οφειλόμενη στην παχυσαρκία αντίσταση στην ινσουλίνη (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012).

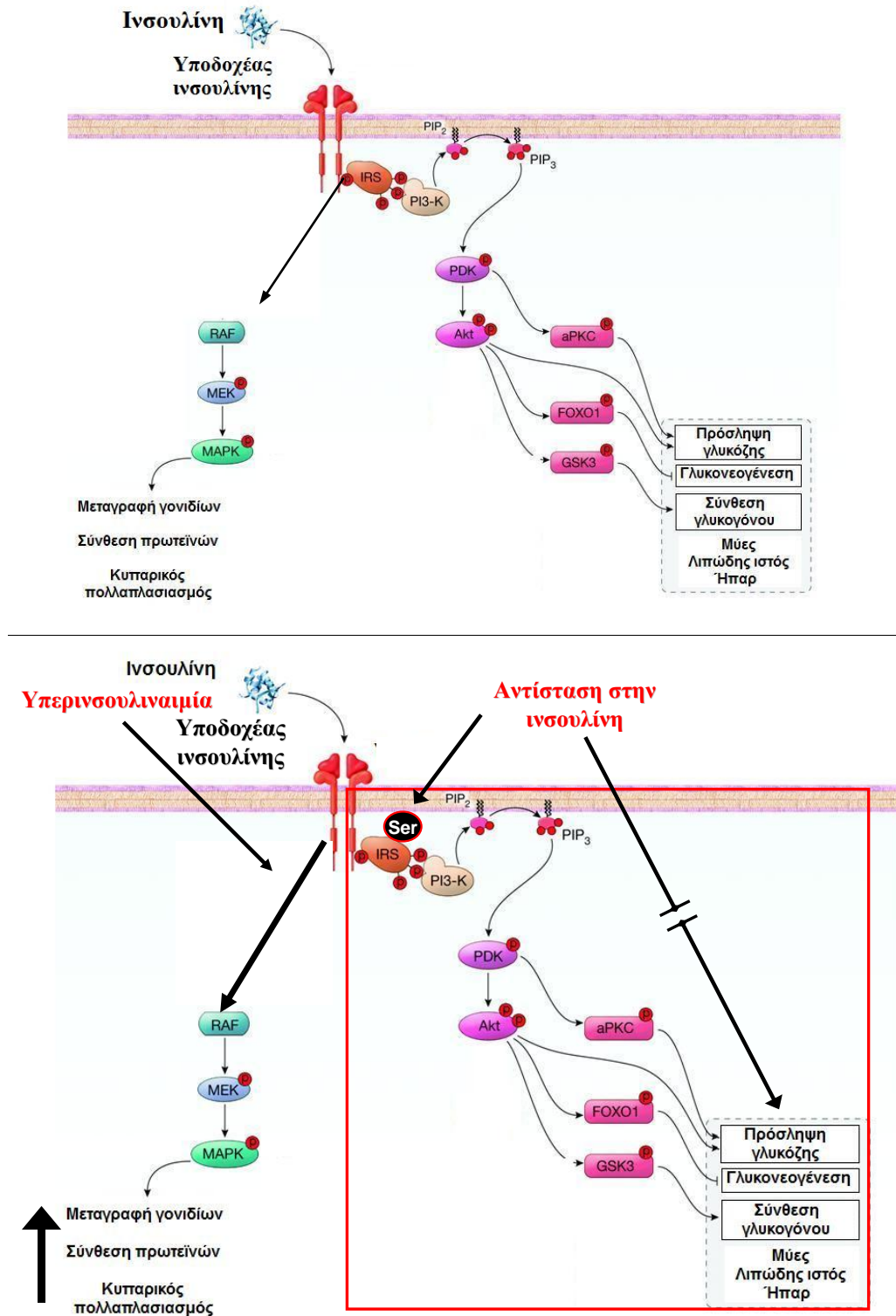
Μελέτες σε λιποκύτταρα, ινοβλάστες και μυϊκά κύτταρα έχουν δείξει ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ παρουσιάζουν μεταυποδοχιακή διαταραχή στη μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012; Diamanti-Kandarakis and Papavassiliou 2006). Αυτή η διαταραχή αφορά τις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης στους μυς, το λιπώδη ιστό και πιθανόν το ήπαρ, αλλά όχι τις μιτωτικές και αναβολικές δράσεις της (Σχήμα 3) (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012; Diamanti-Kandarakis and Papavassiliou 2006; Poretsky et al., 1999).

Σε φυσιολογικές συνθήκες η σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της οδηγεί σε φωσφορυλίωση της τυροσίνης του insulin receptor substrate-1 (IRS1) που συνδέεται και ενεργοποιεί την phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K οδηγεί στην παραγωγή του phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P3) που συνδέεται με την phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PKD-1). Ακολουθεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κινασών σερίνης/θρεονίνης, συμπεριλαμβανομένων της Akt και της atypical protein kinase C (aPKC). Αυτός ο καταρράκτης κινασών που ενεργοποιείται από την PI3K (PI3K-εξαρτώμενη οδός) διαμεσολαβεί τις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης και συγκεκριμένα, την πρόσληψη γλυκόζης (μέσω της Akt/aPKC), τη γλυκονεογένεση (μέσω του FOXO1) και τη σύνθεση γλυκογόνου (μέσω της glycogen synthase kinase 3, GSK3) (Muniyappa et al., 2007). Παράλληλα, η φωσφορυλίωση του IRS-1 ενεργοποιεί έναν επιπρόσθετο καταρράκτη φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνει τις κινάσες Raf, mitogen-activated protein kinase (MAPK) και MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK). Η MAPK-εξαρτώμενη οδός ρυθμίζει τις μη μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (Σχήμα 3).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη που χαρακτηρίζει το ΣΠΩ αποδίδεται σε μειωμένη αυτοφωσφορυλίωση των τυροσινών του ινσουλικού υποδοχέα (IR) και αυξημένη φωσφορυλίωση των σερινών στην β-υπομονάδα του IR και σε μοριακούς διαβιβαστές μετά τον υποδοχέα, κυρίως στον IRS-1 (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012). Η αυξημένη φωσφορυλίωση των σερινών αποδίδεται σε αυξημένη ενδοκυτταρική δραστηριότητα σερινικής κινάσης στο ΣΠΩ, αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012).

Η μέθοδος αναφοράς για την ποσοτικοποίηση της αντίστασης στην ινσουλίνη είναι η υπερινσουλιναιμική ευγλυκαιμική αντλία, η οποία αν και ακριβής, είναι εργώδης και χρονοβόρα στην εφαρμογή της. Για την απλούστευση του προσδιορισμού της ινσουλिनoαντίστασης έχουν αναπτυχθεί μαθηματικά μοντέλα-δείκτες που βασίζονται στις τιμές ινσουλίνης και γλυκόζης νηστείας ή τις αντίστοιχες τιμές κατά την δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης (Oral glucose tolerance test, OGTT). Με τη χρήση αυτών των μαθηματικών μοντέλων έχει διαπιστωθεί αντίσταση στην ινσουλίνη σε 44%-70% των γυναικών με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis and Dunaiif 2012*). Ωστόσο, αυτοί οι δείκτες στερούνται ευαισθησίας και ειδικότητας και δεν μπορούν να υποκαταστήσουν την υπερινσουλιναιμική ευγλυκαιμική αντλία (*Diamanti-Kandarakis et al., 2004*).

**Σχήμα 3** Ενδοκυττάρειες οδοί των δράσεων της ινσουλίνης στην περιφέρεια φυσιολογικά (πάνω) και σε κατάσταση ινσουλινοαντίστασης (κάτω)



Συντμήσεις: *aPKC*: atypical protein kinase C; *FOXO1*: Forkhead box protein O1;

*GSK3:Glycogen synthase 3; MAPK:mitogen-activated protein kinase; MEK:MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase; PDK-1:Phosphoinositide-dependent Kinase-1; PI3K:phosphatidylinositol 3-kinase; PI(3,4,5)P3:phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate; PI(4,5)P2:phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.* Τροποποίηση σχήματος από *Muniyappa et al., 2007.*

Η ινσουλινοαντίσταση θεωρείται εν μέρει εγγενής στο ΣΠΩ, ανεξάρτητη από τα λοιπά χαρακτηριστικά του συνδρόμου και επιπρόσθετους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, η υπερανδρογοναιμία φαίνεται να παίζει επιβαρυντικό ρόλο αφενός δρώντας άμεσα στην ενδοκυττάρια οδό σήματος της ινσουλίνης (*Corbould 2008*) και αφετέρου συμβάλλοντας στην σπλαγγχνική συσσώρευση λίπους (*Escobar-Morreale 2008*). Οι πιθανές μεταβολικές επιπτώσεις της υπερανδρογοναιμίας στο ΣΠΩ θα συζητηθούν εκτενέστερα στην υποενότητα 1.5.3.3. Ως εκ τούτου, ο κλασικός φαινότυπος του ΣΠΩ που συνδυάζει τον υπερανδρογονισμό με την ανωοθυλακιορρηξία (NIH κριτήρια) εμφανίζει μεγαλύτερο βαθμό ινσουλινοαντίστασης και σπλαγγχνικής παχυσαρκίας, συγκριτικά με το μη υπερανδρογονικό φαινότυπο που ορίζεται από τα κριτήρια Rotterdam (*Diamanti-Kandarakis and Panidis 2007a; Zhang et al., 2009; Rizzo et al., 2009; Amato et al., 2011; Yildiz et al., 2012; Moghetti et al., 2013*).

Η ινσουλινοαντίσταση προκαλεί αντιρροπιστική υπερινσουλιναίμια. Η υπερινσουλιναίμια πιθανόν επιδρά στο μονοπάτι των μιτωτικών/αναβολικών δράσεων της ινσουλίνης, που διατηρεί φυσιολογική ευαισθησία, και προκαλεί αύξηση αυτών των δράσεων (**Σχήμα 3**).

Η υπερινσουλιναίμια ενέχεται στην παθογένεια του ΣΠΩ με ποικίλους μηχανισμούς. Εκτός από τους κλασικούς ιστούς-στόχους, η ινσουλίνη δρα και σε ευρύ φάσμα ιστών και συστημάτων. Ειδικότερα για το ΣΠΩ, κεντρικό ρόλο έχουν οι δράσεις της ινσουλίνης μέσω των υποδοχέων της στην ωοθήκη. Η κυρίαρχη αντίφαση που διέπει την παθογένεια του ΣΠΩ έγκειται στο ότι παρά την περιφερική ινσουλινοαντίσταση, η ινσουλίνη διατηρεί την δράση της στην ωοθήκη (*Poretsky et al., 1991*) (**Σχήμα 4**). Κλινικές μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ έχουν αναδείξει την σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων ινσουλίνης ορού με τα επίπεδα ανδρογόνων ορού (*Nestler et al., 1998*).

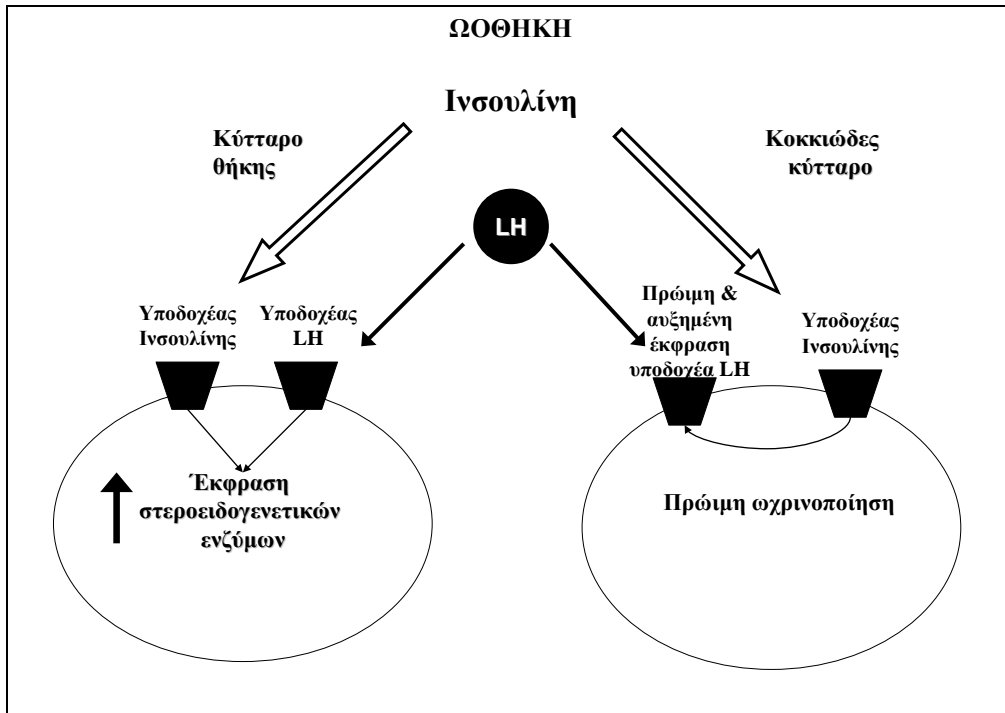
Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η ινσουλίνη προάγει τη βιοσύνθεση των ανδρογόνων στις ωοθήκες, δρώντας άμεσα μέσω των υποδοχέων της (*Nestler et al., 1996; Poretsky et al., 1999*) και έμμεσα ενισχύοντας την επίδραση της LH στην παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της θήκης (*Poretsky et al., 1999*) (**Σχήμα 4**). Συγκεκριμένα, η ινσουλίνη σε συνέργεια με την LH φαίνεται ότι επάγει την δραστηριότητα 17<sup>α</sup>-υδροξυλάσης του P450c17 μέσω της οδού της phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (*Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012*).

Εκτός από την αυξημένη παραγωγή τεστοστερόνης, οι υψηλές συγκεντρώσεις της ινσουλίνης αυξάνουν το κλάσμα της ελεύθερης τεστοστερόνης στην κυκλοφορία μέσω μείωσης της ηπατικής παραγωγής της δεσμευτικής σφαιρίνης των στεροειδών του φύλου (sex hormone binding globulin, SHBG) (*Nestler 1993*). Ως αποτέλεσμα, επιδεινώνονται οι κλινικές εκδηλώσεις του υπερανδρογονισμού.

Επιπλέον, στην κοκκιώδη στιβάδα των γυναικών με ΣΠΩ η υπερινσουλιναίμια σε συνέργεια με την LH πιθανόν συμβάλλει στην πρόωμη υπερέκφραση των υποδοχέων LH στα μικρού μεγέθους ωοθυλάκια (**Σχήμα 4**) (*Willis et al. 1996; Willis et al., 1998*;

Jakimiuk et al.,2001). Ακολούθως, τα κοκκιώδη κύτταρα υφίστανται πρόωρα τελική διαφοροποίηση (πρώιμη ωχρινοποίηση) και αναστολή της περαιτέρω ανάπτυξής τους, με τελικό αποτέλεσμα την ανωοθυλακιορρηξία (Jonard and Dewailly 2004).

**Σχήμα 4** Ωοθηκικές δράσεις της ινσουλίνης στο ΣΠΩ



**Σχ.4** Η ινσουλίνη δρα τόσο στα κύτταρα της θήκης όσο και στα κοκκιώδη κύτταρα είτε άμεσα μέσω των υποδοχέων της είτε έμμεσα ενισχύοντας την επίδραση της LH. Στην έσω θήκη η ινσουλίνη προάγει την έκφραση των στεροειδογενετικών ενζύμων και την βιοσύνθεση των ανδρογόνων στις ωοθήκες. Στην κοκκιώδη στιβάδα η υπερινσουλιναίμια σε συνέργεια με την LH συμβάλλει στην πρώιμη υπερέκφραση των υποδοχέων LH ,με αποτέλεσμα τα κοκκιώδη κύτταρα να υφίστανται πρόωρη τελική διαφοροποίηση (πρώιμη ωχρινοποίηση)και αναστολή της περαιτέρω ανάπτυξής τους.

### 1.3.4 Χρόνια φλεγμονή και αυξημένο γλυκοξειδωτικό φορτίο

Η χρόνια υποκλινική φλεγμονή αποτελεί παθοφυσιολογική συνιστώσα του ΣΠΩ, που συμβάλλει στο δυσμενή μεταβολικό φαινότυπο και πιθανόν στις ενδοκρινικές και αναπαραγωγικές διαταραχές του συνδρόμου. Οι δείκτες της χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής που ανευρίσκονται αυξημένοι στο ΣΠΩ περιλαμβάνουν τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), ο Tumor Necrosis Factor-α (TNFα), η πρωτεΐνη οξείας φάσης, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) και η monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (Gonzalez et al.,1999; Gonzalez et al.,2009; Victor et al.,2011). Επιπλέον, στις γυναίκες με ΣΠΩ έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού φορτίου ανεξαρτήτως παχυσαρκίας (Murri et al.,2013; Gonzalez et al.,2006). Στους δείκτες οξειδωτικού φορτίου που έχουν βρεθεί αυξημένοι στο ΣΠΩ περιλαμβάνονται η ομοκυστεΐνη, η μαλονδεαλδεύδη και τα τελικά προϊόντα

προχωρημένης γλυκοζυλίωσης [Advanced Glycated End products(AGEs)]. Επίσης, έχει βρεθεί διαταραχή των αντιοξειδωτικών συστημάτων, δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase), γλουταθειόνη (GSH) και παραοξονάση-1 (Murri et al.,2013).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση του ΣΠΩ με τα αυξημένα επίπεδα AGEs ορού.Αυτά τα μόρια, γνωστά για το ρόλο τους στις διεργασίες γλυκοζυλίωσης και οξείδωσης, ανευρίσκονται αυξημένα στις μη διαβητικές γυναίκες με ΣΠΩ, ανεξαρτήτως ινσουλινοαντίστασης και παχυσαρκίας (Diamanti-Kandarakis et al.,2005a; Diamanti-Kandarakis et al.,2008). Τα AGEs αφενός επάγουν τις οξειδωτικές διεργασίες και αφετέρου παράγονται ως αποτέλεσμα των οξειδωτικών διεργασιών, οι οποίες προάγουν το τελικό στάδιο της γλυκοζυλίωσης που οδηγεί στα AGEs (Barlovic et al.,2011). Τα AGEs δρουν μέσω του υποδοχέα των AGEs (Receptor for AGEs,RAGE), ο οποίος επίσης εμφανίζει αυξημένη έκφραση στα μονοκύτταρα των γυναικών με ΣΠΩ (Diamanti-Kandarakis et al.,2005a). Ο μηχανισμός παραγωγής και οι δράσεις των AGEs γενικά αλλά και ειδικά στο ΣΠΩ θα συζητηθούν στην αντίστοιχη ενότητα.

Η παθογένεια και ο παθοφυσιολογικός ρόλος της χρόνιας φλεγμονής και του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου στο ΣΠΩ παραμένουν υπό διερεύνηση. Μια σειρά μελετών σε καλλιέργειες λευκοκυττάρων από γυναίκες με ΣΠΩ μελέτησε την παραγωγή κυτοκινών και οξειδωτικού φορτίου σ'αυτές τις ασθενείς (Gonzalez et al.,2006a; Gonzalez et al.,2006b; Gonzalez et al.,2009; Gonzalez et al.,2012; Victor et al., 2009; Victor et al.,2011). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ενεργοποίηση του nuclear factor kappa B (NFκB), της γονιδιακής έκφρασης της nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-οξειδάσης και της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) στα λευκοκύτταρα των γυναικών με ΣΠΩ (Gonzalez et al.,2006; Victor et al.,2009). Αυτά τα ευρήματα διαπιστώθηκαν σε βασικές συνθήκες και σε συνθήκες μεταγευματικής γλυκαιμίας ανεξαρτήτως παχυσαρκίας. Η αυξημένη παραγωγή ROS σε βασικές συνθήκες έχει αποδοθεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η οποία διαπιστώθηκε στα λευκοκύτταρα των γυναικών με ΣΠΩ και ινσουλινοαντίσταση (Victor et al.,2009; Victor et al.,2011).

Επιπλέον, αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS,η ενεργοποίηση του NFκB και η γονιδιακή έκφραση της NADPH οξειδάσης στα λευκοκύτταρα των γυναικών με ΣΠΩ συσχετίζονται θετικά με τον βαθμό της ινσουλινοαντίστασης και τα επίπεδα τεστοστερόνης ορού (Gonzalez et al.,2006a; Gonzalez et al.,2006b; González et al., 2012). Αυτές οι συσχετίσεις υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση της χρόνιας φλεγμονής/οξειδωτικού φορτίου, της ινσουλινοαντίστασης και της υπερανδρογοναιμίας στο ΣΠΩ, αλλά δεν μπορούν να διακρίνουν το αίτιο από το αιτιατό. Είναι πιθανό ότι η ινσουλινοαντίσταση και η αντιρροπιστική υπερινσουλιναίμια αυξάνουν τα επίπεδα οξειδωτικού stress (Muniyappa et al.,2007). Αντιστρόφως, το οξειδωτικό stress και/ή οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες πιθανόν διαταράσσουν την ενδοκυττάρια οδό σήματος της ινσουλίνης (Evans et al.,2005).

Όσον αφορά στη συσχέτιση των επιπέδων ROS με τα επίπεδα τεστοστερόνης ορού, είναι πιθανό ότι το οξειδωτικό φορτίο συντελεί στην υπερανδρογοναιμία μέσω της επαγωγής της ινσουλινοαντίστασης ή μέσω άμεσης επίδρασης στην ωθητική στεροειδογένεση (Agarwal et al.,2012). Αντιστρόφως, η υπερανδρογοναιμία πιθανόν συμβάλλει στο αυξημένο οξειδωτικό φορτίο στις γυναίκες με ΣΠΩ, όπως θα συζητηθεί στην υποενότητα 1.5.3.3 (Σχήμα 9β).

Η σπλαγγική παχυσαρκία μπορεί επίσης να συμβάλλει στην χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress στο ΣΠΩ αφενός μέσω της αυξημένης απελευθέρωσης ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία (FFAs), τα οποία αποτελούν υπόστρωμα για οξείδωση. Αφετέρου, το σπλαγγικό λίπος εμφανίζει διαταραγμένη έκκριση κυτοκινών και ουσιών, γνωστών ως λιποκίνες. Οι λιποκίνες εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα του στρώματος του λιπώδους ιστού και εμπλέκονται στον καταρράκτη της φλεγμονής και τη ρύθμιση μεταβολικών διεργασιών. Παρόλο που οι υπάρχουσες μελέτες δεν έχουν δώσει σαφή συνολική εικόνα για τις μεταβολές της καθεμιάς από τις λιποκίνες στο ΣΠΩ (Chen *et al.*, 2013), μια πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν χαμηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης ορού συγκριτικά με τις υγιείς μάρτυρες (Toullis *et al.*, 2009). Η αδιπονεκτίνη είναι μια λιποκίνη με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δράση ινσουλινοευαισθητοποιητή και άρα η υποαδιπονεκτιναιμία ενοχοποιείται στην παθογένεια της χρόνιας φλεγμονής και της ινσουλινοαντίστασης. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για την αδιπονεκτίνη στο ΣΠΩ ενισχύεται από τις ενδείξεις για τις πιθανές δράσεις της στο αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών (Chen *et al.*, 2013). In vitro πειράματα και κλινικές μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ και γυναίκες με υπογονιμότητα υποστηρίζουν τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της αδιπονεκτίνης στη στεροειδογένεση, την ωοθυλακιόρρηξία και τη λειτουργία του ενδομητρίου (Chen *et al.*, 2013).

Συμπερασματικά, η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress είναι σημαντικοί παθοφυσιολογικοί άξονες του ΣΠΩ που εμπλέκονται στον φαύλο κύκλο των αναπαραγωγικών και μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο.

### **1.3.5 Διαταραχή υποθαλαμοϋποφυσιακής λειτουργίας**

Η εκλυτική των γοναδοτροφινών ορμόνη (Gonadotropin Releasing hormone, GnRH) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο κατά ώσεις. Οι εκκριτικές ώσεις της GnRH στην πρώιμη παραγωγική φάση του κύκλου ωοθυλακιόρρηκτικών γυναικών είναι 10-12 το εικοσιτετράωρο. Στις γυναίκες με ΣΠΩ τα εκκριτικά επεισόδια της GnRH είναι συχνότερα, φθάνοντας περίπου τα 24 ανά εικοσιτετράωρο.

Η αύξηση της συχνότητας των εκκριτικών αιχμών της GnRH πιθανόν οφείλεται σε αρρενοποίηση του υποθαλάμου, που γίνεται κατά την ενδομήτρια ζωή. Η ενδομήτρια έκθεση του υποθαλάμου του εμβρύου σε υψηλά επίπεδα οιστρογόνων ή αρωματοποιούμενων ανδρογόνων για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως συμβαίνει όταν η μητέρα πάσχει από συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων, οδηγεί σε αρρενοποιητική ρύθμιση του υποθαλάμου. Αυτή η παρατήρηση πιθανόν επεκτείνεται και στα έμβρυα γυναικών με ΣΠΩ.

Η επικρατέστερη θεωρία για τη νευροενδοκρινική διαταραχή στο ΣΠΩ υποστηρίζει ότι ο γοναδοστάτης (το κέντρο του υποθαλάμου που ρυθμίζει τις εκκριτικές ώσεις της GnRH) των γυναικών με ΣΠΩ εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στην ανασταλτική δράση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Αυτή η σχετική αντίσταση του γοναδοστάτη πιθανόν οφείλεται στην υπερανδρογοναιμία που χαρακτηρίζει το σύνδρομο (Blank *et al.*, 2006). Στις ωοθυλακιόρρηκτικές γυναίκες, η συνδυασμένη δράση οιστρογόνων και προγεστερόνης μετά την ωοθυλακιόρρηξία οδηγεί σε αραίωση των εκκριτικών επεισοδίων της GnRH. Αντιθέτως, στο ΣΠΩ αφενός τα επίπεδα της προγεστερόνης είναι πολύ χαμηλά λόγω ανωοθυλακιόρρηξίας και αφετέρου η ουδός του γοναδοστάτη στην ανασταλτική δράση της προγεστερόνης είναι αυξημένη (Blank *et al.*, 2006). Ως



επακόλουθο, τα συχνά εκκριτικά επεισόδια της GnRH διεγείρουν την έκφραση του γονιδίου της β-υπομονάδας της LH, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της LH και την υπερπαραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα της έσω θήκης των ωοθηκών (*Blank et al.*, 2006). Παράλληλα, η σχετική αναστολή της έκκρισης της FSH οδηγεί σε αναστολή της ωοθυλακιογένεσης και της ωρίμανσης των κοκκιωδών κυττάρων (*Blank et al.*, 2006). Ωστόσο, η νευροενδοκρινική διαταραχή πιθανόν δεν είναι πρωτογενής παθογενετικός μηχανισμός στο ΣΠΩ, αλλά δευτερογενές αποτέλεσμα των διαταραχών της ωοθηκικής λειτουργίας (*Blank et al.*, 2006).

## **1.4 Κλινικοεργαστηριακή διάγνωση ΣΠΩ**

### **1.4.1 Βιοχημική υπερανδρογοναιμία**

Ως βιοχημική υπερανδρογοναιμία ορίζεται η ανεύρεση υψηλών επιπέδων ενός τουλάχιστον ανδρογόνου στον ορό του αίματος. Η βιοχημική υπερανδρογοναιμία στο ΣΠΩ είναι ωοθηκικής και επινεφριδικής προέλευσης, αλλά οι ωοθήκες είναι η κύρια πηγή ανδρογόνων. Η επινεφριδική υπερανδρογοναιμία εμφανίζεται σε 20% των λευκών και 30% των νέγων ασθενών με ΣΠΩ (*Azziz et al.*, 2009).

Τα αυξημένα επίπεδα ολικής και/ή ελεύθερης τεστοστερόνης είναι το κύριο εύρημα της βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Azziz et al.*, 2009). 70% των ασθενών με ΣΠΩ βάσει κριτηρίων NIH εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ελεύθερης τεστοστερόνης. Ωστόσο, η μέτρηση της ολικής και της ελεύθερης τεστοστερόνης ενέχει προβλήματα και περιορισμούς. Συγκεκριμένα, η μέτρηση της ελεύθερης τεστοστερόνης με την άμεση ραδιοανοσολογική μέθοδο (direct radioimmunoassay, RIA) είναι ανακριβής. Αντιθέτως, η μέθοδος της ισόρροπης διάλυσης (equilibrium dialysis) παρέχει ακριβέστερες μετρήσεις, που συσχετίζονται με τις μετρήσεις της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry), αλλά είναι τεχνικά δύσκολη και δαπανηρή (*Azziz et al.*, 2009).

Αντιστοίχως, οι μέθοδοι για τη μέτρηση της ολικής τεστοστερόνης παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις στην ίδια μέτρηση ή σε διαφορετικές μετρήσεις, ιδιαίτερος στο εύρος των χαμηλών τιμών που ανευρίσκονται στις περισσότερες γυναίκες καθώς επίσης στις γυναίκες με ελαττωμένα επίπεδα SHBG, όπως οι ασθενείς με ΣΠΩ (*Azziz et al.*, 2009).

Οι υψηλής ποιότητας ραδιοανοσολογικές μέθοδοι διπλού αντισώματος για την ολική τεστοστερόνη μπορεί να είναι χρήσιμες στην κλινική πράξη, εφόσον η διακύμανση μεταξύ των μεθόδων είναι κάτω του 10%. Για τον ακριβέστερο προσδιορισμό της ολικής τεστοστερόνης χρησιμοποιείται εκχύλιση και χρωματογραφία, ή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας αερίου ή υγρού (*Rosner et al.*, 2007).

Ωστόσο, η συγκέντρωση της τεστοστερόνης στον ορό δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα τη βιολογική δραστηριότητα στους ιστούς-στόχους. Με την δράση της 5α-αναγωγάσης η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε διϋδροτεστοστερόνη, η οποία είναι πιο «δραστική» στα κύτταρα στόχους από την πρώτη. Συνεπώς, η δραστηριότητα της τεστοστερόνης στους ιστούς εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το ποσοστό μετατροπής της σε διϋδροτεστοστερόνη (*Azziz et al.*, 2009).

Η ταυτόχρονη μέτρηση των υπόλοιπων ανδρογόνων μπορεί να συμβάλλει στη διάγνωση της βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας, αλλά σαφώς σε μικρότερο ποσοστό. 25% των ασθενών εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα θεικής δεϋδροεπιανδροστερόνης

(DHEAS) και μάλιστα σε 10% των ασθενών αυτό αποτελεί το μόνο εύρημα βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας. Ωστόσο, η μέτρηση της DHEA δεν έχει διαγνωστική αξία λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής και της ασθενούς ανδρογονικής ισχύος της (Azziz *et al.*, 2009). Η διαγνωστική αξία της μέτρησης της Δ4Α παραμένει αβέβαιη, αλλά φαίνεται να αυξάνει κατά 10% τον αριθμό των γυναικών που διαγιγνώσκονται με βιοχημική υπερανδρογοναιμία.

Συμπερασματικά, οι μετρήσεις των ανδρογόνων στον ορό αποτελούν συμπληρωματικό εργαλείο για τη διάγνωση του ΣΠΩ. Ωστόσο, 20- 40% των γυναικών με ΣΠΩ δεν έχουν αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων, ενώ οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μέτρησης των ανδρογόνων, ιδιαίτερα της ολικής και της ελεύθερης τεστοστερόνης, παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση και συχνά στερούνται ακρίβειας.

#### 1.4.2 Κλινικός υπερανδρογονισμός

Ως υπερανδρογονισμός ή κλινική υπερανδρογοναιμία χαρακτηρίζεται η εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων υπερανδρογοναιμίας, όπως η υπερτρίχωση, η ακμή και η ανδρογενετικού τύπου αλωπεκία.

Η πιο τυπική κλινική εκδήλωση του υπερανδρογονισμού είναι η υπερτρίχωση. Το 50% των περιπτώσεων υπερτρίχωσης οφείλεται σε βιοχημική υπερανδρογοναιμία, ενώ στο υπόλοιπο 50% είναι ιδιοπαθής.

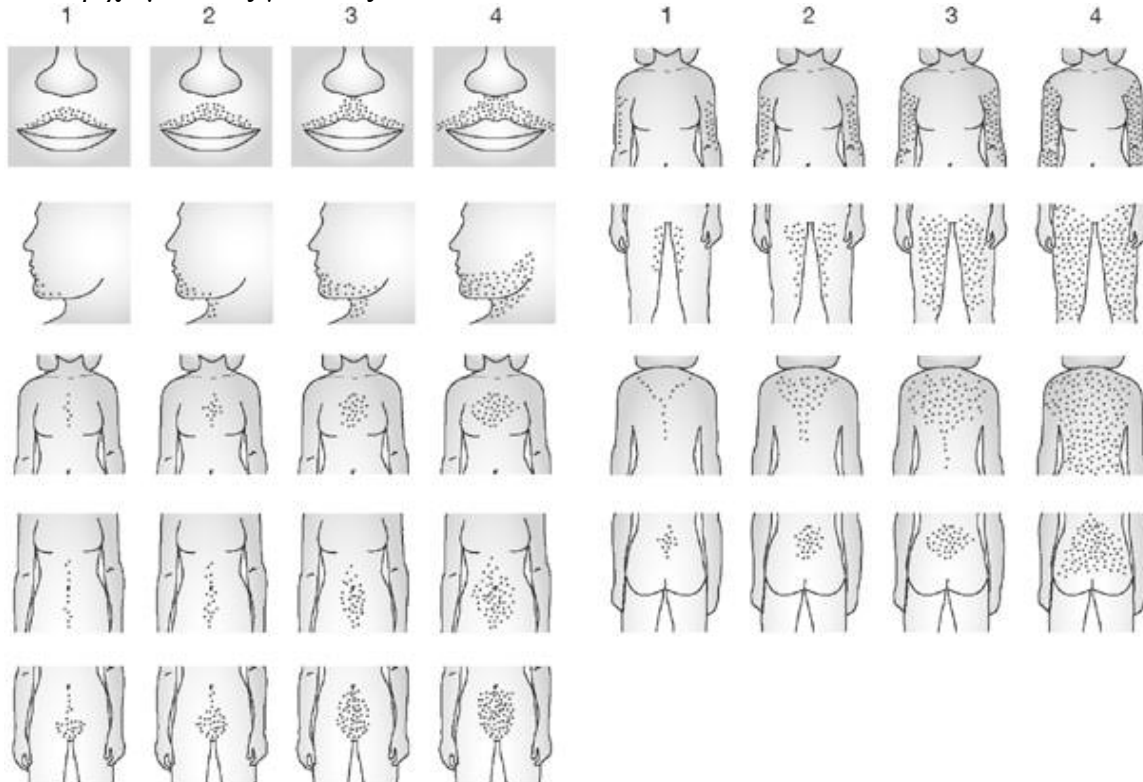
Ως υπερτρίχωση ορίζεται η αυξημένη ανάπτυξη τρίχωσης με ανδρικού τύπου κατανομή στις γυναίκες. Εντοπίζεται στις εξής περιοχές: γένειο, άνω χείλος, βραχίονες, πρόσθια επιφάνεια θώρακα, κοιλιακή χώρα υπερομφαλικά και υπομφαλικά μέχρι το εφήβαιο, ράχη, οσφυϊκή χώρα και έσω επιφάνεια μηρών.

Στην ελληνική ορολογία η ακριβής μετάφραση του αγγλοσαξωνικού όρου «*Hirsutism*» είναι «δασυτριχισμός», ωστόσο έχει επικρατήσει ο όρος «υπερτρίχωση» ως ισοδύναμος του όρου «δασυτριχισμός». Στην αγγλοσαξωνική ο όρος “*hirsutism*” («δασυτριχισμός») διαχωρίζεται σαφώς από τον όρο «*hypertrichosis*» («υπερτρίχωση»), που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ανδρογονοανεξάρτητη ανάπτυξη τρίχωσης που έχει χαρακτήρες χνουδιού-*lanugo*, προεξάρχει σε μη ορμονοεξαρτώμενες περιοχές και είναι συχνότερα οικογενής ή προκαλείται από μεταβολικές διαταραχές (π.χ. διαταραχές θυρεοειδικής λειτουργίας, νευρογενής ανορεξία) ή είναι φαρμακευτικής αιτιολογίας (πχ φαινυτοΐνη, μινοξιδίλη, ή κυκλοσπορίνη) (Rosenfield 2005).

Ο βαθμός υπερτρίχωσης (δασυτριχισμού) βαθμολογείται με την κλίμακα Ferriman-Gallwey (F-G) (σχήμα 5), όπου για κάθε μία από τις 9 ορμονοευαίσθητες περιοχές έχει ορισθεί μία βαθμολογική κλίμακα από 0 (χωρίς τρίχες) έως 4 (έκδηλα αρρενωπή εμφάνιση) και οι βαθμολογίες αθροίζονται. Ένα συνολικό άθροισμα μεγαλύτερο ή ίσο του 8 στις ενήλικες Καυκάσιες γυναίκες υποδηλώνει υπερτρίχωση, η οποία είναι τόσο μεγαλύτερου βαθμού όσο μεγαλύτερο είναι το άθροισμα. Η κλίμακα F-G εμφανίζει περιορισμούς, από τους οποίους οι κυριότεροι είναι η υποκειμενικότητα της βαθμολόγησης και η μη αξιολόγηση της τρίχωσης σε περιοχές, όπως οι παρειές και οι γλουτοί.

Στο γενικό πληθυσμό 5% των γυναικών εμφανίζουν υπερτρίχωση (Rosenfield 2005), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό είναι 60% στις γυναίκες με ΣΠΩ (Azziz *et al.*, 2006).

**Σχήμα 5** Η κλίμακα Ferriman- Gallwey (F-G) για την αξιολόγηση του βαθμού δαυστριχισμού στις γυναίκες



Από Hatch et al., 1981.

### 1.4.3 Διαταραχές εμμήνου ρύσεως

Το ΣΠΩ αποτελεί την πρώτη αιτία νορμογοναδοτροφικής ανωοθυλακιορρηξίας, δεδομένου ότι διαγιγνώσκεται σε ποσοστό 55%-91% των περιπτώσεων (Broekmans et al., 2006). Η χρόνια ανωοθυλακιορρηξία εκδηλώνεται συνήθως με διαταραχές εμμήνου ρύσεως (EP), συνήθως με αραιομηνόρροια. Ως αραιομηνόρροια ορίζεται η παρουσία εμμηνορρυσιακών κύκλων διάρκειας άνω των τριανταπέντε ημερών ή η παρουσία λιγότερων από δέκα εμμηνορρυσιακών κύκλων ετησίως. Η αραιομηνόρροια παρατηρείται σε ποσοστό 70-80% των γυναικών με ΣΠΩ. Ωστόσο, 15-40% των ανωοθυλακιορρηκτικών γυναικών με ΣΠΩ αναφέρουν φυσιολογικό κύκλο ( υποκλινική ανωοθυλακιορρηξία) (Azziz et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι 20-50% των γυναικών με κλινικό υπερανδρογονισμό και αναφερόμενη φυσιολογική EP μπορεί να έχουν ανωοθυλακιορρηξία. Ως εκ τούτου, απαιτούνται δύο διαδοχικές μετρήσεις της προγεστερόνης (P) ορού στην ωχρινική φάση (20<sup>η</sup>-24<sup>η</sup> ημέρα κύκλου). Επίπεδα P ορού κάτω του 9 nmol/l (3 ng/ml) υποδηλώνουν ανωοθυλακιορρηξία (Azziz et al., 2009).

### 1.4.4 Πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών

Οι πολυκυστικές ωοθήκες ορίζονται υπερηχογραφικά βάσει των κριτηρίων Rotterdam από την παρουσία τουλάχιστον 12 ωοθυλακίων διαμέτρου 2-9 χιλιοστών και/ή την αύξηση του ωοθηκικού στρώματος με όγκο άνω των 10 ml σε τουλάχιστον μία ωοθήκη (The Rotterdam ESHRE ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004). Επί παρουσίας τουλάχιστον ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου (διαμέτρου άνω

του εκατοστού) ή ωχρού σωματίου σε μια ωθήκη επιβάλλεται επανάληψη του υπερηχογραφήματος στον επόμενο εμμηνορρυσιακό κύκλο (Azziz *et al.*, 2009).

Οι πολυκυστικές ωθήκες φέρουν περίσσεια αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, ο αριθμός των οποίων είναι πολλαπλάσιος του φυσιολογικού, με εξαίρεση τα αρχέγονα ωοθυλάκια που έχουν φυσιολογικό αριθμό (Hughesdon 1982). Σε βιοψίες ωοθηκών οι Webber και συνεργάτες κατέγραψαν εξαπλάσιο αριθμό πρωτογενών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων στις πολυκυστικές ωθήκες ανωοθυλακιορρηκτικών γυναικών με ΣΠΩ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ωθήκες υγιών γυναικών χωρίς ΣΠΩ (Webber *et al.*, 2003). Αυτή η περίσσεια ωοθυλακίων πιθανόν αποδίδεται στην επιτάχυνση των αρχικών σταδίων της ωοθυλακιογένεσης ή στη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των μικρών ωοθυλακίων των πολυκυστικών ωοθηκών (Webber *et al.* 2003; Webber *et al.*, 2007; Franks *et al.*, 2008).

Η διάγνωση του συνδρόμου με τα κριτήρια του NIH δεν προϋποθέτει την πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών (Zawadski & Dunaif 1992), παρόλο που η τελευταία περιλαμβάνεται στους δύο μεταγενέστερους ορισμούς (Πίνακας 1). 75% των γυναικών με κλινική διάγνωση ΣΠΩ εμφανίζουν πολυκυστικές ωθήκες στο υπερηχογράφημα (Azziz *et al.*, 2006a). Ωστόσο, η πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών αποτελεί σύνηθες εύρημα και στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας στο γενικό πληθυσμό με ποσοστό 20-30% (Azziz *et al.*, 2009). Συνεπώς, η υπερηχογραφική ανεύρεση πολυκυστικών ωοθηκών δεν αποτελεί ούτε παθολογμονικό εύρημα ούτε απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση του συνδρόμου.

#### **1.4.5 Αποκλεισμός άλλων νοσημάτων που προκαλούν παρόμοια κλινική εικόνα**

Οι τρεις διαγνωστικοί ορισμοί του ΣΠΩ συγκλίνουν στον αποκλεισμό άλλων νοσημάτων ή καταστάσεων που προκαλούν παρόμοια κλινική εικόνα (Πίνακας 2) ως απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση του ΣΠΩ. Αυτά τα νοσήματα/καταστάσεις αναφέρονται στον πίνακα 2 και ευθύνονται για το 10-30% των περιπτώσεων υπερανδρογονισμού (Azziz *et al.*, 2009).

#### **Πίνακας 2 Διαφορική διάγνωση ΣΠΩ**

<b>Τα κυριότερα νοσήματα ή καταστάσεις που εμφανίζουν παρόμοιες κλινικές εκδηλώσεις με το ΣΠΩ</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Μη κλασική συγγενής ανεπάρκεια 21-υδροξυλάσης (όψιμης έναρξης)</li><li>- Σύνδρομο Cushing</li><li>- Ανδρογονοπαραγωγή νεοπλάσματα</li><li>- Λήψη ανδρογονικών ή αναβολικών ουσιών</li><li>- Σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη</li><li>- Θυρεοειδική νόσος</li><li>- Υπερπρολακτιναιμία</li></ul>

Η διαφορική διάγνωση βασίζεται στο ιστορικό και την κλινική εξέταση και συμπληρώνεται από τον εργαστηριακό έλεγχο με ορμονικές εξετάσεις και δυναμικές δοκιμασίες.

Η διαφορική διάγνωση του ΣΠΩ από την μη κλασική συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων (nonclassic 21-hydroxylase deficient adrenal hyperplasia, NCAH) περιλαμβάνει: α) την πρωινή μέτρηση των επιπέδων 17OHP ορού στην ωοθυλακική

φάση του ΕΡ κύκλου (3<sup>η</sup>-5<sup>η</sup> ημέρα) και β) την δοκιμασία Synachten ,κατά την οποία γίνεται διέγερση με ενδοφλέβια χορήγηση 250 µg συνθετικής ACTH (Synachten test). Επισημαίνεται ότι οι υπερινσουλιναιμικές ασθενείς με ΣΠΩ πιθανόν παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα της 17OHP ορού, τόσο σε βασική κατάσταση, όσο και μετά διέγερση με ACTH, σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Azziz *et al.*,1998; Glinborg *et al.*; 2005). Ωστόσο, η σημαντική αύξηση των επιπέδων της 17OHP ορού καθιστά πιθανή τη διάγνωση NCAH. Επίπεδα 17OHP ορού άνω των 6nmol/l (προ διέγερσης) αποτελούν ένδειξη για δοκιμασία Synachten. Η ανεύρεση τιμής 17OHP κάτω των 30 nmol/l, 60 λεπτά μετά από διέγερση ,απομακρύνει από τη διάγνωση NCAH ,αλλά η διάγνωση τίθεται με ασφάλεια με μοριακό έλεγχο για μεταλλάξεις του γονιδίου της 21-υδροξυλάσης (Speiser *et al.*, 2010).

Σημαντικά αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης ή DHEAS ορού σε συνδυασμό με ταχέως επιδεινούμενη υπερτρίχωση και αρρενοποιητικά φαινόμενα (διόγκωση κλειτορίδας και αρρενοποίηση φωνής) δηλώνουν ανδρογονοεκκριτικό νεόπλασμα επινεφριδιακής ή ωοθηκικής προέλευσης.

Τέλος, συνιστάται μέτρηση προλακτίνης και θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) ορού, προς αποκλεισμό υπερπρολακτιναιμίας και θυρεοειδικής νόσου, δύο καταστάσεων που προκαλούν αραιομηνόρροια χωρίς υπερανδρογοναιμία. Επισημαίνεται ότι το ΣΠΩ συνδυάζεται συχνά με διαταραχές της έκκρισης προλακτίνης. Στις σχετικές μελέτες έως και 17% των γυναικών με ΣΠΩ εμφανίζουν ήπια, συνήθως παροδική υπερπρολακτιναιμία, με αύξηση των επιπέδων προλακτίνης ορού μέχρι 50% πάνω από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια (Azziz *et al.*,2009).

## 1.5 Κλινικές επιπτώσεις ΣΠΩ

### 1.5.1 Αναπαραγωγικές διαταραχές

Το ΣΠΩ μπορεί να συνδυάζεται με υπογονιμότητα,η οποία αποδίδεται στις επιδράσεις των ενδοκρινικών και μεταβολικών διαταραχών στην ωοθηκική λειτουργία, την ποιότητα του ωαρίου και την διαδικασία εμφύτευσης στο ενδομήτριο (Denison *et al.*, 2010). Η επίδραση του υπερανδρογονισμού και της υπερινσουλιναιμίας στην ωοθυλακιογένεση και την ωχρινοποίηση των κοκκιωδών κυττάρων περιγράφηκαν στις ενότητες 1.3.2 και 1.3.3, αντίστοιχα. Επιπλέον, το ενδοωοθυλακικό περιβάλλον και η κυτταροπλασματική ή πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων πιθανόν διαταράσσονται από τις παρακρινικές δράσεις αυξητικών παραγόντων (Dumesic *et al.*, 2008). Ωστόσο, αυτές οι διαταραχές της αναπαραγωγικής λειτουργίας μπορεί να μην εμφανίζονται στο ΣΠΩ και επομένως, ένα ποσοστό γυναικών με το σύνδρομο εμφανίζουν φυσιολογική ποιότητα ωαρίων, γονιμοποίηση και εμφύτευση (Weghofer *et al.*, 2007).

Όσον αφορά στις επιπλοκές της κύησης, τα υπάρχοντα δεδομένα δεν δείχνουν σημαντικά αυξημένη συχνότητα αποβολών πρώτου τριμήνου στις γυναίκες με ΣΠΩ που συνέλαβαν αυτόματα ή μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro fertilization, IVF) (Fauser *et al.*,2012; Heijnen *et al.*,2006). Ωστόσο,οι γυναίκες με ΣΠΩ που συλλαμβάνουν με πρόκληση ωορρηξίας ή IVF φαίνεται να έχουν υψηλότερα ποσοστά πολύδυμων κύσεων (Fauser *et al.*, 2005).

Επιπλέον, το ΣΠΩ συνδέεται με μεγαλύτερη επίπτωση επιπλοκών κατά τη διάρκεια της κύησης και νεογνικών επιπλοκών και συγκεκριμένα, σακχαρώδη διαβήτη κύησης , προεκλαμψία ,πρόωρο τοκετό, μακροσωμία νεογνού ή χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά

(Boomsma et al.,2006; Roos et al.,2011). Η επίπτωση των επιπλοκών της κύησης φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε γυναίκες με τον κλασικό φαινότυπο ΣΠΩ (NIH κριτήρια) συγκριτικά με τις γυναίκες με ΣΠΩ χωρίς υπερανδρογονισμό (Fausser et al.,2012).

### **1.5.2 Μεταβολικές και καρδιαγγειακές διαταραχές**

Το ΣΠΩ συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης μεταβολικών διαταραχών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΣΠΩ παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση μεταβολικού συνδρόμου, δυσλιπιδαιμίας, διαταραχής ανοχής της γλυκόζης και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔτ2) (Σχήμα 6).

Πιο συγκεκριμένα, 70% των γυναικών παρουσιάζουν διαταραχή τουλάχιστον μιας από τις λιπιδαιμικές παραμέτρους (Legro et al., 2001). Κατά την αρχική διάγνωση του ΣΠΩ 90% των γυναικών παρουσιάζουν τουλάχιστον ένα από τα εξής χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου: περιφέρεια μέσης άνω των 88 εκατοστών, ή επίπεδα High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) κάτω των 50 mg/dl, ή επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG) υψηλότερα ή ίσα με 150 mg/dl, ή επίπεδα γλυκόζης νηστείας υψηλότερα ή ίσα με 110 mg/dl (Ehrmann et al.,2006). Η επίπτωση του μεταβολικού συνδρόμου κυμαίνεται μεταξύ 11,6-53% στις ασθενείς με ΣΠΩ, βάσει μελετών που χρησιμοποίησαν τους ορισμούς των National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP-ATP III) ή της World health organization (WHO) για το μεταβολικό σύνδρομο ( Dokras et al. 2005; Vural et al., 2005; Talbott et al., 2004; Glueck et al., 2003; Ehrmann et al., 2006). Μια μετα-ανάλυση των σχετικών μελετών έδειξε ότι η επίπτωση του μεταβολικού συνδρόμου στις γυναίκες με ΣΠΩ είναι διπλάσια από την αντίστοιχη επίπτωση στις γυναίκες της ίδιας ηλικίας από το γενικό πληθυσμό και σε όλο το εύρος των τιμών του ΔΜΣ (Moran et al.,2010 ).

Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΠΩ έχουν αυξημένο κίνδυνο για προδιαβητικές διαταραχές και ΣΔτ2. Προοπτικές μελέτες σε μεγάλο αριθμό ασθενών έδειξαν ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν διαταραχή της ανοχής της γλυκόζης (ΔΑΓ, IGT) (31-35%) και ΣΔτ2 (7,5-10%), αντίστοιχα (Ehrmann et al., 1999; Legro et al.,1999; Ehrmann et al.,2006; Salley et al.,2007). Συγκριτικά με τις γυναίκες της ίδιας ηλικίας από το γενικό πληθυσμό ο κίνδυνος για IGT και ΣΔτ2 είναι αντίστοιχα 2,5 φορές και 4,4 φορές μεγαλύτερος στις γυναίκες με ΣΠΩ (Moran et al., 2010).

Υπάρχει, επίσης, αυξημένος κίνδυνος επιδείνωσης της IGT και ως εκ τούτου αυτές οι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται περιοδικά για την εξέλιξη της IGT σε ΣΔτ2 (Norman et al., 2001; Legro et al., 2005;Ehrmann et al., 1999; Salley et al., 2007).

Οι μεταβολικές επιπτώσεις του ΣΠΩ φαίνεται να διαφοροποιούνται ανάλογα με τον φαινότυπο του ΣΠΩ. Ο κλασικός φαινότυπος του ΣΠΩ ,όπως ορίζεται από τα κριτήρια NIH,πιθανόν εμφανίζει μεγαλύτερη επίπτωση μεταβολικών διαταραχών συγκριτικά με το μη υπερανδρογονικό φαινότυπο. Ειδικότερα,οι υπερανδρογοναιμικές,ανωθυλακιορρηκτικές γυναίκες με ΣΠΩ έχουν μεγαλύτερο βαθμό ινσουλινοαντίστασης ,παχυσαρκίας και σπλαγγχικής παχυσαρκίας (Diamanti-Kandarakis & Panidis 2007a; Zhang et al., 2009; Rizzo et al., 2009; Amato et al., 2011; Yildiz et al., 2012). Επιπλέον, εμφανίζουν μεγαλύτερη επίπτωση διαταραχών των λιπιδίων και της ανοχής της γλυκόζης και υψηλότερο ποσοστό μεταβολικού συνδρόμου (Diamanti-Kandarakis & Panidis 2007a; Zhang et al., 2009; Rizzo et al., 2009; Amato et al., 2011; Yildiz et al., 2012).

Είναι γνωστό ότι το μεταβολικό σύνδρομο, η δυσλιπιδαιμία, η IGT και ο ΣΔτ2 αυξάνουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Πλήθος μελετών σε ασθενείς με ΣΠΩ έχουν δείξει την αύξηση των δεικτών καρδιαγγειακού κινδύνου ή υποκλινικής καρδιαγγειακής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων των δεικτών ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή και υποκλινικής αθηρωμάτωσης (Toullis et al., 2011).

Απεικονιστικές μελέτες στα τοιχώματα των μεγάλων αγγείων έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ΣΠΩ έχουν σημαντικά αυξημένο δείκτη αθηρωμάτωσης στις καρωτίδες, υπερπλασία του μέσου χιτώνα των καρωτίδων, και αυξημένη παρουσία ελασβεστώσεων στις στεφανιαίες αρτηρίες, σε σύγκριση με μάρτυρες χωρίς ΣΠΩ (Vural et al., 2005; Christian et al., 2003; Talbott et al., 2000). Επιπλέον, οι γυναίκες με ΣΠΩ εμφανίζουν υπερηχογραφικά ευρήματα ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (Diamanti-Kandarakis et al., 2005b; Orio et al., 2004a), υπερηχοκαρδιογραφικές αλλοιώσεις (Orio et al., 2004b; Tiras et al., 1999) και αυξημένα επίπεδα προαθηρογόνων μορίων στο αίμα, όπως τα μόρια προσκόλλησης, η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1) και η ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (ADMA) (Diamanti-Kandarakis et al., 2001; Orio et al., 2004a; Charitidou et al., 2007; Diamanti-Kandarakis et al., 2006; Cussons et al., 2006). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι υποκλινικοί δείκτες αθηρωμάτωσης, που υποδηλώνουν την παρουσία αυξημένου κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο στις γυναίκες με ΣΠΩ.

Ωστόσο, η αύξηση των δεικτών καρδιαγγειακού κινδύνου δεν αρκεί για να τεκμηριώσει κλινικές επιπτώσεις. Η αύξηση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας στο ΣΠΩ δεν έχει αποδειχθεί λόγω της απουσίας μεγάλων και κατάλληλα σχεδιασμένων, προοπτικών μελετών με την απαιτούμενη μακρόχρονη παρακολούθηση. Οι μελέτες που χρησιμοποίησαν ως κριτήρια έκβασης την θνησιμότητα από καρδιαγγειακή νόσο ή/και τη νοσηρότητα από έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) ή/και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) στις ασθενείς με ΣΠΩ, είναι λίγες και έχουν σημαντικούς περιορισμούς. Μια μετα-ανάλυση των σχετικών μελετών που έγιναν την περίοδο 2000-2008 έδειξε διπλασιασμό του κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου στις γυναίκες με ΣΠΩ, ανεξαρτήτως ΔΜΣ. Ωστόσο, αυτή η μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε πέντε μελέτες, εκ των οποίων οι τρεις ήταν αναδρομικές και μόνο οι δύο ήταν προοπτικές (de Groot et al., 2011). Επιπρόσθετοι περιορισμοί των σχετικών μελετών είναι το σχετικά μικρό χρονικό διάστημα της παρακολούθησης και η δυσκολία της διάγνωσης του ΣΠΩ στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Επίσης, επειδή η επίπτωση της καρδιαγγειακής νόσου είναι πολύ χαμηλή σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, η ενδεχόμενη καρδιαγγειακή επιβάρυνση λόγω του ΣΠΩ αναμένεται να γίνεται κλινικά εμφανής μετά την εμμηνόπαυση.

Τα σημαντικότερα δεδομένα υπέρ της αυξημένης καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας στο ΣΠΩ προέρχονται από δύο προοπτικές μελέτες που δημοσιεύθηκαν το 2002 και το 2008, αντίστοιχα. Η πρώτη μελέτη έγινε σε πληθυσμό 82,439 νοσηλευτριών και συσχέτισε το ιστορικό προηγούμενων διαταραχών του εμμηνορρυσιακού κύκλου (ΔΕΡ) με την επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στη 14ετή παρακολούθηση (Solomon et al., 2002). Συγκριτικά με τις γυναίκες που ανέφεραν ιστορικό φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου, οι γυναίκες με ιστορικό ΔΕΡ είχαν κατά 25% υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακής νόσου, μετά από διόρθωση ως προς την ηλικία, τον ΔΜΣ και άλλους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες (Solomon et al., 2002).

Η δεύτερη μελέτη από τους Shaw *et al.* αξιολόγησε τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και συμβαμάτων σε 390 μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες που συμμετείχαν στην *WISE study* (Shaw *et al.*, 2008). Από αυτές, οι 104 γυναίκες που είχαν κλινικά χαρακτηριστικά ΣΠΩ εμφάνιζαν συχνότερα αγγειογραφικές ενδείξεις καρδιαγγειακής νόσου, χαμηλότερη πενταετή επιβίωση ελεύθερη καρδιαγγειακών συμβαμάτων και διπλάσιο κίνδυνο θανατηφόρου OEM συγκριτικά με τις γυναίκες που δεν είχαν κλινικά χαρακτηριστικά ΣΠΩ. Η παρουσία ΣΠΩ ήταν παράγων κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων ,ανεξαρτήτως της συνυπάρχουσας αρτηριακής υπέρτασης, του ΣΔτ2 και της περιφέρειας μέσης (Shaw *et al.*, 2008).

Ωστόσο, μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης γυναικών με ΣΠΩ για εικοσιένα έτη δεν έδειξε σημαντική διαφορά στην επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων στις γυναίκες με ΣΠΩ συγκριτικά με γυναίκες της ίδιας ηλικίας από την ομάδα ελέγχου (Schmidt *et al.*, 2011). Αυτή η μελέτη έχει τη μεγαλύτερη διάρκεια παρακολούθησης από τις υπάρχουσες προοπτικές μελέτες, αλλά το μικρό μέγεθος του δείγματος πιθανόν μειώνει την αξιοπιστία των ευρημάτων (Schmidt *et al.*, 2011).

Συμπερασματικά,παρά την συχνή συνύπαρξη του ΣΠΩ με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, τα δεδομένα για την καρδιαγγειακή επιβάρυνση των ασθενών με ΣΠΩ παραμένουν ασαφή και αναμένονται προοπτικές μελέτες μακρόχρονης παρακολούθησης για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

### **1.5.3 Παθοφυσιολογία μεταβολικών και καρδιαγγειακών διαταραχών στο ΣΠΩ**

#### **1.5.3.1 Σπλαγγχνική παχυσαρκία-Χρόνια φλεγμονή**

Στο γενικό πληθυσμό η περιφέρεια μέσης (waist circumference), ένας κλινικός δείκτης σπλαγγχνικής παχυσαρκίας,αποτελεί κριτήριο του μεταβολικού συνδρόμου [σύμφωνα με τον ορισμούς κατά NCEP-ATPIII και κατά International Diabetes Federation (IDF)] (*Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001; Alberti et al., 2006*) και συσχετίζεται ευθέως με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (*The Diabetes Prevention Program Research Group 2006*) και στεφανιαίων επεισοδίων (Rexrode *et al.*,1998; Yusuf *et al.*,2004). Συνεπώς, η σπλαγγχνική συσσώρευση λίπους πιθανόν έχει πολλαπλή παθοφυσιολογική σημασία στις καρδιομεταβολικές διαταραχές που φαίνεται να συνοδεύουν το ΣΠΩ. Πιο συγκεκριμένα, η σπλαγγχνική παχυσαρκία πιθανόν συμβάλλει στη χρόνια φλεγμονή, το οξειδωτικό stress και την ινσουλινοαντίσταση (Lord *et al.*,2006) μέσω της απελευθέρωσης FFAs, προφλεγμονωδών κυτοκινών και λιποκινών (Lau *et al.*, 2005). Όπως προαναφέρθηκε στην υποενότητα 1.3.4, ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινής αδένας εκκρίνει φλεγμονώδεις κυτοκίνες και λιποκίνες που συμμετέχουν ενεργά στην παθοφυσιολογία των μεταβολικών διαταραχών και στη διαδικασία της αθηρογένεσης (Lau *et al.*, 2005).

Οι γυναίκες με ΣΠΩ, λεπτόσωμες και παχύσαρκες, εμφανίζουν αυξημένη μάζα σπλαγγχνικού λίπους συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες ίδιου σωματικού βάρους (Escobar-Morreale & San Millán 2007). Η σπλαγγχνική συσσώρευση λίπους φαίνεται να συμβάλλει στην αυξημένη επίπτωση μεταβολικού συνδρόμου, δυσλιπιδαιμίας, διαταραχών μεταβολισμού της γλυκόζης και πιθανόν καρδιαγγειακών διαταραχών (Σχήμα 6).

Ειδικότερα,ο σπλαγγχνικός λιπώδης ιστός φαίνεται να έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στις γυναίκες με ΣΠΩ που σχετίζονται με το μέγεθος των λιποκυττάρων,



τη ρύθμιση της λιπόλυσης και την εκκριτική- ενδοκρινική λειτουργία του. Στις γυναίκες με το σύνδρομο τα σπλαγχνικά λιποκύτταρα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (*Mannerås-Holm et al.,2011*) και αυξημένη,επαγόμενη από τις κατεχολαμίνες λιπόλυση, με αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση FFAs στην κυκλοφορία (*Faulds et al.,2003*). Αυτές οι διαφορές σε βιοψίες από γυναίκες με ΣΠΩ και από υγιείς μάρτυρες φαίνεται να είναι ανεξάρτητες του ΔΜΣ.

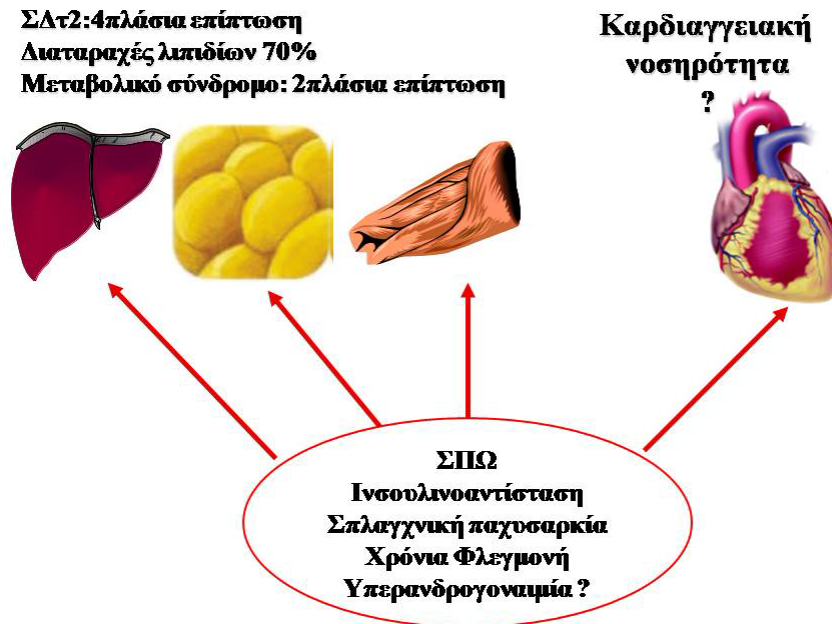
Επιπλέον, το ΣΠΩ έχει συσχετισθεί με διαταραγμένη έκκριση κυτοκινών και λιποκινών από το λιπώδη ιστό,παρόλο που δεν έχει διευκρινισθεί αν αυτή οφείλεται στις συνυπάρχουσες μεταβολικές καταστάσεις ή στο ίδιο το σύνδρομο (*Chen et al.,2013*). Ωστόσο, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν χαμηλότερα επίπεδα αδιπνεκτίνης ορού συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (*Toullis et al.,2009*). Αυτό το εύρημα μπορεί να έχει σημαντικές καρδιαγγειακές συνέπειες για τις γυναίκες με το σύνδρομο,δεδομένου ότι η αδιπνεκτίνη έχει αντιαθηρογόνες δράσεις (*Goldstein et al., 2009*).

Η σπλαγχνική παχυσαρκία έχει συσχετισθεί με δείκτες υποκλινικής αθηρωμάτωσης και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Cascella et al., 2008*). Ωστόσο, ο πιθανός ρόλος της σπλαγχνικής παχυσαρκίας στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα των ασθενών με το σύνδρομο δεν έχει αποδειχθεί.

### **1.5.3.2 Ινσουλινοαντίσταση**

Η ινσουλινοαντίσταση και η συνοδός υπερινσουλιναϊμία είναι κύριοι συντελεστές του καρδιαγγειακού κινδύνου αφενός μέσω μεταβολικών δράσεων και αφετέρου μέσω άμεσων δράσεων στην καρδιά και τα αγγεία (*Muniyappa et al.,2007*). Συνεπώς, η ινσουλινοαντίσταση θεωρείται σημαντικός συντελεστής των μεταβολικών και των πιθανών καρδιαγγειακών διαταραχών στις γυναίκες με ΣΠΩ (**Σχήμα 6**).

**Σχήμα 6.** Μεταβολικές και καρδιαγγειακές διαταραχές και πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί στο ΣΠΩ



Η ινσουλίνη ασκεί μεταβολικές και καρδιαγγειακές δράσεις σε πολλαπλούς-ιστούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, του λιπώδους ιστού, των μυών, του παγκρέατος, του εγκεφάλου, των αγγείων και της καρδιάς (**σχήμα 7**). Στο ήπαρ η ινσουλίνη αυξάνει την παραγωγή γλυκόζης, την απελευθέρωση FFAs και TG και την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών. Στο λιπώδη ιστό αυξάνει τη σύνθεση TG, ενώ μειώνει τη λιπόλυση. Στους σκελετικούς μυς αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκογόνου. Στο πάγκρεας αυξάνει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων, καθώς επίσης την ικανότητά τους να ανιχνεύουν τη γλυκόζη στην κυκλοφορία. Στον εγκέφαλο η ινσουλίνη δημιουργεί αίσθημα κορεσμού και ελέγχει τον τόνο του συμπαθητικού, ενώ στο νεφρό αυξάνει την επαναρρόφιση άλατος. Στο μυοκάρδιο αυξάνει την οξειδωση της γλυκόζης, ενώ ελαττώνει την οξειδωση FFAs. Στα αγγεία επάγει την ισόρροπη σύνθεση αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών, ενώ αναστέλλει το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (**σχήμα 7**).

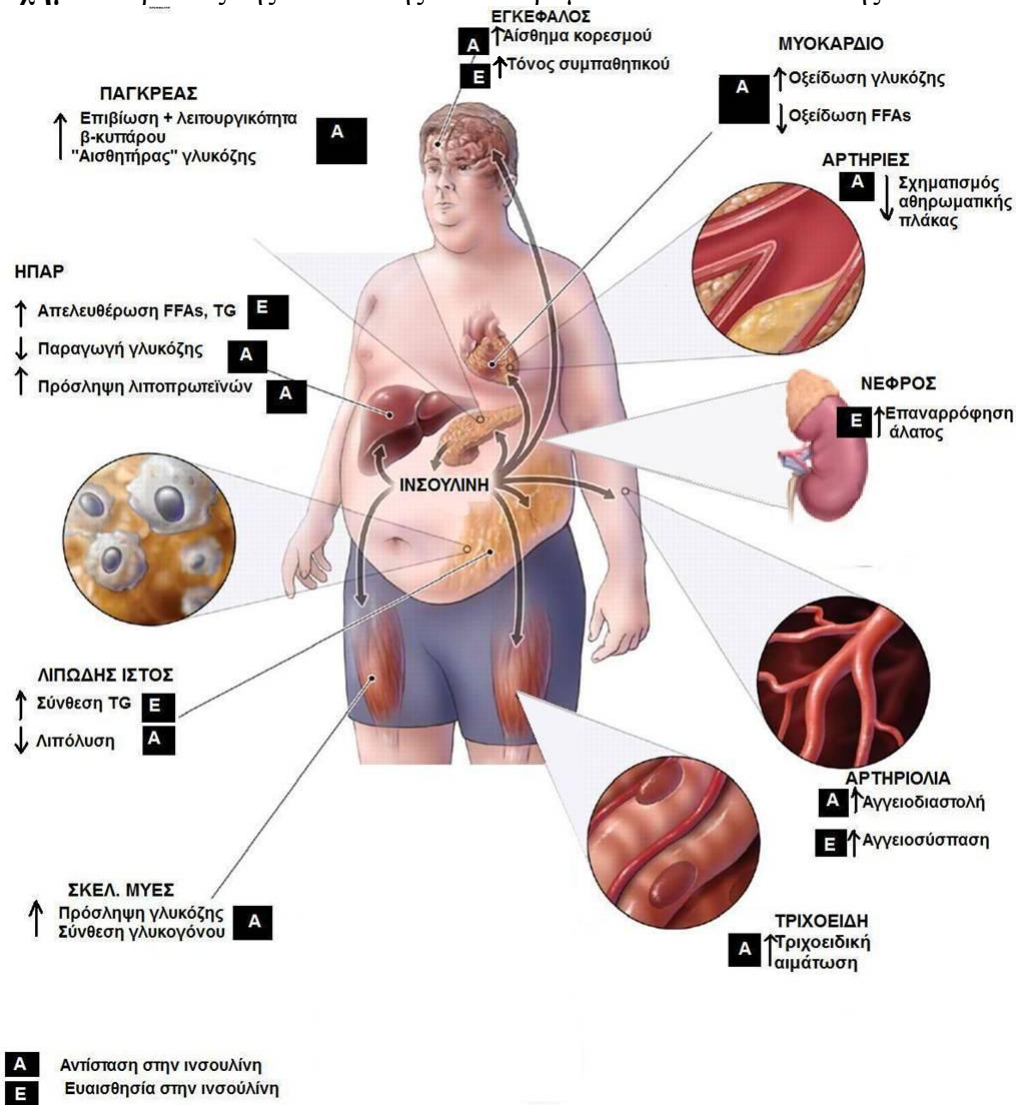
Σε συνθήκες ινσουλινοαντίστασης παρατηρείται αναστολή μερικών από τις δράσεις της ινσουλίνης, ενώ διατηρούνται και μάλιστα λόγω υπερινσουλιναϊμίας, ενισχύονται οι υπόλοιπες δράσεις της ορμόνης (**σχήμα 3**, **σχήμα 7**). Ειδικότερα, αναστέλλονται οι PI3K-εξαρτώμενες δράσεις της ινσουλίνης στην διακίνηση και το μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ, τους μυς και το λίπος, καθώς επίσης οι δράσεις στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος και η αντιλιπολυτική δράση. Λόγω της αναστολής της αντιλιπολυτικής δράσης της ινσουλίνης αυξάνεται η απελευθέρωση FFAs που επάγουν τις αντιδράσεις παραγωγής ROS (*Muniyappa et al., 2007*). Αντιθέτως, διατηρούνται οι επαγωγικές δράσεις της ινσουλίνης στην σύνθεση TG στο λιπώδη ιστό, στην απελευθέρωση FFAs και TG από το ήπαρ και στη νεφρική επαναρρόφιση άλατος (**σχήμα 7**) (*Muniyappa et al., 2007; Rask-Madsen & Kahn 2012*).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη συντελεί σημαντικά στην παθογένεια των διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης, αλλά δεν αρκεί για την εκδήλωση ΔΑΓ ή ΣΔτ2. Στις ασθενείς με ΣΠΩ και φυσιολογική ανοχή της γλυκόζης, η έκκριση της ινσουλίνης από το πάγκρεας αντιρροπεί επαρκώς τον βαθμό της αντίστασης στην ινσουλίνη διατηρώντας τη γλυκόζη σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ανοχή της γλυκόζης επιδεινώνεται, όταν τα παγκρεατικά β-κύτταρα δεν αντιρροπούν επαρκώς την ινσουλινοαντίσταση, καθώς είναι πιθανό ότι ένα ποσοστό των γυναικών με ΣΠΩ φέρουν γενετικά προκαθορισμένη διαταραχή της λειτουργίας των β-κυττάρων (O'Meara et al., 1993; Dunaif et al., 1996; Ehrmann et al., 1995; Ehrmann et al., 2004). Ως αποτέλεσμα, μπορεί να εκδηλωθεί ΣΔτ2, ιδιαιτέρως σε καταστάσεις, όπου η αντίσταση στην ινσουλίνη επιδεινώνεται, όπως η αύξηση του σωματικού βάρους, η κήση ή η χορήγηση αγωγής με κορτικοστεροειδή (Ehrmann et al., 2004; Kousta et al., 2000).

Στο καρδιαγγειακό σύστημα παρατηρείται αντίσταση στις δράσεις της ινσουλίνης στο μυοκάρδιο, στην αύξηση της τριχοειδικής αιμάτωσης, στην ενδοθηλιακή παραγωγή αγγειοδιασταλτών, όπως το NO και στην αναστόλη σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. Αντιθέτως, διατηρείται η ινσουλινοεπαγόμενη σύνθεση αγγειοσυσπαστικών ουσιών στα αγγεία, με κυριότερο εκπρόσωπο την ET-1 (σχήμα 7) (Muniyappa et al., 2007; Rask-Madsen & Kahn 2012).

Ο «διχασμός» ανάμεσα στις καρδιαγγειακές δράσεις της ινσουλίνης που διατηρούνται και σε εκείνες που διαταράσσονται λόγω ινσουλινοαντίστασης έχει μελετηθεί και στο ΣΠΩ. Ειδικότερα, οι σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες με ΣΠΩ παρουσιάζουν αντίσταση στην ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή και στην αύξηση της τριχοειδικής αιμάτωσης που επάγονται από την ινσουλίνη (Ketel et al., 2011; Carmassi et al., 2005; Diamanti-Kandarakis et al., 2005b). Αντιθέτως, διατηρείται η ινσουλινοεπαγόμενη αγγειοσύσπαση με αύξηση των επιπέδων της ET-1 (Diamanti-Kandarakis et al., 2001) και η ινσουλινοεπαγόμενη αύξηση της σύνθεσης του PAI-1 (Carmassi et al., 2005). Επίσης, φαίνεται να διατηρείται η συμπαθομιμητική δράση της ινσουλίνης που πιθανόν εξηγεί εν μέρει την αυξημένη δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος στις γυναίκες με ΣΠΩ (Lansdown and Rees 2012; Yildirim et al., 2006).

**Σχήμα 7.** Δράσεις της ινσουλίνης σε σύνδρομο ινσουλinoαντίστασης.



A: Ιστοί με αντίσταση στην ινσουλίνη, E: Ιστοί που διατηρούν ευαισθησία στην ινσουλίνη. Τροποποιημένο σχήμα από *Rask-Madsen and Kahn 2012*.

Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς με ινσουλinoαντίσταση και ειδικότερα, οι γυναίκες με ΣΠΩ έχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν παθολογική ανοχή στη γλυκόζη (ΔΑΓ και ΣΔτ2) και δυσλιπιδαιμία, οι οποίες είναι μείζονες παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου (*Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 2001*). Επιπλέον, η ινσουλinoαντίσταση συμβάλλει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στις δομολειτουργικές διαταραχές της καρδιάς και των αγγείων που έχουν ανιχνευθεί με απεικονιστικές μελέτες και βιοχημικούς δείκτες στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Cussons et al., 2006; Toulis et al., 2011*). Οι προαναφερθείσες μεταβολές πιθανόν επιταχύνουν τη διαδικασία της αθηρογένεσης σ' αυτόν τον πληθυσμό.

### 1.5.3.3 Υπερανδρογοναιμία

Οι καρδιαγγειακές δράσεις της υπερανδρογοναιμίας στις γυναίκες με ΣΠΩ παραμένουν υπό διερεύνηση.

Στο γενικό γυναικείο πληθυσμό οι ανδρογονικές δράσεις στην καρδιά και τα αγγεία έχουν μελετηθεί μετά την εμμηνόπαυση, οπότε η πτώση των οιστρογόνων οδηγεί σε σχετικό πλεόνασμα των ανδρογόνων (αύξηση λόγου ανδρογόνων προς οιστρογόνα). Ως εκ τούτου, στις κλινικές μελέτες που εξετάζουν την πιθανή συσχέτιση των επιπέδων των ανδρογόνων με τις καρδιαγγειακές παραμέτρους, κρίνεται απαραίτητη η στατιστική διόρθωση ως προς τα επίπεδα των οιστρογόνων, δεδομένου ότι τόσο τα οιστρογόνα όσο και τα ανδρογόνα επιδρούν στο καρδιαγγειακό σύστημα (*Braunstein et al., 2008*).

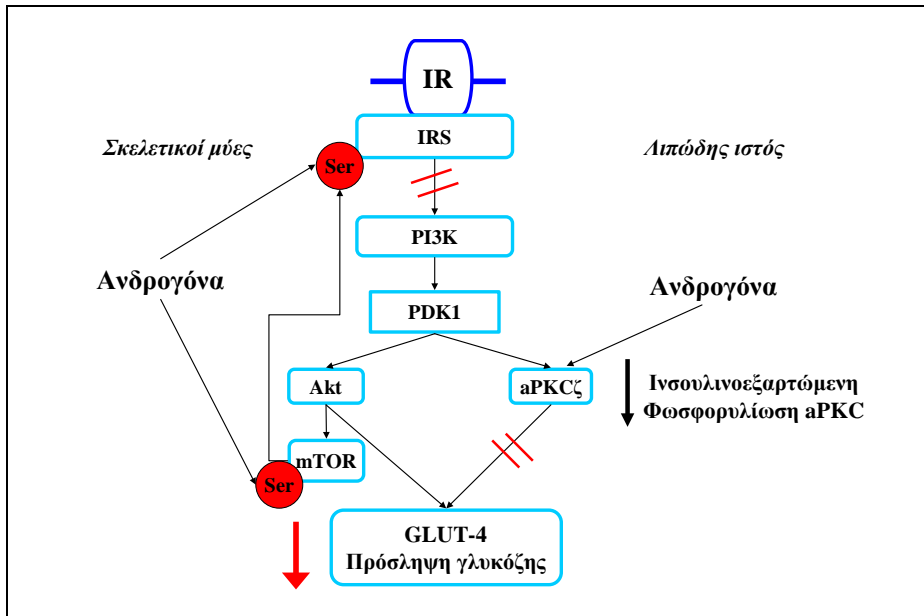
Οι μελέτες στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν δώσει ποικίλα αποτελέσματα ως προς τη συσχέτιση των ανδρογόνων με τους δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου και την επίπτωση καρδιαγγειακών συμβαμάτων (*Barrett-Connor and Goodman-Gruen 1995; Chen et al., 2011; Rexrode et al., 2003; Patel et al., 2009*). Τα διαφορετικά αποτελέσματα οφείλονται τουλάχιστον εν μέρει σε διαφορές των υπό μελέτη πληθυσμών. Επιπλέον, στις περισσότερες από τις υπάρχουσες μελέτες που εξέτασαν τη συσχέτιση των ανδρογόνων με τις καρδιαγγειακές παραμέτρους δεν έχει γίνει διόρθωση ως προς τα επίπεδα των οιστρογόνων.

Η πρώτη προοπτική μελέτη που συσχέτισε τα επίπεδα ανδρογόνων με την καρδιαγγειακή νοσηρότητα έγινε από τους *Laughlin et al.* σε πληθυσμό 639 μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ηλικίας 50-91 ετών με μέση διάρκεια παρακολούθησης 12 ετών (*Laughlin et al., 2010*). Σ' αυτή τη μελέτη η συσχέτιση των επιπέδων της βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης (bioT) με την επίπτωση καρδιαγγειακής νόσου είχε τη μορφή καμπύλης U. Ειδικότερα, οι γυναίκες που είχαν επίπεδα bioT είτε στο κατώτατο είτε στο ανώτατο πεμπτημόριο είχαν υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου συγκριτικά με τις γυναίκες που είχαν επίπεδα bioT στο μέσο πεμπτημόριο, ανεξαρτήτως ηλικίας, παχυσαρκίας, καπνίσματος ή κατανάλωσης αλκοόλ, επιπέδων οιστραδιόλης και προηγηθείσας ωοθηκεκτομής (*Laughlin et al., 2010*).

Οι μηχανισμοί που υπόκεινται των καρδιαγγειακών επιδράσεων της υπερανδρογοναιμίας παραμένουν αντικείμενο μελέτης. Η υπερανδρογοναιμία στις γυναίκες με ΣΠΩ φαίνεται να ασκεί δυσμενείς μεταβολικές δράσεις. Επίσης, πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η τεστοστερόνη πιθανόν επάγει την παραγωγή οξειδωτικού φορτίου και ασκεί άμεσες δράσεις στο αγγειακό δίκτυο.

Όσον αφορά στις μεταβολικές δράσεις της, η υπερανδρογοναιμία πιθανόν αυξάνει την ινσουλινοαντίσταση στους σκελετικούς μυς (*Holmang et al., 1992; Manneras et al., 2007; Allemand et al., 2009*). Πειραματικά δεδομένα σε θηλυκούς αρουραίους μετά ωοθηκεκτομή έδειξαν ότι η χορήγηση τεστοστερόνης αυξάνει τον αριθμό των τύπου Ib μυϊκών ινών που έχουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη (*Holmang et al., 1992*). Ειδικότερα, η τεστοστερόνη φαίνεται να επάγει την σερινική φωσφορυλίωση του mammalian target of Rapamycin (mTOR), που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την σερίνη του IRS-1. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η υπερανδρογοναιμία πιθανόν αναστέλλει την ενδοκυττάρια οδό της ινσουλίνης στο επίπεδο του IRS-1 (**Σχήμα 8**).

**Σχήμα 8** Δράσεις των ανδρογόνων στην ενδοκυττάρια οδό της ινσουλίνης στους σκελετικούς μυς και στο λιπώδη ιστό.



Συντμήσεις: *aPKCζ* :atypical protein kinase Cζ; *GLUT-4*:Glucose transporter-4, *IR*: Insulin receptor, *IRS-1*: Insulin receptor substrate -1; *mTOR*: mammalian target of Rapamycin , *PDK-1*: Phosphoinositide-dependent Kinase-1 ; *PI3K* : phosphatidylinositol 3-kinase, *Ser*:serine .

Στο λιπώδη ιστό η τεστοστερόνη μέσω του υποδοχέα της πιθανόν αναστέλλει το ενδοκυττάριο μεταβολικό μονοπάτι της ινσουλίνης, ενώ δεν επηρεάζει τις μιτωτικές/αναβολικές δράσεις της (Corbould 2007). Ειδικότερα, σε καλλιέργεια ανθρώπινων λιποκυττάρων του υποδόριου λίπους η χορήγηση τεστοστερόνης ανέστειλε την ινσουλινεξαρτώμενη φωσφορυλίωση της PKCζ, με αποτέλεσμα την ελάττωση της πρόσληψης γλυκόζης (Corbould 2007) (Σχήμα 8). Επιπλέον, η υπερανδρογοναιμία φαίνεται να επιδρά στο μεταβολισμό και την ενδοκρινική λειτουργία του λιπώδους ιστού. Ειδικότερα, η τεστοστερόνη πιθανόν συμβάλλει στην σπλαγγχνική συσσώρευση λίπους (Escobar-Morreale 2007; Manneras et al., 2007), αναστέλλει τη λιπολυτική δράση των κατεχολαμινών στο υποδόριο λίπος (Dicker et al., 2004; Arner 2005) και ελαττώνει την έκκριση αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα (Xu et al., 2005). Αυτά τα δεδομένα πιθανόν εξηγούν τη συσχέτιση των επιπέδων τεστοστερόνης ορού με τους δείκτες κεντρικής παχυσαρκίας στις γυναίκες με ΣΠΩ (Svendsen et al., 2008).

Στο ήπαρ τα ανδρογόνα πιθανόν αναστέλλουν την κάθαρση της ινσουλίνης επιδεινώνοντας την υπερινσουλιναίμια που υπάρχει λόγω ινσουλिनoαντίστασης στο ΣΠΩ (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012). Η υπερινσουλιναίμια φαίνεται να ασκεί δυσμενείς επιδράσεις σε μεταβολικές διεργασίες και σε καρδιαγγειακές παραμέτρους, δεδομένου ότι οι ιστοί διατηρούν μερική/επιλεκτική ευαισθησία στην ινσουλίνη σε σύνδρομο ινσουλινoαντίστασης (Muniyappa et al., 2007; Rask-Madsen and Kahn 2012 ) (Σχήμα 7).

Εκτός από τις μεταβολικές δράσεις, τα ανδρογόνα φαίνεται να δρουν άμεσα στο καρδιαγγειακό σύστημα (Vitale et al., 2010). Επίσης, η τεστοστερόνη φαίνεται να

προάγει τις αντιδράσεις παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών και γλυκοοξειδωτικού φορτίου (**Σχήμα 9 α και β**).

Η παρουσία ανδρογονικών υποδοχέων στο ενδοθήλιο και τα λεία μυοκύτταρα των αγγείων, στο μυοκάρδιο και στο νεφρικό φλοιό υποδηλώνει ότι τα ανδρογόνα μέσω των υποδοχέων τους επηρεάζουν τη λειτουργία της καρδιάς και τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης. Οι δράσεις της τεστοστερόνης στο αγγειακό τοίχωμα πιθανόν διαφοροποιούνται μεταξύ ανδρών και γυναικών και φαίνεται να εξαρτώνται από την τοπική-ιστική συγκέντρωση του ανδρογόνου και τη διάρκεια της έκθεσης (*Vitale et al., 2010*).

Στα λεία μυοκύτταρα των αγγείων της μικροκυκλοφορίας η τεστοστερόνη φαίνεται να ρυθμίζει το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω επαγωγής των ενζύμων του κυτοχρώματος CYP4504A. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η παραγωγή του 20-υδροξυεικοσατετρανοϊκού οξέος (20-HETE) στο αγγειακό τοίχωμα (*Ishizuka et al., 2007*) (**Σχήμα 9**).

Η ανδρογονοεπαγόμενη αύξηση του 20-HETE πιθανόν έχει πολλαπλές παθοφυσιολογικές συνέπειες, δεδομένου ότι αυτό το μόριο ενέχεται στην παθογένεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, της αρτηριακής υπέρτασης και του μεταβολικού συνδρόμου (*Singh et al., 2007a; Wu et al., 2011; Wu et al., 2013a; Kim et al., 2011*). Συγκεκριμένα, το 20-HETE δρα ως αγγειοσυσπαστικός παράγων μέσω αναστολής του NO, ενώ φαίνεται να επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών, με αποτέλεσμα την υπερπλασία του έσω χιτώνα των αγγείων (*Stec et al., 2007*). Επίσης, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι το 20-HETE εμπλέκεται στην υπερτροφία και δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο του στην παθοφυσιολογία του μεταβολικού συνδρόμου (*Kim et al., 2011*). Επιπλέον, το 20-HETE φαίνεται να ενεργοποιεί το σύστημα κινασών MAPK/ERK, τον NFκB και παράλληλα να επάγει τη NADPH οξειδάση, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του καταρράκτη της φλεγμονής και την αύξηση του οξειδωτικού φορτίου (*Singh et al., 2007a; Ishizuka et al., 2007*) (**Σχήμα 9α**). Η ενεργοποίηση του NFκB οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων που συνθέτουν προφλεγμονώδη και προοξειδωτικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου του RAGE (*Li & Schmidt 1997*). Επιπλέον, το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο προάγει τις αντιδράσεις παραγωγής AGEs, ενώ δρα παλίνδρομα ενεργοποιώντας περαιτέρω τον NFκB. Κατ'αυτόν τον τρόπο, μπορεί να υποθεθεί ότι τα ανδρογόνα αυξάνουν τα επίπεδα των AGEs και του RAGE μέσω επαγωγής του οξειδωτικού stress και του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (**Σχήμα 9β**).

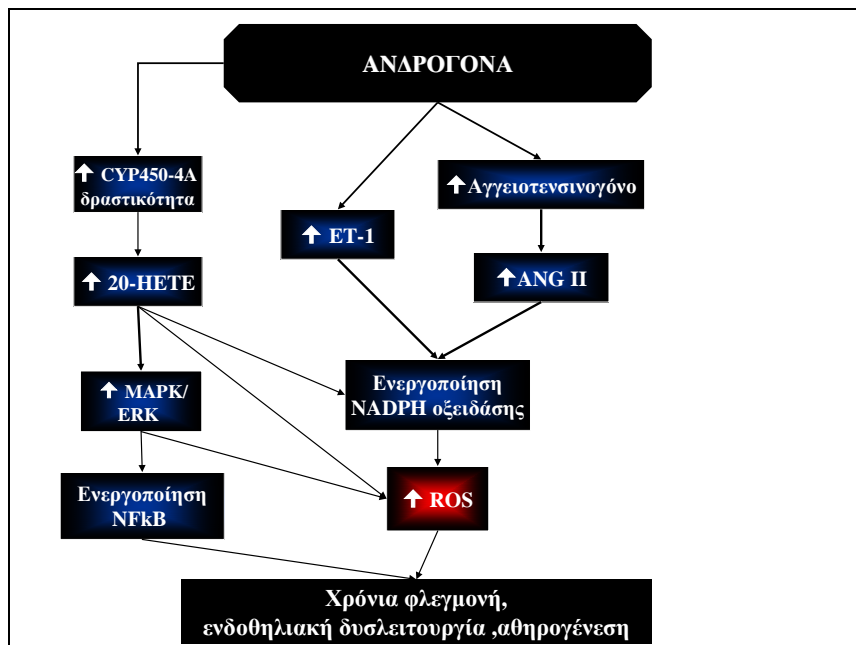
Επιπροσθέτως, η τεστοστερόνη φαίνεται να συμμετέχει στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία διεγείροντας την παραγωγή του αγγειοσυσπαστικού πεπτιδίου ET-1 είτε άμεσα είτε μέσω ενεργοποίησης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Renin Angiotensin System, RAS) (*Van Kesteren et al., 1998; Alexander et al., 2001*). Η ανδρογονοεπαγόμενη ενεργοποίηση του RAS έχει επαληθευθεί από πειραματικές μελέτες σε αρουραίους. Συγκεκριμένα, η χρόνια χορήγηση διϋδροτεστοστερόνης (DHT) σε αρουραίους οδήγησε σε αυξημένη νεφρική επαναρρόφηση νατρίου, η οποία ήταν αναστρέψιμη με την αναστολή του RAS (*Chen et al., 1992*). Αυτά τα δεδομένα πιθανόν υποδηλώνουν ότι τα ανδρογόνα ενεργοποιούν το RAS και επομένως πιθανόν αυξάνουν την έκφραση της αγγειοτενσίνης II (ANG II) (**Σχήμα 9α**). Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η επαναρρόφηση νατρίου και ύδατος από τα εγγύς νεφρικά σωληνάρια και αυξάνεται η αρτηριακή πίεση αίματος (*Quan et al., 2004; Reckelhoff et al., 2005*). Εξάλλου, η

ενεργοποίηση του RAS από την τεστοστερόνη μπορεί να έχει επιπρόσθετες δυσμενείς δράσεις. Ειδικότερα, η ANGII φαίνεται να επάγει τη σύνθεση ET-1 και να ενεργοποιεί το ένζυμο NADPH οξειδάση, με αποτέλεσμα την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την αύξηση του οξειδωτικού φορτίου (*Iliescu et al., 2007*) (**Σχήμα 9α**).

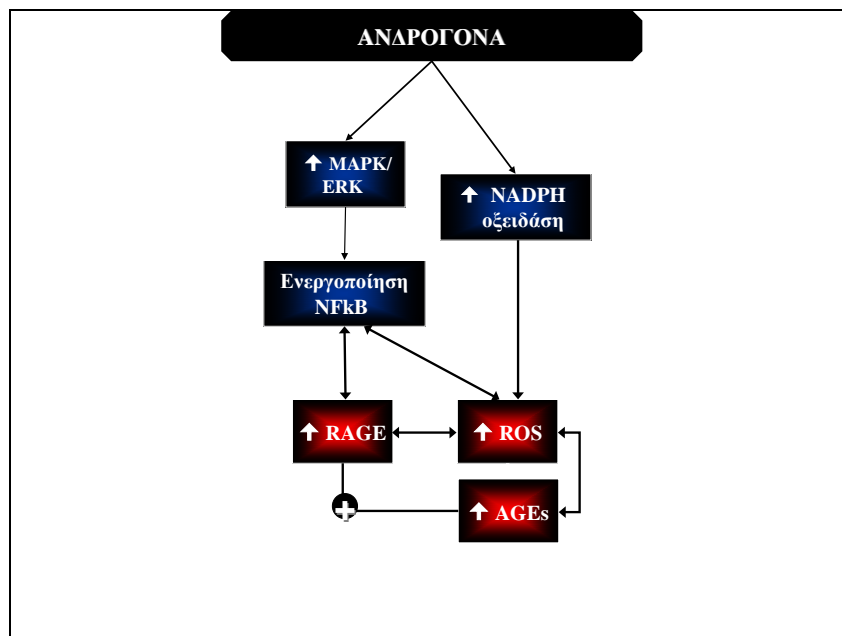


**Σχήμα 9 α)** Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των ανδρογόνων στη χρόνια φλεγμονή, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την αθηρογένεση, **β)** Πιθανός ρόλος των ανδρογόνων στην αύξηση των επιπέδων AGEs και RAGE

α)



β)



Συντμήσεις: 20-HETE: 20-υδροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ, AGEs: Advanced glycation end products, ANG II: αγγειοτενσίνη II, ET-1: ενδοθηλίνη-1, NADPH-οξειδάση: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-οξειδάση, NFκB: nuclear factor Kβ,

*RAGE: Receptor for AGEs, ROS: Reactive oxygen species, MAPK/ERK: Mitogen activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase.*

Συμπερασματικά, τα ανδρογόνα φαίνεται να επιδρούν στην δράση της ινσουλίνης, στην ομοιοστασία και το μεταβολισμό του λιπώδους ιστού, στην παραγωγή κυτοκινών και γλυκοξειδωτικού φορτίου, στην ενδοθηλιακή λειτουργία και στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης. Αυτές οι δράσεις φαίνεται να διαφοροποιούνται μεταξύ ανδρών και γυναικών με ειδικό για κάθε ιστό τρόπο. Η ιστική συγκέντρωση της τεστοστερόνης και ο σχετικός λόγος της προς τη συγκέντρωση των οιστρογόνων σε κάθε ιστό φαίνεται να συμβάλλουν στη ρύθμιση των καρδιομεταβολικών διεργασιών .

## **2. Δείκτες χρόνιας φλεγμονής: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein,CRP)**

### **2.1 Γενικά-Μηχανισμοί παραγωγής**

Η CRP είναι μία μη γλυκοζυλιωμένη πενταμερής πρωτεΐνη οξείας φάσης που ανήκει στην οικογένεια των πεντραξινών. Το υπεύθυνο γονίδιο για την παραγωγή και τη σύνθεση της CRP βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1. Η CRP συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Επίσης παράγεται εξωηπατικά στο λιπώδη ιστό, καθώς επίσης στα μακροφάγα και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, όπου αναπτύσσεται η αθηρωματική πλάκα(Calabro *et al.*,2003;Packard and Libby 2008). Διάφοροι παράγοντες, κυρίως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 , ο TNF- $\alpha$ , αυξητικοί παράγοντες, όπως της ινσουλίνης κ.ά., επιδρούν άμεσα ή έμμεσα αυξάνοντας τη γονιδιακή μεταγραφή και την παραγωγή της CRP. Η σύνθεσή της αρχίζει ταχύτατα μετά από διέγερση ,ώστε οι τιμές της να αυξάνονται άνω των 5 mg/L μέσα σε 6 ώρες.

Η καθιέρωση μεθόδων υψηλής ευαισθησίας για τη μέτρηση της CRP (high sensitivity CRP, hsCRP) επέτρεψε την ευρεία μέτρηση των βασικών επιπέδων της CRP, καθώς μπορούν αξιόπιστα να ανιχνευθούν τιμές έως 0,3 mg/L. Πληθυσμιακές μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα της CRP είναι συνήθως <10 mg/L.

Οι καταστάσεις που συνδέονται με αυξημένα επίπεδα CRP διακρίνονται σε οξείες, όπως είναι οι λοιμώξεις και οι τραυματισμοί και σε χρόνιες, όπως είναι η υπέρταση, η παχυσαρκία, ο ΣΔτ2, το μεταβολικό σύνδρομο και το σύνδρομο υπνικής άπνοιας (Jialal & Devaeaj 2003). Ειδικότερα, μια μετα-ανάλυση 22 προοπτικών μελετών σε σύνολο περίπου 40.000 ατόμων και 5.753 διαβητικών τύπου 2 έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων CRP με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔτ2 (Wang *et al.*,2013).

Επίσης, η Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας έχει εκδόσει οδηγίες, σύμφωνα με τις οποίες τα άτομα με επίπεδα CRP κάτω από 1 mg/L θεωρούνται χαμηλού καρδιαγγειακού κινδύνου, μεταξύ 1 και 3 mg/L ενδιάμεσου κινδύνου και πάνω από 3 mg/L υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου (Pearson *et al.*, 2003).

Οι μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις που ελαττώνουν την CRP περιλαμβάνουν την απώλεια βάρους, τη διακοπή καπνίσματος και τη σωματική άσκηση (Lehman 2003). Στις φαρμακευτικές παρεμβάσεις που ελαττώνουν τα επίπεδα CRP ανήκουν οι στατίνες, οι α-MEA και η ασπιρίνη σε ασθενείς με ΣΝ (Ridker *et al.*, 2001; Madjid & Willerson 2011).

Λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία, την ταχύτητα ανταπόκρισης στη διέγερση και το μεγάλο εύρος τιμών της, οι τιμές της CRP μπορεί να αποκλίνουν σημαντικά μεταξύ τους σε διαδοχικές αιμοληψίες στο ίδιο άτομο (*intraindividual variability*) (Sakkinen et al., 1999; Bogaty et al., 2013). Συνεπώς, μια μεμονωμένη μέτρηση CRP είναι ανακριβής δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου. Γι' αυτό το λόγο, συνιστάται από την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία η διενέργεια δύο μετρήσεων της CRP με διαφορά δύο εβδομάδων και η χρήση του μέσου όρου των δύο τιμών για τον υπολογισμό του καρδιαγγειακού κινδύνου (Pearson et al., 2003).

## **2.2 Η CRP ως παράγων κινδύνου για μεταβολικές διαταραχές και αθηρωματική νόσο**

Η φλεγμονή αποτελεί κυρίαρχο στοιχείο σε όλα τα στάδια της αθηρογένεσης, από την αρχή του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας στο αγγειακό τοίχωμα μέχρι τη ρήξη της και τελικά την αγγειακή απόφραξη (Pearson et al., 2003).

Είναι πλέον γνωστό ότι η CRP ανευρίσκεται στις λείες μυϊκές ίνες των στεφανιαίων αρτηριών, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μοσχεύματα αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (Calabro et al., 2003; Singh et al., 2007b; Jabs et al., 2003), όπου πιθανόν ασκεί παρακρινείς και αυτοκρινείς δράσεις. *In vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η CRP επιταχύνει το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας στο τοίχωμα της αορτής σε ποντίκια με γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη αθηρωματικής νόσου (Paul et al., 2004). Σε πειραματικές μελέτες η έγχυση ανασυνδυασμένης CRP σε ένα μοντέλο αρουραίου με ΣΝ προκάλεσε αύξηση του μεγέθους του εμφράγματος κατά 40% (Devaraj et al., 2009). Ομοίως, σ' ένα μοντέλο αρουραίου με απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας η έγχυση ανθρωπίου CRP αύξησε την έκταση του εμφράγματος (Gill et al., 2004). Αντιστρόφως, η χορήγηση αναστολέα της CRP σ' έναν αρουραίο με OEM ανέστειλε την επέκταση του εμφράγματος και την καρδιακή δυσλειτουργία που προκλήθηκε από την έγχυση ανθρωπίου CRP (Pepys et al., 2006).

Ο ρόλος της CRP στην διεργασία της αθηρογένεσης μπορεί να διαιρεθεί σε τρία επίπεδα: α) στο ενδοθηλιακό επίπεδο, β) στο επίπεδο των μονοκυττάρων/μακροφάγων και γ) στο επίπεδο των λείων μυοκυττάρων (Vascular smooth muscle cells, VSMCs) του αγγειακού τοιχώματος (Devaraj et al., 2009) (**Σχήμα 10**).

Σε ενδοθηλιακό επίπεδο, η CRP σε συγκεντρώσεις, που προβλέπουν αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, ελαττώνει σημαντικά την απελευθέρωση και τη δραστηριότητα των αγγειοδιασταλτικών ουσιών. Αυτή η δράση επιβεβαιώθηκε σε καλλιέργειες ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων για τις δύο κύριες αγγειοδιασταλτικές ουσίες, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και την προστακυκλίνη (Verma et al., 2002; Venugopal et al., 2003). Ειδικότερα για το NO, η CRP ανέστειλε τη σύνθεσή του μέσω αναστολής της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS). Επιπλέον, η CRP ανέστειλε την αγγειογενετική δράση του NO σε συνθήκες χρόνιας ισχαιμίας (Verma et al., 2002; Venugopal et al., 2003), ενώ αύξησε την απελευθέρωση του ισχυρού αγγειοσυσπαστικού πεπτιδίου ET-1 στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (Verma et al., 2002) (**Σχήμα 10**). Παράλληλα, η CRP φαίνεται να επιτείνει τις επιβλαβείς ενδοθηλιακές δράσεις της LDL μέσω αυξημένης έκφρασης του lectin-like oxidized LDL receptor-1 (Li et al., 2004), ενώ προάγει την αλληλεπίδραση μονοκυττάρων-μακροφάγων και ενδοθηλίου μέσω αυξημένης έκφρασης προαθηρογόνων και προθρομβωτικών μορίων από το ενδοθήλιο.

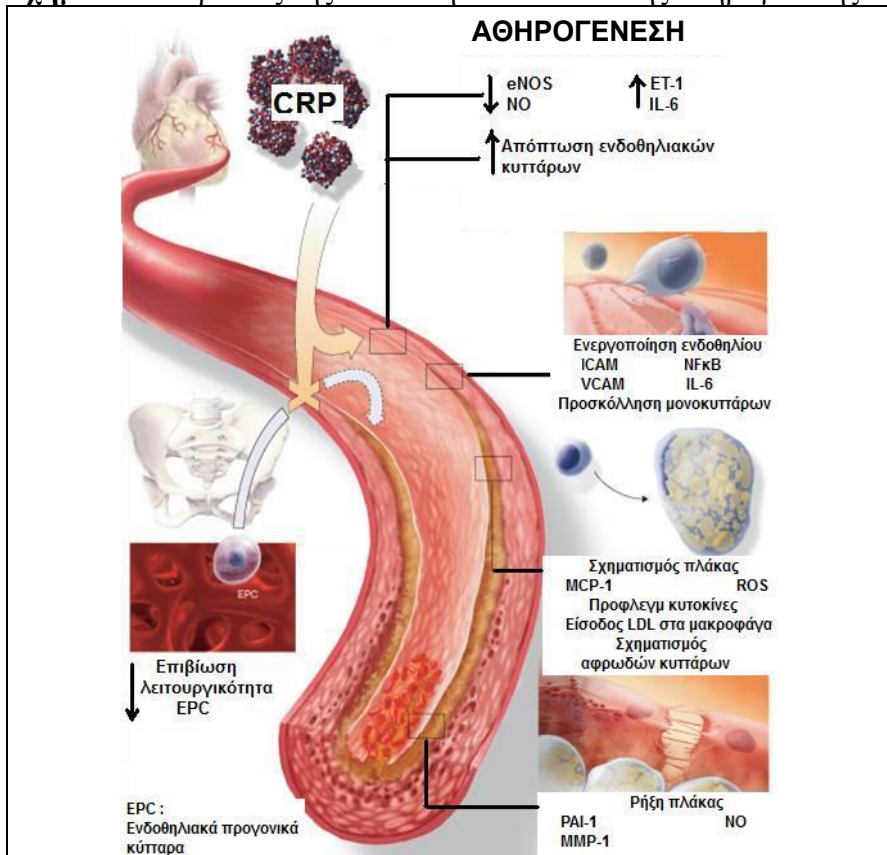
Σ'αυτά τα μόρια ανήκουν η IL-6, η MCP-1, τα μόρια προσκόλλησης intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) και vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) και ο PAI-1 ( *Teoh et al., 2008; Paul et al.,2004*). Με την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και δραστηριότητας του PAI-1 η CRP πιθανόν δρα προθρομβωτικά (*Devaraj et al.,2003*), όπως επιβεβαιώθηκε σε μελέτη έγχυσης ανασυνδυασμένης ανθρωπίου CRP σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς (*Bisoendial et al.,2007*).

Επιπλέον, η CRP επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Verma et al., 2002*) και επηρεάζει την επιβίωση και διαφοροποίηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (*Chen et al.,2009*). Κατά συνέπεια, οδηγεί σε απογύμνωση της ενδοθηλιακής στιβάδας του αγγειακού τοιχώματος και σε αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας,με επακόλουθη ρήξη της και θρόμβωση του αγγείου. Επιπλέον,επειδή τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν νεοαγγειογενετικό ρόλο, η ανασταλτική δράση της CRP σ'αυτά τα κύτταρα μπορεί να ελαττώσει τη νεοαγγείωση στη χρόνια ισχαιμία των στεφανιαίων αγγείων (*Wang et al., 2007*).

Στο επίπεδο των μονοκύτταρων /μακροφάγων, η CRP δρα χημειοτακτικά,αυξάνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, κυτοκινών και μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-1). Επίσης, συνδέεται και οξωνοποιεί τις LDL και επάγει την είσοδο της οξειδωμένης LDL στα μακροφάγα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, που είναι ο θεμέλιος λίθος της αθηρογένεσης (*Devaraj et al.,2009*) .

Στο επίπεδο των λείων μυϊκών ινών η CRP επάγει την έκφραση των υποδοχέων αγγειοτενσίνης AT1, προάγει τη μετανάστευση και υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, ενώ αυξάνει την έκφραση μορίων που συμμετέχουν στον καταρράκτη της φλεγμονής, όπως η MAPK και ο NFκB (*Devaraj et al.,2009*).

**Σχήμα 10** Οι δράσεις της CRP στην διαδικασία της αθηρογένεσης



Συντμήσεις: *eNOS*: endothelial nitric oxide synthase, *EPC*: ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, *ET-1*: ενδοθηλίνη-1, *ICAM*: intercellular adhesion molecule, *IL-6*: Ιντερλευκίνη-6, *LDL*: Low density lipoprotein, *MCP-1*: monocyte chemotactic protein-1, *MMP-1*: Μεταλλοπρωτεϊνάση-1, *NFκB*: nuclear factor kappa B, *NO*: Nitric oxide, *PAI-1*: plasminogen activator inhibitor-1, *ROS*: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, *VCAM*: vascular cell adhesion molecule-1.

Επιπλέον, η CRP φαίνεται να αναστέλλει την ευοδωτική δράση της ινσουλίνης στην ενδοθηλιακή σύνθεση NO συμβάλλοντας στο μηχανισμό της ινσουλινοαντίστασης στο ενδοθήλιο (Xu et al., 2007; Tanigaki et al., 2009). Συνεπώς, θεωρείται πιθανό ότι η CRP συμμετέχει στο μηχανισμό ινσουλινοαντίστασης και σε άλλους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός και οι σκελετικοί μύες. Εξάλλου, τα επίπεδα της CRP βρίσκονται αυξημένα στην παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο (Ridker et al., 2003).

Πρόσφατες μελέτες διερεύνησαν το ρόλο της CRP στις μεταβολικές διαταραχές που συνοδεύουν την παχυσαρκία χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση ανθρωπέιου CRP και ποντίκια-μάρτυρες (Kaneko et al., 2011; Tanigaki et al., 2013). Μετά τη λήψη δίαιτας πλούσιας σε λιπαρά τα ποντίκια με υπερέκφραση CRP παρουσίασαν μεταβολική επιδείνωση ως προς την ανοχή της γλυκόζης, την ινσουλινοευσαιθησία, την έκφραση φλεγμονωδών μορίων και την διήθηση μακροφάγων στο λιπώδη ιστό και τη λιπώδη διήθηση του ήπατος (Kaneko et al., 2011). Επιπλέον, η CRP φαίνεται να αναστέλλει την ινσουλινοεξαρτώμενη μεταφορά γλυκόζης και την ινσουλινοεπαγόμενη αύξηση της αιμάτωσης στους σκελετικούς μύς (Tanigaki et al.,

2013). Συνεπώς, η CRP φαίνεται να ευοδώνει την ανάπτυξη του μεταβολικού φαινοτύπου που χαρακτηρίζει τα σύνδρομα ινσουλινοαντίστασης.

Τα υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα για τις δράσεις της CRP υποδηλώνουν την πιθανή συσχέτισή της με την αθηρογένεση. Επιπλέον, μεγάλος αριθμός προοπτικών μελετών έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της CRP εμφανίζουν θετική γραμμική συσχέτιση με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και καρδιαγγειακών συμβαμάτων και στα δύο φύλα σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες και εθνικότητες (*Sakkinen et al., 2002; Koenig et al., 1999; Greenland et al., 2010; Wilson et al., 2005*). Μια πρόσφατη μεταανάλυση 54 μελετών σε σύνολο 160,309 ατόμων χωρίς γνωστό ιστορικό αγγειακής νόσου έδειξε ότι τα επίπεδα της CRP έχουν θετική συσχέτιση με τον κίνδυνο ΣΝ και ΑΕΕ, καθώς επίσης με την αγγειακή θνητότητα (*Kapoge et al., 2010*). Ωστόσο, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η προβλεπτική αξία της hsCRP ελαττώνεται σημαντικά, όταν στο στατιστικό μοντέλο συμπεριληφθούν η παχυσαρκία και οι κλασικοί παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου (*Kapoge et al., 2010*). Συνεπώς, φαίνεται ότι η σχέση της CRP και της καρδιαγγειακής νοσηρότητας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι εν μέρει συμβάλλουν και στην αύξηση της CRP.

### **3. Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)**

#### **3.1 Γενικά- Μηχανισμοί παραγωγής των AGEs**

Τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycated end products, AGEs) είναι ετερογενής ομάδα μορίων, που παράγονται ενδογενώς σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας ή ευγλυκαιμίας μέσω της μη ενζυμικής αντίδρασης της αλδεϋδομάδας της γλυκόζης ή άλλων αναγόμενων σακχάρων με τις αμινομάδες πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων ή φωσφολιπιδίων. Αρχικά σχηματίζονται χημικώς αναστρέψιμα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα, οι βάσεις *Schiff* (αντίδραση *Maillard*) που μετατρέπονται σε πιο σταθερά μόρια, τα προϊόντα *Amadori*. Μερικά από αυτά τα γλυκοζυλιωμένα προϊόντα συνεχίζουν να υφίστανται χημικές αντιδράσεις μοριακής επαναδιεθέτησης, αφυδάτωσης, συμπύκνωσης και οξειδωσης μέχρι το μη αναστρέψιμο σχηματισμό των AGEs (**Σχήμα 11**).

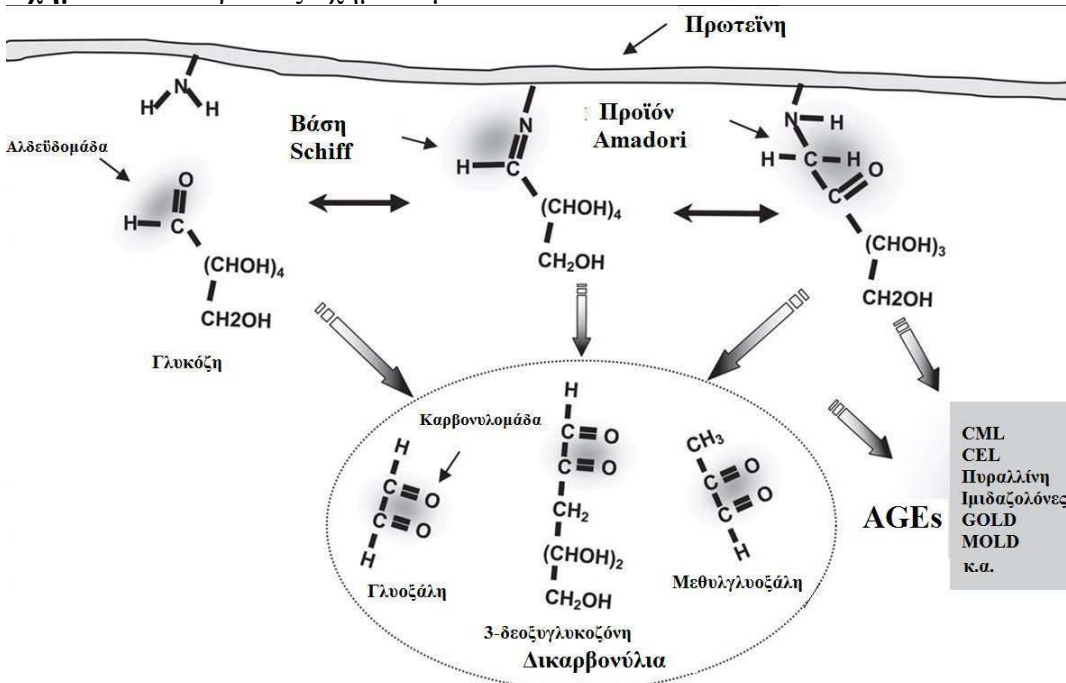
Οι εναλλακτικές οδοί σχηματισμού των AGEs περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχει το «καρβονυλικό stress». Πρόκειται για αντιδράσεις με δραστικά δικαρβονύλια, τα οποία σχηματίζονται από την αυτο-οξειδωση της γλυκόζης, των *Schiff* βάσεων ή και των *Amadori* προϊόντων. Δεδομένου ότι τα δικαρβονύλια μπορούν επίσης να σχηματισθούν από κετόνες, λιπίδια και άλλα μόρια, η υπεργλυκαιμία δεν είναι αναγκαία συνθήκη για την παραγωγή των AGEs (*Barlovic et al., 2011*). Τα κυριότερα από αυτά τα δικαρβονύλια είναι η γλυοξάλη, η μεθυλγλυοξάλη (MG) και η 3-δεοξυγλυκαζόνη. Στη συνέχεια, τα δικαρβονύλια αντιδρούν με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τις δραστικές καρβονυλικές ομάδες και σχηματίζουν τα AGEs. Ειδικότερα, η MG, που αποτελεί το γνωστότερο δικαρβονύλιο, 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 (**Σχήμα 11**).

Από την ετερογενή ομάδα των AGEs μόνο 25 μόρια έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται η εN-Καρβοξυμεθυλυσίνη (CML), η πεντοσιδίνη και οι προερχόμενες από τα δικαρβονύλια ιμιδαζολόνες (**Σχήμα 11**). Η

CML, παράγωγο γλυκοζυλίωσης της λυσίνης, είναι το ευρύτερα γνωστό AGE και αποτελεί τον επίτοπο που αναγνωρίζουν τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των AGEs .

Ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων παραγωγής AGEs, απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και παράγονται AGE-τροποποιημένες πρωτεΐνες .Οι τελευταίες έχουν διαταραγμένη λειτουργικότητα και είτε υφίστανται ταχεία αποδόμησή είτε δημιουργούν ανθεκτικά στην πρωτεόλυση συμπλέγματα.

**Σχήμα 11** Αντιδράσεις σχηματισμού των AGEs



**Σχ.11.** Αρχικά η αλδεϋδομάδα της γλυκόζης αντιδρά με την αμινομάδα της πρωτεΐνης και σχηματίζει ένα χημικώς αναστρέψιμο γλυκοζυλωμένο παράγωγο, η βάση Schiff, η οποία ακολούθως μετατρέπεται σε ένα πιο σταθερό μόριο, το προϊόν Amadori. Τα προϊόντα Amadori υφίστανται περαιτέρω χημικές αντιδράσεις μέχρι το μη αναστρέψιμο σχηματισμό των AGEs. Εναλλακτικά, τα AGEs σχηματίζονται με τις αντιδράσεις «καρβονυλικού stress». Πρόκειται για αντιδράσεις με δραστικά δικαρβονύλια, τα οποία σχηματίζονται από την αυτο-οξείδωση της γλυκόζης, των λιπιδίων, των Schiff βάσεων ή και των Amadori προϊόντων. Τα κυριότερα από αυτά τα δικαρβονύλια είναι η γλυοξάλη, η μεθυλγλυοξάλη (MG) και η 3-δεοξυγλυκοζόνη. Στη συνέχεια, τα δικαρβονύλια αντιδρούν με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τις δραστικές καρβονυλικές ομάδες και οδηγούν στο σχηματισμό των AGEs. Ειδικότερα, η MG, που αποτελεί το γνωστότερο δικαρβονύλιο, αντιδρά με ελεύθερες ομάδες λυσίνης για τον σχηματισμό των AGEs, όπως της CEL ή του MOLD. Αντιδρά επίσης με την αργινίνη για τον σχηματισμό των υδροϊμιδαζολονών. Συντμήσεις: CEL: Nε-[1-(1-carboxy)ethyl]lysine, CML: carboxymethyllysine, GOLD : glyoxal-lysine dimer MOLD : methylglyoxal-lysine dimer.

Εκτός από την ενδογενή παραγωγή, τα AGEs προσλαμβάνονται από εξωγενείς πηγές, όπως ο καπνός και οι τροφές, κυρίως αυτές που είναι μαγειρεμένες σε υψηλές θερμοκρασίες. Πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπους έχουν επιβεβαιώσει ότι τα προσλαμβανόμενα με τις τροφές AGEs απορροφώνται σε ποσοστό 10% και αυξάνουν τα επίπεδα AGEs στην κυκλοφορία και στους ιστούς (*Koschinsky et al., 1997; Cerami et al., 1997; He et al., 1999*).

Η ιστική συσσώρευση των AGEs εξαρτάται από την ενδογενή παραγωγή, την εξωγενή πρόσληψη, αλλά και από τους μηχανισμούς κάθαρσής τους. Ειδικότερα, τα AGEs αποδομούνται μέσω πρωτεόλυσης που οδηγεί σε AGE-πεπτίδια ή τμήματα των AGEs συνδεδεμένα με αμινοξέα (*Penfold et al., 2010*). Τα προϊόντα αποδόμησης των AGEs απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω νεφρικής απέκκρισης. Εναλλακτικά, τα AGE-πεπτίδια ενδοκυτταρώνονται από τα κύτταρα των εγγύς νεφρικών σωληναρίων, όπου αποδομούνται περαιτέρω σε AGE-αμινοξέα και ακολούθως εκκρίνονται στον σωληναριακό αυλό προς αποβολή με τα ούρα. Τα μεγαλύτερα εξωκυττάρια AGEs δεν μπορούν να διέλθουν την σπειραματική βασική μεμβράνη και συνεπώς πρέπει προηγουμένως να εισέλθουν στα περιφερικά μακροφάγα, όπου μετατρέπονται στα προαναφερόμενα προϊόντα αποδόμησης, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να αποβληθούν από το νεφρό (*Gugliucci and Bendayan 1996*). Ο υποδοχέας Macrophage scavenger receptor-1 (MSR-1), που βρίσκεται στην επιφάνεια των μακροφάγων, διαμεσολαβεί την αποβολή/κάθαρση των AGEs μέσω της οδού της PI3K. Αυτή η οδός φαίνεται να αναστέλλεται από την παρουσία ινσουλινοαντίστασης (*Sano et al., 1998*) και πιθανόν συμβάλλει σε αύξηση των συγκεντρώσεων AGEs σε σύνδρομα ινσουλινοαντίστασης, όπως το ΣΠΩ. Άλλοι μηχανισμοί/ενζυμικά συστήματα που συντελούν στην εξουδετέρωση των AGEs είναι το σύστημα γλυοξαλάσης (GLO), που αποδομεί τα δικαρβονύλια και ο υποδοχέας AGE-receptor I, που αναστέλλει τις επιβλαβείς ενδοκυττάρειες δράσεις των AGEs (*Thornalley 1990; Vlassara 2005*).

### **3.2 Μηχανισμοί δράσης των AGEs**

Η αυξημένη μη ενζυμική γλυκοζυλίωση και η συσσώρευση AGEs στους ιστούς έχουν αναγνωρισθεί ως οι κύριοι μηχανισμοί των διαβητικών επιπλοκών και της γήρανσης. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα AGEs ασκούν επιβλαβείς επιδράσεις σε κυτταρικό επίπεδο δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως. Ο σχηματισμός αδιάλυτων δεσμών και η ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης των AGEs με τον υποδοχέα RAGE φαίνεται ότι έχουν κυρίαρχο ρόλο.

Τα AGEs συμμετέχουν σε μη ενζυμικές αντιδράσεις (αντιδράσεις *Maillard*) με πρωτεΐνες και άλλα μόρια που επιτελούν τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Η σύνδεση των AGEs με αυτά τα μόρια οδηγεί σε χημική τροποποίηση τους και δημιουργεί συμπλέγματα που έχουν διαταραγμένη βιολογική δραστηριότητα και λειτουργικότητα, τροποποιημένο χρόνο ημίσειας ζωής και αλλοιωμένη «αντιγονικότητά». Κύρια μόρια-στόχοι της AGE τροποποίησης είναι οι πρωτεΐνες με μακρό χρόνο ημίσειας ζωής, όπως της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Επίσης, δεδομένου ότι στο μιτοχόνδριο λαμβάνει χώρα μεγάλο μέρος των αντιδράσεων γλυκοοξειδωσης του κυττάρου, οι πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας υφίστανται μεγάλο βαθμό AGE τροποποίησης.

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση των AGEs με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα RAGE επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS).

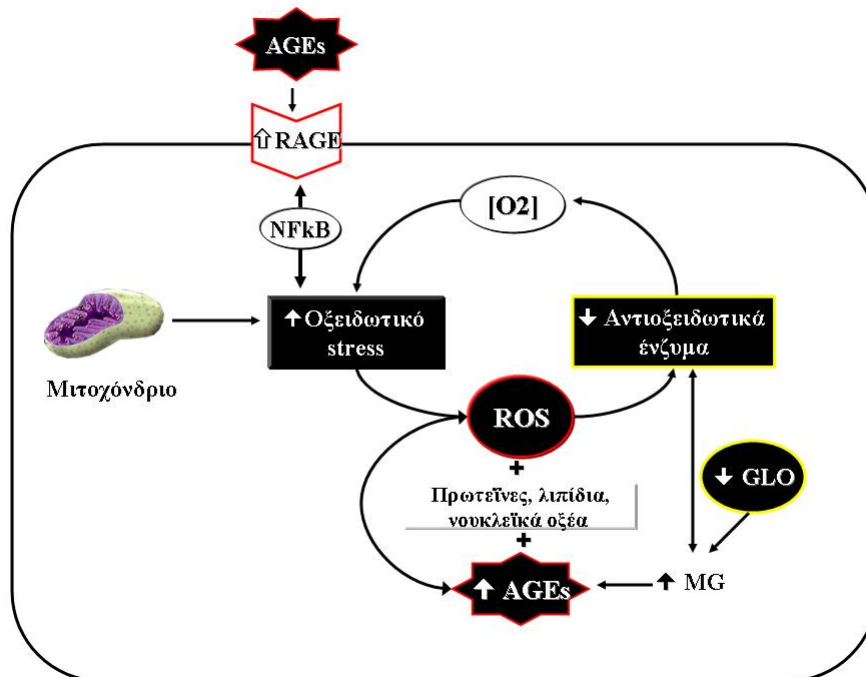


Τα AGEs παράγουν αλλά και παράγονται από το οξειδωτικό stress (Baynes & Thorpe 2000; Goldin et al.,2006). Στην αμφίδρομη σχέση μεταξύ AGEs και οξειδωτικού φορτίου ενέχονται πολλοί μηχανισμοί (Σχήμα 12). Πιο συγκεκριμένα, τα πρόδρομα των AGEs δικαυβονύλια και ειδικότερα, η μεθυλγλυοξάλη αυξάνουν την παραγωγή οξειδωτικού φορτίου μέσω απενεργοποίησης του αντιοξειδωτικού ενζύμου αναγωγής της γλουταθειόνης (Vander Jagt et al.,1997). Με τη σειρά τους οι αυξημένες συγκεντρώσεις ROS καταναλώνουν τα ενδοκυττάρια αποθέματα του αντιοξειδωτικού αμινοξέος GSH, με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας της γλυοξαλάσης I (GLO I), που αποτελεί το ενζυμικό σύστημα κάθαρσης της μεθυλγλυοξάλης. Κατά συνέπεια, αυξάνονται οι συγκεντρώσεις της μεθυλγλυοξάλης και των AGEs (Kalapos 2008). Επιπλέον, οι AGE-τροποποιημένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τον RAGE, ο οποίος ενεργοποιεί τον NFκB, με αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που συνθέτουν παράγοντες της φλεγμονής και ROS (Basta et al., 2004; Vlassara 2005). Στα γονίδια-στόχους του NF-kB ανήκει το γονίδιο του RAGE (Li & Schmidt 1997) και επομένως, τα αυξημένα επίπεδα AGEs οδηγούν σε υπερέκφραση των υποδοχέων RAGE και περαιτέρω ενίσχυση των RAGE-διαμεσολαβούμενων δράσεων των AGEs (Basta et al., 2004; Goldin et al.,2006).

Συμπερασματικά, οι ROS και τα AGEs σχηματίζουν έναν αυτοανατροφοδοτούμενο κύκλο γλυκοξείδωσης, ο οποίος συντηρεί αυξημένα επίπεδα παραγωγής αυτών των μορίων. Σ' αυτόν τον κύκλο το μιτοχόνδριο έχει κεντρικό ρόλο ως θέση παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων οξειδωτικών ριζών (Σχήμα 12). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μη αναστρέψιμη βλάβη των ιστών (Baynes & Thorpe 2000; Goldin et al.,2006; Kalapos 2008).






Οι δράσεις των AGEs ασκούνται σε πολλαπλούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών, του λιπώδους ιστού, των παγκρεατικών νησιδίων και των αγγείων (Σχήμα 13). Επίσης, νεότερα δεδομένα αποδίδουν στα AGEs άμεσες δράσεις στην ωοθήκη (Σχήμα 13). Το ευρύ φάσμα των δράσεων των AGEs θα συζητηθούν αναλυτικότερα στις ακόλουθες υποενότητες.

**Σχήμα 12** Μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού stress και AGEs στο κύτταρο



**Σχ.12.** Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αποτελεί κύριο μηχανισμό αύξησης του ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress (ROS), το οποίο με τη σειρά του αφενός αναστέλλει ή εξουδετερώνει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και αφετέρου επάγει την ενδοκυττάρια παραγωγή MG και AGEs. Η αναστολή των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της GLO αυξάνει περαιτέρω τα ενδοκυττάρια επίπεδα MG και AGEs. Τα εξωκυττάρια AGEs συνδέονται με τον RAGE, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NFκB, την παραγωγή ενδοκυττάριου οξειδωτικού stress και την παλίνδρομη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του RAGE. Τόσο οι ROS όσο και τα AGEs συνδέονται και τροποποιούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, με τελικό αποτέλεσμα τη μη αναστρέψιμη βλαβή της κυτταρικής δομής και λειτουργίας. Συντομογραφίες: AGEs: *Advanced glycation end products*, GLO: *Glyoxalase*, MG: *Methylglyoxal*, NFκB: *Nuclear factor kappa B*, RAGE: *Receptor for AGEs*, ROS: *Reactive oxygen species*.

**Σχήμα 13.** Ιστοί-στόχοι των AGEs ,μηχανισμοί δράσης και πιθανές κλινικές επιπτώσεις

Μηχανισμοί δράσης των AGEs	Ιστοί-στόχοι	Πιθανές κλινικές επιπτώσεις
<p>Ινσουλινοαντίσταση Πρόσληψη γλυκόζης</p>		<b>ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ</b>
<p>Αυξημένη παραγωγή κυτοκινών</p>		
<p>Δυσλειτουργία β-κυττάρου</p>		<b>ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ τ2</b>
<p>Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία Υπερπλασία έσω χιτώνα αγγείων και ECM</p>		<b>ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗ</b>
<p>Αλλοίωση δομής στρώματος Επαγωγή ενδοωοθηκικού οξειδωτικού stress</p>		<b>ΩΘΗΚΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΠΩ?</b>

Συνοτομογραφίες: AGEs: *advanced glycation end products*, ECM: *Εξωκυττάρια θεμέλιος ουσία*

### 3.3 Ρόλος των AGEs στην αθηρωματική νόσο

Τα AGEs έχουν ανιχνευθεί στις προαθηρωματικές βλάβες (λιποειδικές ζώνες), στις αθηρωματικές πλάκες, στα λεία μυοκύτταρα και στα μακροφάγα διαβητικών ασθενών. Η ιστική συγκέντρωση των AGEs έχει συσχετισθεί με τον βαθμό/έκταση της αθηρωματικής βλάβης (*Basta et al., 2004*).

Τα παραγόμενα AGEs μπορούν να επιταχύνουν την αθηρωματική διαδικασία με μηχανισμούς που είτε δεν έχουν σχέση με τον RAGE ή διαμεσολαβούνται από αυτόν (**Σχήμα 14**). Η σημασία των AGEs έχει αποδειχθεί από την επιβράδυνση της αθηρωμάτωσης σε επίμυς με γενετική προδιάθεση για πρόωρη αθηρωμάτωση, όταν τους χορηγήθηκε ουσία που δεσμεύει τα AGEs. Η επιβράδυνση της αθηρογένεσης ήταν ανεξάρτητη από τα επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων αίματος, γεγονός που υποδηλώνει την ανεξάρτητη επίδραση των AGEs στην αθηρωματική διαδικασία (*Mendez et al., 2010*).

Ειδικότερα, τα AGEs επιταχύνουν την αθηρωμάτωση μέσω της σύνδεσής τους με εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια μόρια που συμμετέχουν στην αθηρογένεση. Η σύνδεση των AGEs με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του αγγειακού τοιχώματος (extracellular matrix, ECM) επισυμβαίνει σε πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ημιζωής και οδηγεί στη δημιουργία μη αναστρέψιμων δεσμών (cross-links), που τροποποιούν τη δομή και λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. Η δημιουργία cross-links με τις πρωτεΐνες του αγγειακού τοιχώματος διαταράσσει τις διαπρωτεϊνικές συνδέσεις και ελαττώνει τη σύνδεσή τους με πρωτεογλυκάνες και την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, αυξάνεται η σύνθεση κολλαγόνου τύπου IV, τύπου V και τύπου VI, λαμίνινης και φιμπρονεκτίνης στην ECM, πιθανόν μέσω επαγωγής του transforming

growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Το αποτέλεσμα είναι η αλλοίωση της δομής και η πάχυνση-υπερπλασία της ECM με περιορισμό της αγγειακής διατασιμότητας (*arterial stiffness*) (Goldin et al., 2006).

Επιπλέον, τα AGEs συνδέονται με τις λιποπρωτεΐνες LDL, τροποποιώντας τόσο το αποπρωτεϊνικό όσο και το λιπιδικό τμήμα του μορίου. Η AGE τροποποίηση του μορίου οδηγεί σε ελαττωμένη αναγνώριση από τον LDL υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κάθαρση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και την υπενδοθηλιακή κατακράτηση των LDL. Παράλληλα, προάγεται η οξειδωτική μετατροπή τους σε oxidized LDL (oxLDL), οι οποίες φαγοκυτταρώνονται από τον εκκαθαριστικό υποδοχέα των μακροφάγων, οδηγώντας στο σχηματισμό αφρώδων κυττάρων. Τα αφρώδη κύτταρα σχηματίζουν λιποειδικές ζώνες στο αγγειακό τοίχωμα, που είναι η πρώιμη βλάβη της αθηρωμάτωσης.

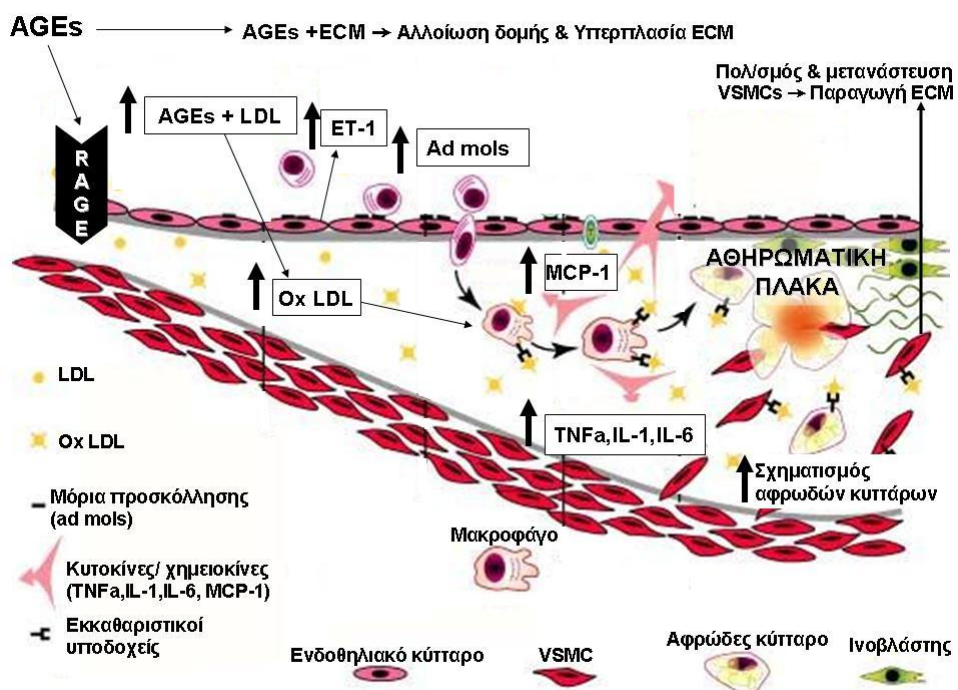
Επιπροσθέτως, τα AGEs συνδέονται με τον υποδοχέα RAGE στην επιφάνεια των κυττάρων, που συμμετέχουν στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Ο RAGE εκφράζεται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων και των λείων μυϊκών κυττάρων. Η αλληλεπίδραση των AGEs-RAGE σ' αυτά τα κύτταρα έχει τις ακόλουθες συνέπειες: α) αυξάνει το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό stress, το οποίο αναστέλλει τον αγγειοδιασταλτικό παράγοντα NO και β) επάγει τις ενδοκυτταρικές κινάσες MAPK και ERK1/2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF $\kappa$ B.

Ακολούθως, ενεργοποιούνται γονίδια που κωδικοποιούν προαθηρογόνα μόρια, όπως: i) οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 κλπ), ii) η MCP-1 που ως χημειοτακτικός παράγων προσελκύει τα μονοκύτταρα/μακροφάγα υπενδοθηλιακά, iii) τα μόρια προσκόλλησης (ICAM, VCAM), με αποτέλεσμα την προσέλκυση και προσκόλληση μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, iv) οι παράγοντες θρόμβωσης, όπως ο PAI-1, v) το αγγειοσυσπαστικό πεπτίδιο ET-1 και vi) οι αυξητικοί παράγοντες [πχ Insulin growth factor-1 (IGF-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF), κ.α.], οι οποίοι συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των λείων μυοκυττάρων, στην υπερπλασία του μυϊκού χιτώνα των αγγείων και στην επέκταση της αθηρωματικής πλάκας.

Επιπλέον, ο NF $\kappa$ B ενεργοποιεί το γονίδιο του RAGE (Li & Schmidt 1997). Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ένας αυτοανατροφοδοτούμενος κύκλος αυξημένων επιπέδων AGEs και RAGE, αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και αθηρογένεσης.

Οι σημαντικές ποσότητες αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων οδηγούν τα λειομυοκύτταρα του μέσου χιτώνα να μεταναστεύσουν στην περιοχή της βλάβης, όπου πολλαπλασιάζονται, αλλάζουν φαινότυπο και γίνονται κύτταρα που συνθέτουν θεμέλιο ουσία. Η άθροιση λειομυοκυττάρων κάτω από το ενδοθήλιο δημιουργεί την ινώδη κάψα της αθηρωματικής πλάκας. Η βλάβη επεκτείνεται περαιτέρω με τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων και των λειομυοκυττάρων, την υπερπλασία της ECM, τη διάβρωση του ενδοθηλίου, την τοιχωματική θρόμβωση και την οργάνωση του επιφανειακού θρόμβου (Goldin et al., 2006; Basta et al., 2004). Επιπλέον, οι επαγόμενες από τα AGEs αύξηση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP-9) και ελάττωση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 (MMP-2) αποσταθεροποιούν την αθηρωματική πλάκα αυξάνοντας τον κίνδυνο ρήξης της (Ishibashi et al., 2010; Furfaro et al., 2012).

**Σχήμα 14. Δράσεις των AGEs στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας**



**Σχ. 14.** Τα AGEs συνδέονται με πρωτεΐνες της ECM του αγγειακού τοιχώματος τροποποιώντας τη δομή και τις ελαστικές ιδιότητές του. Επιπλέον, δεσμεύουν τις LDL αναστέλλοντας την κάθαρσή τους, με αποτέλεσμα την συσσώρευσή τους στην υπενδοθηλιακή στιβάδα. Αυτές οι μεταβολές ευνοούν την οξειδωτική μετατροπή της LDL. Η παραγόμενη oxLDL προσλαμβάνεται από τους εκκαθαριστικούς υποδοχείς των μακροφάγων μετατρέποντάς τα σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία είναι ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός στην αθηρωματική πλάκα. Η σύνδεση των AGEs με τον RAGE οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν τους μοριακούς μεσολαβητές της αθηρογένεσης. Κατά συνέπεια, υπερπαραγονται κυτοκίνες (TNF-α, IL-1, IL-6 κλπ), χημειοκίνες όπως η MCP-1, μόρια προσκόλλησης, αγγειοσυσπαστικά πεπτίδια (ET-1), αυξητικοί παράγοντες και προθρομβωτικοί παράγοντες. Ως αποτέλεσμα, τα μακροφάγα προσελκύονται στην υπενδοθηλιακή στιβάδα, ενώ τα VSMCs πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα του αγγείου, όπου μετασχηματίζονται φαινοτυπικά (ινοβλάστες) και υπερπαραγουν αυξητικούς παράγοντες και θεμέλια ουσία. Συντομογραφίες: *ECM*: εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, *ET-1*: ενδοθηλίνη-1, *IL-1*: Ιντερλευκίνη-1, *IL-6*: Ιντερλευκίνη-6, *MCP-1*: Monocyte chemotactic protein-1, *OxLDL*: Oxidized LDL, *TNF-α*: tumor necrosis factor α, *VSMC*: λείο μυϊκό κύτταρο αγγείου.

### 3.4 Ρόλος των AGEs στις μεταβολικές διαταραχές

Πειραματικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι τα AGEs συμβάλλουν στην ινσουλινοαντίσταση στους περιφερικούς ιστούς. Αυτή η δράση των AGEs αποδίδεται εν μέρει στην ιδιότητά τους να επάγουν το οξειδωτικό stress. Ωστόσο, in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι τα AGEs και οι πρόδρομες μορφές τους (π.χ. MG, γλυκοζυλιωμένη αλβουμίνη κ.α.) δρουν άμεσα στους μοριακούς μεσολαβητές της ενδοκυττάριας οδού

της ινσουλίνης, ανεξαρτήτως του οξειδωτικού φορτίου (*Riboulet-Chavey et al., 2006; Miele et al., 2003; Cassese et al., 2008*).

Ειδικότερα, η MG φαίνεται ότι συνδέεται με το IRS-1 και προκαλεί δομικές αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης των μοριακών μεσολαβητών-κινασών, με αποτέλεσμα να διαταράσσει την ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος της ινσουλίνης. Σε καλλιέργειες γραμμωτών μυικών ινών η MG προκάλεσε χημική-δομική τροποποίηση του IRS-1 αναστέλλοντας την τυροσινική φωσφορυλίωση του IRS-1, την σύνδεσή του με την PI3K και την φωσφορυλίωση της PKB (*Riboulet-Chavey et al., 2006*).

Επιπλέον, η προσθήκη γλυκοζυλιωμένης ανθρωπίου αλβουμίνης σε καλλιέργειες γραμμωτών μυοκυττάρων και η χορήγηση πλούσιας σε AGEs δίαιτας σε επίμυς ανέστειλε τον ινσουλινοεπαγόμενο μεταβολισμό της γλυκόζης. Αυτή η δράση συνδυάστηκε με την δημιουργία συμπλέγματος των AGEs με τον RAGE και την σερινική κινάση PKCa. Η επακόλουθη εκλεκτική ενεργοποίηση της σερινικής κινάσης PKCa οδήγησε στην σερινική φωσφορυλίωση του IRS-1 και την αναστολή της μεταβολικής οδού δράσης της ινσουλίνης, χωρίς να επηρεάζει τις υπόλοιπες (μη μεταβολικές) δράσεις της ινσουλίνης (*Miele et al., 2003; Cassese et al., 2008*).

Επίσης, μελέτες σε κυτταρικές σειρές παγκρεατικών νησιδίων και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα AGEs συμβάλλουν στην έκπτωση της λειτουργικότητας του β-κυττάρου (*Sandu et al., 2005; Fiory et al., 2011*). Συγκεκριμένα, μη διαβητικοί επίμυες που τράφηκαν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε AGEs για 6 μήνες παρουσίασαν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης κατά τη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης και μεταβολές στη δομή και λειτουργία των παγκρεατικών νησιδίων σε σύγκριση με τους επίμυες που τράφηκαν με δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε AGEs (*Sandu et al., 2005*). Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν σε αρουραίους που έλαβαν μεθυλγλυοξάλη σε συνεχή έγχυση με μικροαντλία που εμφυτεύθηκε στο υποδόριο λίπος τους (*Dhar et al., 2011*).

Συνεπώς, τα AGEs φαίνεται να συμβάλλουν στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην ινσουλινοαντίσταση και πιθανόν επιδεινώνουν την ινσουλινοαντίσταση στο ΣΠΩ. Αυτές οι δράσεις σε συνδυασμό με τον προαναφερόμενο ρόλο στην διαταραχή της λειτουργικότητας του β-κυττάρου ενοχοποιούν τα AGEs στην παθογένεια του μεταβολικού συνδρόμου και του ΣΔτ2.

### **3.5 Πιθανός ρόλος των AGEs στις διαταραχές αναπαραγωγικής λειτουργίας**

Η έρευνα για τις πιθανές δράσεις των AGEs στην ωθητική βασίστηκε στα ευρήματα της μελέτης των Διαμαντή-Κανδαράκη και συνεργατών σε βιοψίες ωθηκών από υγιείς γυναίκες και γυναίκες με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis et al., 2007b*). Αυτή η μελέτη έδειξε ότι τα AGEs εναποτίθενται στον ωθηκικό ιστό, τόσο στην έσω θήκη όσο και στην κοκκιώδη στιβάδα. Επίσης, ανευρέθηκε υψηλή έκφραση RAGE στην έσω θήκη, την κοκκιώδη στιβάδα, το ενδοθήλιο και το στρώμα των ωθηκών. Επιπλέον, η εναπόθεση των AGEs ήταν μεγαλύτερη στις ωθηκές των γυναικών με ΣΠΩ συγκριτικά με τις ωθηκές υγιών γυναικών (*Diamanti-Kandarakis et al., 2007b*). Αυτά τα ευρήματα σε συνδυασμό με την ανεύρεση αυξημένων επιπέδων AGEs ορού στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis et al., 2005a*) έδωσαν τις πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή των AGEs στις διαταραχές της ωθηκικής λειτουργίας.

Ο βαθμός εναπόθεσης των AGEs στον ωθηκικό ιστό φαίνεται να εξαρτάται από την διατροφική πρόσληψη αυτών των ουσιών καθώς επίσης από τη δραστηριότητα των

ενζύμων κάθαρσης των AGEs και των δικαρβονυλίων. Όπως προαναφέρθηκε, το σύστημα GLO αποτελεί ενζυμικό σύστημα κάθαρσης της μεθυλγλυοξάλης και περιλαμβάνει τη γλυοξαλάση-I (GLO-I) και τη γλυοξαλάση-II (GLO-II). Η καταστολή της δραστηριότητας αυτών των ενζύμων οδηγεί σε συσσώρευση της μεθυλγλυοξάλης, η οποία μετατρέπεται σε AGEs.

Μελέτες σε ωθήκες επίμυων έδειξαν ότι η έκφραση και η δραστηριότητα της GLO-I μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο της ωοθυλακιογένεσης και με την ηλικία. Ειδικότερα, η έκφραση της GLO-I φαίνεται να ελαττώνεται κατά τη μετάβαση των ωοθυλακίων από το στάδιο του άντρου στο μεταωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (*Tatone et al., 2010*): Επιπλέον, η αυξημένη διατροφική πρόσληψη AGEs φαίνεται να ελαττώνει την ωοθηκική δραστηριότητα της GLO-I (*Kandaraki et al., 2012*). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι οι αρρενοποιημένοι αρουραίοι είχαν χαμηλότερα επίπεδα GLO-I συγκριτικά με τους μη αρρενοποιημένους αρουραίους, εύρημα που πιθανόν υποδηλώνει ότι τα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης αναστέλλουν την GLO-I (*Kandaraki et al., 2012*). Σε όλες τις μελέτες η ελάττωση της ωοθηκικής έκφρασης/δραστηριότητας της GLO-I συσχετίστηκε με αύξηση της τοπικής εναπόθεσης της MG και/ή των AGEs (*Tatone et al., 2010; Kandaraki et al., 2012*).

Η ωοθηκική συσσώρευση MG και AGEs φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά στην αναπαραγωγική λειτουργία και τη γονιμότητα των γυναικών. Μια αναδρομική μελέτη σε γυναίκες που υπεβλήθησαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έδειξε ότι η αύξηση των AGEs στον ορό και στο θυλακικό υγρό υποδηλώνει ωοθηκική δυσλειτουργία. Ειδικότερα, τα αυξημένα επίπεδα AGEs φαίνεται να αναστέλλουν την ωρίμανση του ωοκυττάρου, τη γονιμοποίηση και την *in vitro* ανάπτυξη του εμβρύου, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της απόπτωσης, ενώ συσχετίζονται θετικά με την ηλικία και την παχυσαρκία με τις συνοδές μεταβολικές διαταραχές (*Jinno et al., 2011*).

Πολλαπλοί μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται στις δυσμενείς ωοθηκικές και αναπαραγωγικές δράσεις των δικαρβονυλίων και των AGEs. Δεδομένου του μακρού χρόνου ημιζωής τους και της ικανότητάς τους να δρουν ως μοριακοί διαβιβαστές στις ενδοκυττάριες οδούς, τα AGEs πιθανόν συσσωρεύονται στην ωοθήκη και πυροδοτούν τις αντιδράσεις οξειδωτικού stress. Η παρατεταμένη έκθεση στα AGEs κατά την αναπαραγωγική περίοδο πιθανόν προκαλεί οξειδωτική βλάβη στα αρχέγονα ωοθυλάκια και στα αγγεία του ωοθηκικού στρώματος οδηγώντας σε αύξηση των ROS στο μικροπεριβάλλον της ωοθήκης κατά την ωοθυλακιογένεση. Παράλληλα, η MG φαίνεται να διαταράσσει την οξειδοαναγωγική ρύθμιση, τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τη δομή του DNA (*Tatone et al., 2011*). Αυτές οι μεταβολές πιθανόν διαταράσσουν το μεταβολισμό των κοκκιωδών κυττάρων της ωοθήκης, την περιοθυλακική αγγείωση, καθώς επίσης την αντιοξειδωτική άμυνα. Η αναστολή των αντιοξειδωτικών και αντι-AGE μηχανισμών φαίνεται να συντηρεί έναν ανατροφοδοτούμενο κύκλο μεταξύ του οξειδωτικού stress, των δικαρβονυλίων και των AGEs στην ωοθήκη. Επίσης, η πιθανή διαταραχή της αγγείωσης από τα AGEs πιθανόν συντελεί στην υποξία και την ελαττωμένη προσφορά ενεργειακού υποστρώματος στα ωοθυλακικά κύτταρα. Επιπλέον, τα AGEs πιθανόν επιδρούν στη σύνθεση της ECM (*Matsumine et al., 2008*) μέσω του ενζύμου lysyl oxidase (LOX) που καταλύει το σχηματισμό δεσμών κολλαγόνου και ελαστίνης στα ωοθυλάκια. Οι Papachroni και συνεργάτες έδειξαν ότι η αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου IV στις πολυκυστικές ωοθήκες (PCO) πιθανόν οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα LOX και AGEs και στην αυξημένη ενεργοποίηση του NFκB στις

PCO συγκριτικά με τις φυσιολογικές ωοθήκες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο ενεργοποιούμενος από τα AGEs NFκB προσδένεται στον προαγωγέα της LOX, υποδηλώνοντας ότι τα AGEs πιθανόν εμπλέκονται στη ρύθμιση του γονιδίου της LOX και άρα στην αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου τύπου IV στο στρώμα των PCO (Parachroni et al., 2010).

Συμπερασματικά, τα AGEs και τα πρόδρομα μόριά τους πιθανόν επιταχύνουν τις μοριακές διαταραχές, που σχετίζονται με δομικές και λειτουργικές διαταραχές των ωοθηκών. Σ' αυτές τις διαταραχές περιλαμβάνονται η πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών, η διαταραχή της στεροειδογένεσης και της ωοθυλακιογένεσης, η υπογονιμότητα και η γήρανση της ωοθήκης (Tatone et al., 2013). Η αύξηση των διατροφικά προσλαμβανόμενων AGEs αλλά και η υπερανδρογοναιμία φαίνεται να αναστέλλουν τους αποτοξινωτικούς μηχανισμούς των ωοθηκών οδηγώντας σε συσσώρευση της MG και των AGEs στις ωοθήκες.

#### **4. Φαρμακευτική παρέμβαση στο ΣΠΩ**

##### **4.1 Συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία**

##### **4.1.1 Κατηγορίες αντισυλληπτικών**

Τα ορμονικά αντισυλληπτικά δισκία ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το ορμονικό τους περιεχόμενο: τα δισκία που περιέχουν μόνο προγεσταγόνο και τα συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία. Τα συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία (ΣΑΔ) ταξινομούνται σε μονοφασικά, διφασικά και τριφασικά. Τα μονοφασικά αντισυλληπτικά δισκία έχουν σταθερή δόση των δύο ορμονών σε όλη τη διάρκεια του κύκλου. Τα διφασικά περιέχουν δύο διαφορετικές δόσεις των ορμονών, χωρισμένες σε δύο φάσεις του κύκλου, ενώ τα τριφασικά αντισυλληπτικά δισκία περιέχουν τρεις δόσεις των ορμονών, χωρισμένες σε τρεις φάσεις του κύκλου.

Τα αντισυλληπτικά δισκία που κυκλοφορούν σήμερα περιέχουν οιστρογόνο, κατά κανόνα αιθυνλική οιστραδιόλη (EE), που συνδυάζεται με διαφορετικές κατηγορίες προγεσταγόνων. Βάσει της περιεκτικότητας του οιστρογόνου τα ΣΑΔ διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: 1) τα υψηλής δόσης που περιέχουν 50 μg οιστρογόνου, 2) τα μέσης δόσης με 30-35 μg οιστρογόνου και 3) τα χαμηλής δόσης με 20 μg οιστρογόνου. Τα χαμηλής και μέσης δόσης ΣΑΔ παρουσιάζουν σε μικρότερο βαθμό τις ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τα οιστρογόνα (κεφαλαλγίες, τάση μαστών, ναυτία, αύξηση του βάρους).

Τα προγεσταγόνα που χρησιμοποιούνται στα ΣΑΔ φαίνονται στον **πίνακα 3**. Οι εστράνες και οι γονάνες είναι παράγωγα της 19-νορτεστοστερόνης. Οι εστράνες και οι 2<sup>ης</sup> γενιάς γονάνες εμφανίζουν ισχυρότερη ανδρογονική δράση συγκριτικά με τις τρίτης γενιάς γονάνες που έχουν ήπια ανδρογονική δράση. Αντιθέτως, αντιανδρογονική δράση εμφανίζουν οι πρεγνάνες, παράγωγα της 17<sup>α</sup>-υδροξυπρογεστερόνης με κυριότερο εκπρόσωπο την οξείκη κυπροτερόνη (CPA) και η δροσπιρενόνη (DRSP), παράγωγο της σπιρονολακτόνης.

Επιπλέον, οι διαφορετικές κατηγορίες προγεσταγόνων διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη συγγένειά τους με τον υποδοχέα της προγεστερόνης. Οι 3<sup>ης</sup> γενιάς γονάνες έχουν τη μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα, ενώ η δροσπιρενόνη έχει τη χαμηλότερη συγγένεια, με αποτέλεσμα να απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις της τελευταίας για την επίτευξη προγεστερονικής δράσης. Στα πλεονεκτήματα της DRSP περιλαμβάνεται η αντιαλατοκορτικοειδική δράση και η απουσία γλυκοκορτικοειδικής



δράσης. Η πρώτη οφείλεται στην δομική και λειτουργική ομοιότητα της δροσπιρενόνης με την σπιρονολακτόνη. Η αντιαλατοκορτικοειδική δράση της δροσπιρενόνης αντιρροπεί την ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης από την οιστραδιόλη, με αποτέλεσμα να προκαλεί μικρότερου βαθμού κατακράτηση νατρίου και ύδατος συγκριτικά με τα άλλα προγεσταγόνα (Muhn et al., 1995).

### Πίνακας 3. Κατηγορίες προγεσταγόνων

1 <sup>η</sup> γενιάς προγεσταγόνα Εστράνες	2 <sup>η</sup> γενιάς προγεσταγόνα Γονάνες	3 <sup>η</sup> γενιάς προγεσταγόνα Γονάνες	4 <sup>η</sup> γενιάς προγεσταγόνα	Πρεγνάνες
Νορεθινδρόλη Διοξική αιθυνυλδιόλη Διενογέστη	Λεβονοργεστρέλη Νοργεστρέλη Νοργεστιμάτη	Γεστοδένη Δεσογεστρέλη	Δροσπιρενόνη	Οξική κυπροτερόνη Οξική μεδροξυ- προγεστερόνη Οξική μεγεστρόλη

Στη θεραπευτική του ΣΠΩ χρησιμοποιούνται τα χαμηλής και μέσης δόσης μονοφασικά ΣΑΔ με τα αντιανδρογονικά προγεσταγόνα, οξική κυπροτερόνη και δροσπιρενόνη. Το σύνηθες δοσολογικό σχήμα χορήγησής τους είναι ένα δισκίο ημερησίως για τρεις εβδομάδες με διακοπή μιας εβδομάδος.

Η οξική κυπροτερόνη χορηγείται υπό μορφή ΣΑΔ που περιέχει 2 mg CPA & 35 μg EE ανά δισκίο (Gynofen 35). Η δροσπιρενόνη χορηγείται υπό μορφή ΣΑΔ σε δύο σκευάσματα με διαφορετική περιεκτικότητα EE: 1) συνδυασμός 30 μg EE και 3 μg δροσπιρενόνης ανά δισκίο (Yasmin<sup>®</sup>) και 2) συνδυασμός 20 μg EE και 3 μg δροσπιρενόνης και ανά δισκίο (Yasminelle<sup>®</sup>).

#### **4.1.2 Μηχανισμοί δράσης των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων (γενικά και στο ΣΠΩ)**

Τα ΣΑΔ αποτελούν τη συνήθη θεραπευτική προσέγγιση στις γυναίκες με ΣΠΩ για την ομαλοποίηση του εμμηνορρυσιακού κύκλου, την προστασία του ενδομητρίου και την βελτίωση των κλινικών εκδηλώσεων του υπερανδρογονισμού.

Ο βασικός μηχανισμός δράσης των ΣΑΔ είναι η αναστολή της ωοθυλακιωρρηξίας. Τα οιστρογόνα καταστέλλουν την έκκριση της FSH και την επιλογή κυρίαρχου ωοθυλακίου, ενδυναμώνουν τη δράση των προγεσταγόνων και σταθεροποιούν το ενδομήτριο. Τα προγεσταγόνα καταστέλλουν την έκκριση της LH και τις μεσοκυκλικές αιχμές των FSH και LH, καθιστούν εχθρική την τραχηλική βλέννη και παρεμποδίζουν την εμφύτευση λόγω φθαρτοποίησης του ενδομητρίου, επιβραδύνουν την κίνηση του ωαρίου, μειώνουν την κινητικότητα και γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων και την κινητικότητα των κροσσών της σάλπιγγας.

Ειδικότερα, όσον αφορά στη δράση των ΣΑΔ για την βελτίωση του κλινικού υπερανδρογονισμού στο ΣΠΩ, η ΕΕ ελαττώνει το ελεύθερο κλάσμα της τεστοστερόνης μέσω αύξησης της SHBG. Παράλληλα, το προγεσταγόνο μειώνει τα επίπεδα της ολικής τεστοστερόνης μέσω καταστολής της LH, ανταγωνίζεται την δέσμευση των ανδρογόνων στον ανδρογονικό υποδοχέα και αναστέλλει την 5<sup>α</sup> αναγωγή που καταλύει την αναγωγή της τεστοστερόνης στο δραστικό μεταβολίτη της, την DHT. Κατ'αυτόν τον τρόπο, τα ΣΑΔ βελτιώνουν την υπερτρίχωση και την ακμή.

#### **4.1.3 Μεταβολικές και καρδιαγγειακές επιπτώσεις των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων στο γενικό πληθυσμό**

Στις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες των ΣΑΔ περιλαμβάνεται η πιθανή αύξηση του κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάματα και θρομβοεμβολικά επεισόδια (*Baillargeon et al., 2005 ; Merz et al., 2006*).

Η αγωγή με ΣΑΔ αυξάνει τον κίνδυνο εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (ΕΒΦΘ), κυρίως κατά το πρώτο έτος της αντισυλληπτικής αγωγής. Παρόλο που η ελάττωση της δόσης της ΕΕ από 50μg σε 30 μg ανά δισκίο φαίνεται ότι ελαττώνει τον κίνδυνο ΕΒΦΘ, η περαιτέρω ελάττωση της δόσης της ΕΕ σε 20 μg στα νεότερα ΣΑΔ δεν φαίνεται να συνδέεται με περαιτέρω μείωση του κινδύνου ΕΒΦΘ (*Plu-Bureau et al., 2013a*). Είναι αξιοσημείωτο ότι ο εν λόγω κίνδυνος είναι μεγαλύτερος για τα 3<sup>ης</sup> γενιάς ΣΑΔ συγκριτικά με τα 2<sup>ης</sup> γενιάς ΣΑΔ (*Gerstman et al., 1991; Kemmeren et al., 2001; Martinez et al., 2012*). Συγκεκριμένα, τα ΣΑΔ που περιέχουν τα αντιανδρογονικά προγεσταγόνα DRSP και CPA φαίνεται να συνδέονται με σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο ΕΒΦΘ συγκριτικά με το 2<sup>ης</sup> γενιάς ΣΑΔ που περιέχει λεβονοργεστρέλη (*Lidegaard et al., 2011; Jick & Hernandez 2011; Sharples et al., 2011; Wu et al., 2013b*).

Επιπλέον, τα ΣΑΔ συνδέονται με αύξηση του κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων, η οποία παρατηρείται μόνο κατά τη διάρκεια της αντισυλληπτικής αγωγής και εξαφανίζεται μετά τη διακοπή της (*Plu-Bureau et al., 2013b*). Τόσο τα υψηλής όσο και τα χαμηλής δόσης ΣΑΔ έχουν συνδεθεί με αύξηση του κινδύνου για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΟΕΜ) και για ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) κατά 1,5-2 φορές. Όσον αφορά στο ΟΕΜ, τα σημαντικότερα δεδομένα προέρχονται από μια μελέτη σε 1,626,158 γυναίκες ηλικίας 15–49 ετών και η αύξηση κινδύνου φαίνεται να είναι ανεξάρτητη τόσο της δόσης της ΕΕ όσο και του είδους του προγεσταγόνου (*Lidegaard et al., 2012*). Όσον αφορά στο ΑΕΕ, τα 1ης γενιάς αντισυλληπτικά φαίνεται να συνδέονται με μεγαλύτερη αύξηση του κινδύνου συγκριτικά με τα 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς

αντισυλληπτικά. Ωστόσο, ο εν λόγω κίνδυνος βρέθηκε αυξημένος και σε γυναίκες που λάμβαναν αγωγή με το νεότερο προγεσταγόνο DRSP σε συνδυασμό με 30μg ΕΕ, συγκριτικά με τις μάρτυρες που δεν λάμβαναν καμία αγωγή. Η European Active Surveillance Study, στην οποία έλαβαν μέρος 58,674 γυναίκες για συνολικά 142,475 γυναίκες-έτη παρακολούθησης, έδειξε ότι ο κίνδυνος καρδιαγγειακής νόσου και σοβαρών καρδιαγγειακών συμβαμάτων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των γυναικών που λαμβάνουν ΣΑΔ με δροσπιρενόνη και των γυναικών που λαμβάνουν άλλα ΣΑΔ (Dinger et al., 2007).

Δεδομένου ότι η επίπτωση ισχαιμικού ΑΕΕ είναι πολύ χαμηλή σε νέες υγιείς γυναίκες χωρίς αγγειακούς παράγοντες κινδύνου, τίθεται το ερώτημα κατά πόσο η αύξηση κινδύνου που προκαλούν τα ΣΑΔ έχει κλινική σημασία. Ωστόσο, ο ρόλος των ΣΑΔ στην εμφάνιση ισχαιμικού ΑΕΕ πιθανόν γίνεται σημαντικός σε ειδικές ομάδες του πληθυσμού, όπως οι γυναίκες που πάσχουν από ημικρανία. Κλινικές μελέτες και μία μεταανάλυση έδειξαν συνεργική επίδραση της ύπαρξης ημικρανίας και της λήψης ΣΑΔ στον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικού ΑΕΕ. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτός ο κίνδυνος δεκαπλασιάζεται σε γυναίκες καπνίστριες που πάσχουν από σύνδρομο ημικρανίας με αύρα και λαμβάνουν ΣΑΔ (Schürks et al., 2009; Bousser & Kittner 2000; Bousser et al., 2000).

Η αύξηση του κινδύνου καρδιαγγειακών συμβαμάτων κατά τη λήψη ΣΑΔ αποδίδεται εν μέρει στις πιθανές δυσμενείς μεταβολικές επιδράσεις της αγωγής, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Σε μη διαβητικές γυναίκες η αντισυλληπτική αγωγή με χαμηλής και μέσης δόσης ΣΑΔ φαίνεται να προκαλεί ήπια αύξηση ή μη σημαντική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης στη νηστεία ή στη δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης (Gourdy 2013). Μεγαλύτερες δόσεις ΕΕ φαίνεται να συνδέονται με αρνητικές επιδράσεις στις γλυκαιμικές παραμέτρους και στο μεταβολισμό των υδατανθράκων (Gourdy 2013). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η βμηνη αγωγή με μέσης δόσης ΣΑΔ που περιέχουν CPA ή 3<sup>15</sup> γενιάς προγεσταγόνο επιδεινώνει την αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη, που εκτιμήθηκε με ευγλυκαιμική –υπερινσουλιναιμική αντλία (Cagnacci et al., 2009; Perseghin et al., 2001). Επιπλέον, σε 110.000 γυναίκες, που έλαβαν ΣΑΔ με υψηλή δόση οιστρογόνου, το ιστορικό λήψης ΣΑΔ συνδέθηκε με 10% μεγαλύτερο κίνδυνο για ΣΔτ2 στη 12ετή περίοδο παρακολούθησης, ανεξαρτήτως λοιπών παραγόντων κινδύνου (Rimm et al., 1992). Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί για τα νεότερα, χαμηλής και μέσης δόσης ΣΑΔ. Συνολικά, η υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν τεκμηριώνει σημαντική αύξηση του κινδύνου εμφάνισης IGT ή ΣΔτ2 στις μη διαβητικές γυναίκες που λαμβάνουν ΣΑΔ (Gourdy 2013; Lopez et al., 2012).

Η αύξηση του βάρους του σώματος αναφέρεται ως πιθανή παρενέργεια της λήψης ορισμένων από τα συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία. Πιθανοί ενεχόμενοι μηχανισμοί είναι οι ακόλουθοι:

- α) κατακράτηση υγρών λόγω της δράσης της οιστραδιόλης στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης,
- β) αύξηση της μυϊκής μάζας,
- γ) αύξηση της εναπόθεσης λίπους από την οιστραδιόλη στους μαστούς, στους γοφούς και στους μηρούς και
- δ) αύξηση της πρόσληψης τροφής λόγω των αναβολικών ιδιοτήτων των αντισυλληπτικών ή της πρόκλησης άγχους ή κατάθλιψης από το προγεσταγόνο.

Ωστόσο, τα υπάρχοντα δεδομένα από τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες είναι ανεπαρκή για να τεκμηριώσουν αύξηση του σωματικού βάρους από τη λήψη ΣΑΔ στο γενικό πληθυσμό (Gallo *et al.*, 2011). Τα διαφορετικά από του στόματος αντισυλληπτικά πιθανόν διαφέρουν ως προς την επίδρασή τους στο σωματικό βάρος, δεδομένης της διαφορετικής σύνθεσής τους ως προς την δόση της ΕΕ και το είδος του προγεσταγόνου. Αυτή η προσέγγιση θεωρείται πιθανή, αλλά απαιτούνται περισσότερες συγκριτικές μελέτες για την τεκμηρίωσή της.

Τέλος, τα ΣΑΔ επιδρούν στις λιπιδαιμικές παραμέτρους, ανάλογα με το οιστρογονικό και το προγεσταγονικό συστατικό τους (Sitruk-Ware & Nath 2013). Πιο συγκεκριμένα, τα οιστρογόνα επάγουν την ηπατική σύνθεση τριγλυκεριδίων (Sondheimer 1991) και αναστέλλουν την ηπατική λιπάση, που συμμετέχει στην απομάκρυνση της HDL-C από την κυκλοφορία (Sitruk-Ware & Nath 2013).

Αντιθέτως, τα προγεσταγόνα με ανδρογονική δράση επάγουν την ηπατική λιπάση οδηγώντας σε ελάττωση των επιπέδων της HDL. Επίσης, αυξάνουν τα επίπεδα της LDL. Τα νεότερα προγεσταγόνα, η δροσπιρενόνη και η δεσογεστρέλη, που διαθέτουν αντιανδρογονική δράση και πολύ ήπια ανδρογονική δράση, αντίστοιχα, αυξάνουν τα επίπεδα HDL ορού. Συνεπώς, φαίνεται ότι τα μικρής ανδρογονικότητας προγεσταγόνα δεν ανταγωνίζονται την δράση της ΕΕ στις λιποπρωτεΐνες και έχουν ευνοϊκότερη επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ συγκριτικά με τα προγεσταγόνα μεγαλύτερης ανδρογονικότητας (πχ λεβονογεστρέλη) (Wiegratz *et al.*, 2002; Gaspard *et al.*, 2004).

Συνολικά, τα σύγχρονα ΣΑΔ (συνδυασμός χαμηλής δόσης ΕΕ με μικρής ανδρογονικότητας ή αντιανδρογονικό προγεσταγόνο) αυξάνουν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της HDL και πιθανόν αυξάνουν ή δε μεταβάλλουν σημαντικά τα επίπεδα της LDL (Ågren *et al.*, 2011; Piltonen *et al.*, 2012).

Επιπλέον, η αγωγή με ΣΑΔ πιθανόν επάγει τη χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress. Τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν ότι τα ΣΑΔ αυξάνουν τα επίπεδα της CRP, που όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους δείκτες χρόνιας φλεγμονής και συσχετίζεται ευθέως με τον κίνδυνο οξέων στεφανιαίων επεισοδίων (Piltonen *et al.*, 2012; Krintus *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2009). Αυτή η επίδραση παρατηρείται τόσο με τα δεύτερης όσο και με τα τρίτης γενιάς ΣΑΔ ακόμα και σε μη παχύσαρκες γυναίκες (Krintus *et al.*, 2010; van Rooijen *et al.*, 2006), εμφανίζεται σύντομα μετά την έναρξη της αγωγής και είναι ανεξάρτητη της ηλικίας και παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, όπως η κεντρική παχυσαρκία, το κάπνισμα και τα επίπεδα HDL (Piltonen *et al.*, 2012; Kwok *et al.*, 2009). Η αύξηση της CRP αποδίδεται τουλάχιστον εν μέρει στο μεταβολισμό πρώτης διόδου του οιστρογονικού συστατικού του ΣΑΔ από το ήπαρ. Αυτός ο μηχανισμός πιθανόν εξηγεί και το γεγονός ότι τα επίπεδα CRP δεν επηρεάζονται από τις διακυμάνσεις των ωοθηκικών οιστρογόνων στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Wunder *et al.*, 2006) ή από τη διαδερμική ή ενδορρινική χορήγηση οιστρογόνων (Lowe *et al.*, 2001; Shifren *et al.*, 2008; Hemelaar *et al.*, 2006).

Όσον αφορά στο οξειδωτικό stress, η ΕΕ, το συνηθέστερο οιστρογονικό συστατικό των ΣΑΔ πιθανόν αυξάνει την έκφραση του RAGE, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την παραγωγή οξειδωτικού φορτίου (Σχήμα 15). Αυτή η παρατήρηση έγινε σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*. Ο πιθανός μηχανισμός αυτής της δράσης έχει ως εξής: Το οιστρογόνο συνδέεται με τον υποδοχέα estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) που με τη σειρά του συνδέεται στο μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Η επακόλουθη σύνδεση του Sp1 σε

συγκεκριμένη για τον Sp1 περιοχή του προαγωγέα του RAGE γονιδίου επάγει την έκφραση του RAGE (*Mukhopadhyay et al.,2005; Mukherjee et al.,2005*). Η δράση των οιστρογόνων στον RAGE πιθανόν διαφέρει ανάλογα με (**Σχήμα 15**):

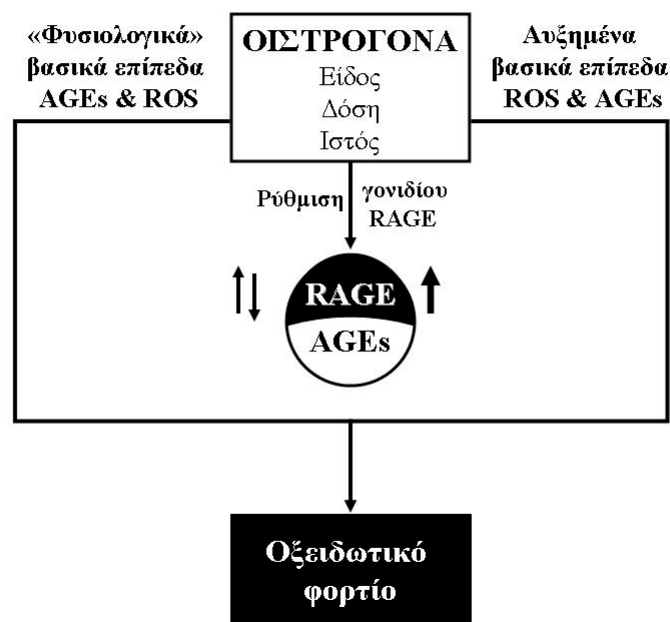
α) το είδος του οιστρογόνου (ενδογενή φυσικά οιστρογόνα πχ 17β-οιστραδιόλη (17β-E2) ή συνθετικά οιστρογόνα πχ EE),

β) τη δόση-συγκέντρωση του οιστρογόνου. Η 17β-E2 σε συγκεντρώσεις που απαντώνται στην κύηση πιθανόν επάγει τον RAGE, ενώ σε συγκεντρώσεις εντός του φυσιολογικού προεμμηνόπαυσιακού εύρους πιθανόν αναστέλλει τον RAGE (*Tanaka et al.,2000*),

γ) τον ιστό,

δ)την κατάσταση ομοιοστασίας ή την παθοφυσιολογική κατάσταση του οργανισμού (π.χ. γυναίκες με ΣΠΩ και αυξημένα επίπεδα ROS και AGEs) που καθορίζει τα ενδογενή βασικά επίπεδα οξειδωτικού φορτίου και AGEs (*Mukhopadhyay et al.,2005*).

**Σχήμα 15.**Επίδραση των οιστρογόνων στην έκφραση του RAGE και στην παραγωγή οξειδωτικού φορτίου



**Σχ.15.** Τα οιστρογόνα πιθανόν επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση του RAGE,ο οποίος με τη σειρά του αλληλεπιδρώντας με τα AGEs ενεργοποιεί τον καταρράκτη της παραγωγής οξειδωτικού φορτίου. Η επίδραση των οιστρογόνων εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωσή τους,τον ιστό όπου επιδρούν και τα ενδογενή επίπεδα ROS και AGEs του οργανισμού σε βασικές συνθήκες. Σε καταστάσεις αυξημένων ROS και AGEs το συνθετικό οιστρογόνο EE πιθανόν ενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση του RAGE. Επίσης, αυξημένες συγκεντρώσεις 17-β E2, ανάλογες με αυτές της κύησης, πιθανόν έχουν το ίδιο αποτέλεσμα. Συντομογραφίες: AGEs: Advanced glycation end products, E2: οιστραδιόλη, EE: αιθινυλοιστραδιόλη, RAGE: Receptor for AGEs, ROS: Reactive oxygen species.

Οι πιθανές επιδράσεις των ΣΑΔ στις μεταβολικές παραμέτρους, τη χρόνια φλεγμονή και τον άξονα του RAGE δυνητικά επηρεάζουν την διαδικασία της αθηρογένεσης (Soska et al., 2011). Προκλινικά δεδομένα έχουν δείξει ότι τα ανδρογονικά προγεσταγόνα, όπως η λεβονοργεστρέλη, ανταγωνίζονται την ανασταλτική δράση των οιστρογόνων στην αθηρογένεση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ προγεσταγονικών και οιστρογονικών δράσεων εξαρτάται από την σχετική ισορροπία μεταξύ της ισχύος του οιστρογόνου, των δόσεων οιστρογόνου-προγεσταγόνου και της ανδρογονικότητας του προγεσταγόνου (Manning et al., 1997).

#### **4.1.4 Μεταβολικές και καρδιαγγειακές επιπτώσεις των συνδυασμένων αντισυλληπτικών δισκίων στις γυναίκες με ΣΠΩ**

Οι μεταβολικές και καρδιαγγειακές επιπτώσεις των ΣΑΔ έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη συστηματική προσέγγιση του ΣΠΩ ως συνδρόμου που παρουσιάζει μεταβολικές συνιστώσες και συνδέεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η χρήση των αντισυλληπτικών δισκίων ως θεραπείας πρώτης γραμμής σε γυναίκες με ΣΠΩ αποτελεί πεδίο αντιπαράθεσης, αφότου έγινε αντιληπτό ότι το σύνδρομο συνοδεύεται από αντίσταση στην ινσουλίνη και μεταβολικές διαταραχές (Nader & Diamanti-Kandarakis 2007).

Συγκεκριμένα, μελέτες σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ έδειξαν ότι η αντισυλληπτική αγωγή με συνδυασμό ΕΕ-νορεθινδρόνης ή ΕΕ-CPA συνδυάστηκε με σημαντική μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, που εκτιμήθηκε με υπεργλυκαιμική ή υπερινσουλιναιμική-ευγλυκαιμική αντλία (Korytkowski et al., 1995; Dahlgren et al., 1998). Επίσης, σε παχύσαρκες γυναίκες, οι οποίες έλαβαν αγωγή με συνδυασμό ΕΕ-δεσογεστρέλης για 3-6 μήνες, διαπιστώθηκε διαταραχή στη δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης (Nader et al., 1997). Η επίδραση των ΣΑΔ στο μεταβολισμό των υδατανθράκων φαίνεται να εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τον ΔΜΣ της ασθενούς. Οι Morin-Papunen και συνεργάτες έδειξαν ότι το αντισυλληπτικό ΕΕ-CPA αύξησε το εμβαδό κάτω από την καμπύλη για τη γλυκόζη στις παχύσαρκές ασθενείς (Morin-Papunen et al., 2000), ενώ δεν επηρέασε την ανοχή στη γλυκόζη στις λεπτόσωμες ασθενείς (Morin-Papunen et al., 2003a).

Ωστόσο, σε πολλές από τις υπάρχουσες μελέτες χορηγήθηκαν αντισυλληπτικά με υψηλή περιεκτικότητα ΕΕ και προγεσταγόνα με ανδρογονική ή και γλυκοκορτικοειδική δράση. Τα ευρήματα αυτών των μελετών δεν μπορούν να στηρίξουν συμπεράσματα για τις δράσεις των νεότερων αντισυλληπτικών με χαμηλότερη δόση ΕΕ και προγεσταγόνα αντιανδρογονικής ισχύος, όπως η DRSP.

Η χορήγηση ΣΑΔ με DRSP έχει μελετηθεί ευρέως ως αγωγή για την αντιμετώπιση του κλινικού υπερανδρογονισμού στις γυναίκες με ΣΠΩ. Έξι έως δώδεκα κύκλοι αυτής της αγωγής φαίνεται να βελτιώνουν την υπερτρίχωση, ελαττώνοντας τα επίπεδα τεστοστερόνης και αυξάνοντας τα επίπεδα SHBG (Pehlivanov & Mitkov 2007; Guido et al., 2004; Batukan & Muderris 2006). Δεδομένου ότι η δροσπιρενόνη είναι ένα προγεστινοειδές που στερείται ανδρογονικής και γλυκοκορτικοειδικής δράσης, αναμένονται ευνοϊκότερες μεταβολικές επιδράσεις της δροσπιρενόνης συγκριτικά με άλλα προγεσταγόνα στις γυναίκες με ΣΠΩ.

Συγκεκριμένα, οι Guido και συνεργάτες δεν παρατήρησαν σημαντική μεταβολή της ινσουλινοευαισθησίας των γυναικών με ΣΠΩ που έλαβαν αγωγή με DRSP υπό μορφή ΣΑΔ (Guido et al., 2004), αλλά σημειώθηκε σημαντική αύξηση της ολικής

χοληστερόλης, της LDL-C, των τριγλυκεριδίων και της HDL-C (Guido et al.,2004). Ωστόσο, ο αθηρωματικός δείκτης (λόγος ολικής χοληστερόλης προς HDL-C) δε μεταβλήθηκε σημαντικά. Συνεπώς, φαίνεται ότι η εν λόγω αγωγή εμφανίζει τις συνήθειες για τα ΣΑΔ επιδράσεις στις λιπιδαιμικές παραμέτρους, αλλά οι επιδράσεις της στις λοιπές μεταβολικές παραμέτρους φαίνεται να είναι ευνοϊκότερες από τις επιδράσεις των άλλων ΣΑΔ στις γυναίκες με ΣΠΩ. Επιπλέον, οι μεταβολές των λιπιδαιμικών παραμέτρων πιθανόν δεν έχουν σημαντική αθηρογόνο επίδραση,εφόσον ο αθηρωματικός δείκτης διατηρείται σε σταθερά επίπεδα (Guido et al.,2004).

Ωστόσο, οι υπάρχουσες μελέτες έχουν γίνει ως επί το πλείστον σε μικρούς αριθμούς ασθενών,παρουσιάζουν διαφορές ως προς τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού και της χορηγούμενης αγωγής και έχουν δώσει ετερογενή αποτελέσματα.Μια πρόσφατη μεταανάλυση των σχετικών μελετών έδειξε ότι η αγωγή με ΣΑΔ συσχετίζεται με αύξηση της HDL-C και των τριγλυκεριδίων σε ασθενείς με ΣΠΩ (Halperin et al.,2011). Αυτή η μεταανάλυση συμπεριέλαβε προοπτικές μελέτες παρατήρησης και τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες σε έφηβες και προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ΣΠΩ που έλαβαν ΣΑΔ για τουλάχιστον τρεις μήνες. Ωστόσο, διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια ως προς τις επιδράσεις των ΣΑΔ σε όλες τις μεταβολικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, HDL-C, LDL-C, τριγλυκεριδίων και δεικτών ινσουλινοαντίστασης. Η εν λόγω ετερογένεια αποδίδεται τουλάχιστον εν μέρει στις διαφορές των μελετών ως προς τη διάρκεια της αντισυλληπτικής αγωγής, τον δείκτη μάζας σώματος και την ηλικία των υπό μελέτη ασθενών (Halperin et al., 2011 ).

Συνεπώς, τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ετερογενείς μεταβολικές επιδράσεις των ΣΑΔ στις γυναίκες με ΣΠΩ που εξαρτώνται από τον τύπο του ΣΑΔ και τα χαρακτηριστικά των ασθενών. Δυσμενέστερες μεταβολικές επιδράσεις πιθανόν παρατηρούνται όταν η ασθενής είναι παχύσαρκη και/ή λαμβάνει ΣΑΔ με υψηλή δόση οιστρογόνου ή ανδρογονικό προγεσταγόνο (Diamanti Kandarakis & Nader 2007).

Όσον αφορά στις πιθανές επιπτώσεις των ΣΑΔ ως προς την καρδιαγγειακή νοσηρότητα των γυναικών με ΣΠΩ, τα δεδομένα είναι ανεπαρκή. Ωστόσο, υπάρχουν σαφή δεδομένα ότι η λήψη ΣΑΔ αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο φλεβικών θρομβοεμβολικών επεισοδίων σε γυναίκες με ΣΠΩ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του ΣΠΩ αυξάνει τον κίνδυνο φλεβικών θρομβοεμβολών κατά έναν συντελεστή 1,5 στις ασθενείς που δε λαμβάνουν ΣΑΔ, ενώ διπλασιάζει τον κίνδυνο στις ασθενείς που λαμβάνουν ΣΑΔ (Bird et al.,2013). Συνεπώς, η λήψη ΣΑΔ φαίνεται να αποτελεί έναν επιπρόσθετο παράγοντα κινδύνου στις γυναίκες με ΣΠΩ που έχουν ήδη αυξημένο κίνδυνο για θρομβοεμβολικά επεισόδια.

Συμπερασματικά, στις ασθενείς με ΣΠΩ και αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο συνιστάται προσεκτική επιλογή του ΣΑΔ και παρακολούθηση του προφιλ καρδιαγγειακού κινδύνου κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι Nader και Diamanti-Kandarakis πρότειναν μια κατάταξη των ασθενών με ΣΠΩ με βάση το μεταβολικό φαινότυπο και την εκτιμώμενη ινσουλινοευαισθησία τους. Αυτή η κατάταξη περιλαμβάνει τέσσερις κατηγορίες ασθενών που αναμένεται να έχουν διαφορετική μεταβολική απάντηση στην αντισυλληπτική αγωγή (Nader and Diamanti-Kandarakis 2007). Στην πρώτη και δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι λεπτόσωμες ασθενείς με φυσιολογική ευαισθησία στην ινσουλίνη και οι λεπτόσωμες ή υπέρβαρες ασθενείς με σχεδόν φυσιολογική ή ήπια διαταραγμένη ινσουλινοευαισθησία, αντίστοιχα .Σ' αυτές τις

ασθενείς τα ΣΑΔ μπορεί να έχουν ωφέλιμες ή ουδέτερες μεταβολικές επιδράσεις διορθώνοντας την υπερανδρογοναιμία τους που είναι ο κύριος επιβαρυντικός μεταβολικός παράγων. Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν υπέρβαρες γυναίκες με μετρίου βαθμού ινσουλινοαντίσταση, οι οποίες μπορεί να παρουσιάσουν μεταβολική επιδείνωση με την αντισυλληπτική αγωγή. Τέλος ,η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει παχύσαρκες ασθενείς με σοβαρού βαθμού ινσουλινοαντίσταση ή και ΣΔτ2, στις οποίες η χορήγηση ΣΑΔ θα πρέπει να αποφεύγεται λόγω των δυσμενών μεταβολικών συνεπειών τους (Nader and Diamanti-Kandarakis 2007).

Συνοπτικά,η αγωγή με ΣΑΔ στις γυναίκες με ΣΠΩ προαπαιτεί διαστρωμάτωση του καρδιαγγειακού κινδύνου και επιλογή της προτιμητέας κατηγορίας ΣΑΔ. Στις ασθενείς χωρίς μεταβολικές διαταραχές προτιμώνται τα δεύτερης γενιάς ΣΑΔ λόγω του μικρότερου κινδύνου φλεβικών θρομβοεμβολών έναντι των τρίτης γενιάς δισκίων. Στις ασθενείς με διαταραχές λιπιδίων ή διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη πιθανόν θα πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση ΣΑΔ. Ωστόσο ,αν η αντισυλληπτική αγωγή κρίνεται σκόπιμη, προτιμώνται τα τρίτης γενιάς προγεσταγόνα λόγω των λιγότερο δυσμενών μεταβολικών επιδράσεών τους συγκριτικά με τα δεύτερης γενιάς προγεσταγόνα. Σε περίπτωση επιδείνωσης των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου συνιστάται διακοπή ή τροποποίησή της αγωγής.

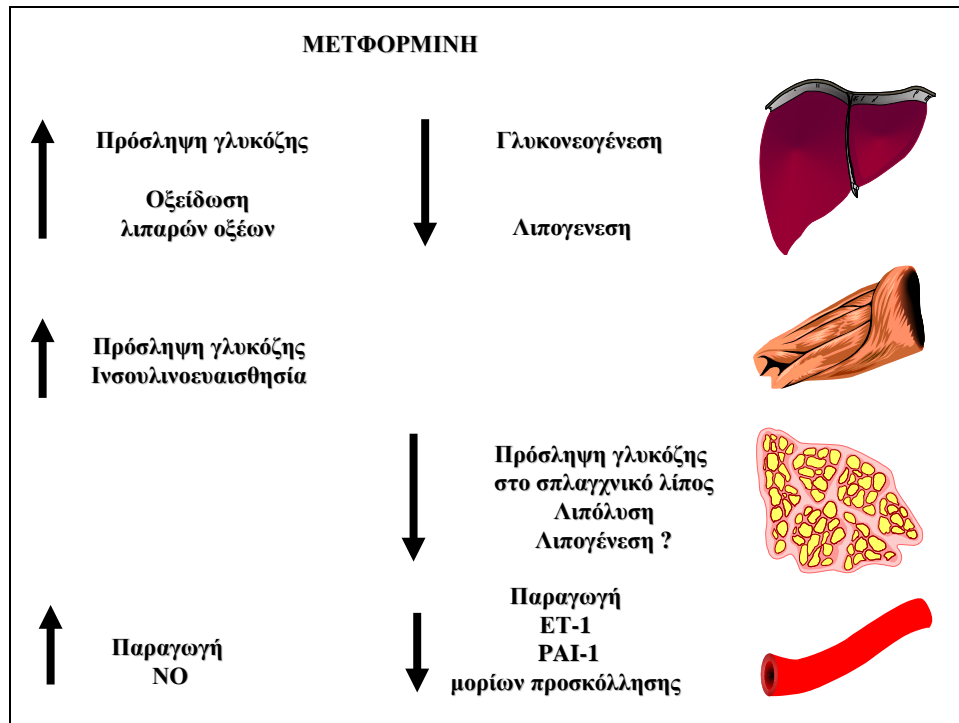
## **4.2 Μεθορμίνη**

### **4.2.1 Μηχανισμοί δράσης μεθορμίνης**

Η Μεθορμίνη είναι το κυριότερο διγουανιδίο με δράση ινσουλινοευαισθητοποιητή που χορηγείται ευρύτατα για τη θεραπεία του ΣΔτ2. Η κυριότερη δράση της είναι η αναστολή της ηπατικής νεογλυκογένεσης. Επιπλέον, η μεθορμίνη ασκεί πολλαπλές δράσεις στο μυϊκό ιστό ,το λιπώδη ιστό και το ενδοθήλιο (**Σχήμα 16**). Κατ'αυτόν τον τρόπο, η μεθορμίνη φαίνεται να βελτιώνει την ινσουλινοευαισθησία των ιστών και ελαττώνει τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και μεταγευματικά στους ασθενείς με ΣΔτ2.



**Σχήμα 16.** Δράσεις της μετφορμίνης στο ήπαρ, τους μυς, το λίπος και το ενδοθήλιο.



Συντομογραφίες : *ET-1*: Ενδοθηλίνη-1, *NO*: μονοξείδιο του αζώτου, *PAI-1* : ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου

#### 4.2.1.1 Δράση στους ιστούς-στόχους της ινσουλίνης: Ήπαρ, σκελετικοί μύες και λιπώδης ιστός

Η αναστολή της ηπατικής γλυκονεογένεσης από τη μετφορμίνη αποδίδεται σε πολλαπλούς μηχανισμούς και ειδικότερα, την αναστολή των ενζύμων της γλυκονεογένεσης, την ελάττωση της ηπατικής πρόσληψης του υποστρώματος για τη γλυκονεογένεση, την αυξημένη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης και των IRS- 1 και 2. Επίσης, η μετφορμίνη διεγείρει την είσοδο της γλυκόζης στο ήπαρ και τη γλυκόλυση μέσω ενεργοποίησης των γλυκολυτικών ενζύμων, όπως η γλυκοκινάση και η πυροσταφυλική κινάση (Goodarzi and Bryer-Ash 2005; Diamanti-Kandarakis et al., 2010).

Η αύξηση της ινσουλινοεπαγόμενης εισόδου της γλυκόζης στο ήπαρ έχει επιβεβαιωθεί από κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ΣΔτ2 υπό αγωγή με μετφορμίνη (Iozzo et al., 2003). Η ταυτόχρονη αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από τα σπλαγχνικά λιποκύτταρα πιθανόν επάγει την εστεροποίηση των FFAs μέσω αυξημένης γλυκολυτικής παραγωγής φωσφορικής γλυκερόλης. Η αυξημένη εστεροποίηση των FFAs στο σπλαγχνικό λίπος αναστέλλει τη λιπόλυση και τη μεταφορά FFAs στο ήπαρ, πιθανόν ελαττώνοντας την ηπατική γλυκονεογένεση (Iozzo et al., 2003).

Επιπλέον, η μετφορμίνη αναστέλλει την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACC) (Ashokkumar and Pari 2005; Zang et al., 2004; Cleasby et al., 2004), το κύριο ένζυμο-καταλύτη της σύνθεσης του μαλονυλ-συνενζύμου Α (μαλονυλCoA), που με τη σειρά του είναι πρόδρομο μόριο των λιπαρών οξέων και ισχυρός αναστολέας της μιτοχονδριακής

οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Η αναστολή της ACC ελαττώνει τα επίπεδα του μαλονυλ-CoA, οδηγώντας σε ελαττωμένη σύνθεση και αυξημένη μιτοχondριακή οξειδωση των λιπαρών οξέων. Ως αποτέλεσμα, ελαττώνεται η ενδοκυτταρική συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα, αναστέλλεται η ηπατική στεάτωση και ελαττώνονται τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα (Viollet *et al.*, 2006).

Η 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) φαίνεται να είναι ο κύριος μοριακός μεσολαβητής των δράσεων της μετορμίνης στην ηπατική γλυκονεογένεση και λιπογένεση (Cleasby *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2005).

Οι σκελετικοί μύες και ο λιπώδης ιστός δεν αποτελούν τους βασικούς ιστούς-στόχους της μετορμίνης. Ωστόσο, οι δράσεις του φαρμάκου σ' αυτούς τους ιστούς πιθανόν έχουν ενδιαφέρον λόγω του σημαντικού ρόλου τους στις ινσουλινοεξαρτώμενες και ινσουλινοανεξάρτητες μεταβολικές διεργασίες (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2010).

Πειραματικά δεδομένα σε καλλιέργειες γραμμωτών μυϊκών ινών έχουν δείξει ποικίλες δράσεις της μετορμίνης στην ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος της ινσουλίνης και την επακόλουθη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα. Ωστόσο, πολλά από αυτά τα δεδομένα δεν επιβεβαιώθηκαν σε κλινικές μελέτες (Kim *et al.*, 2002), γεγονός που αποδίδεται κυρίως στις πολλαπλάσιες δόσεις μετορμίνης που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* μελέτες συγκριτικά με τις θεραπευτικές δόσεις που χορηγήθηκαν στις *in vivo* μελέτες. Ωστόσο, η μετορμίνη χορηγούμενη σε θεραπευτικές δόσεις (20  $\mu\text{mol/l}$ ) φαίνεται να διατηρεί ορισμένες δράσεις «ινσουλινοευαισθητοποιητή» σε καλλιέργειες ανθρώπων μυϊκών ινών, όπως η αύξηση της ινσουλινοεπαγόμενης σύνθεσης γλυκογόνου (Al-Khalili *et al.*, 2005).

Επιπλέον, η μετορμίνη επιδρά στο μεταβολισμό των λιπιδίων στους γραμμωτούς μυς και συγκεκριμένα, φαίνεται να αναστέλλει την ιστική συσσώρευση λιπιδίων, όπως έχει δειχθεί σε βιοψίες γραμμωτών μυοκυτάρων από ασθενείς με ΣΔτ2 και από θηλυκούς διαβητικούς αρουραίους που έλαβαν πλούσια σε λίπος δίαιτα (Smith *et al.*, 2007; Mathieu-Costello *et al.*, 2003). Επιπλέον, πειραματικές μελέτες σε τρωκτικά έδειξαν ότι η μετορμίνη αναστέλλει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων σε τριακυλγλυκερόλη στις γλυκολυτικές μυϊκές ίνες, ενώ ανταγωνίζεται την ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην οξειδωση των λιπαρών οξέων στις οξειδωτικές μυϊκές ίνες (Collier *et al.*, 2006).

Συμπερασματικά, η μετορμίνη φαίνεται να ελαττώνει τη γλυκοτοξικότητα και τη λιποτοξικότητα πιθανόν συμβάλλοντας στην βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας στους γραμμωτούς μυς. Επίσης, πιθανόν επάγει την ινσουλινοανεξάρτητη ενδοκυττάρια είσοδο γλυκόζης μέσω ενεργοποίησης της AMPK (Σχήμα 16) (Musi *et al.*, 2002; Zou and Wu 2008).

Στο λιπώδη ιστό οι δράσεις της μετορμίνης φαίνεται να διαφέρουν ανάμεσα στο σπλαγχνικό και το υποδόριο διαμέρισμα. Συγκεκριμένα, η μετορμίνη φαίνεται να αυξάνει την ενδοκυττάρια πρόσληψη γλυκόζης στο σπλαγχνικό λίπος, ενώ δεν έχει αποδειχθεί σημαντική δράση της στη μεταφορά γλυκόζης στον υποδόριο λιπώδη ιστό (Iozzo *et al.*, 2003; Lenhard *et al.*, 1997; Ciaraldi *et al.*, 2002; Virtanen *et al.*, 2002).

Επιπλέον, η μετορμίνη φαίνεται να αναστέλλει την επαγόμενη από κυτοκίνες λιπόλυση, πιθανόν συντελώντας στην αύξηση της ινσουλινοευαισθησίας του λιπώδους ιστού μέσω της ελάττωσης των κυκλοφορούντων FFAs (Ren *et al.*, 2006). Ωστόσο, η δράση της μετορμίνης στη λιπογένεση παραμένει αμφιλεγόμενη λόγω της ασυμφωνίας μεταξύ των ευρημάτων από *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Σχήμα 16). Παρότι πειραματικά

δεδομένα έδειξαν αναστολή της λιπογένεσης μέσω της AMPK (Alexandre et al.,2008), βιοψίες υποδόριου λίπους από ασθενείς με IGT δεν έδειξαν σημαντική επίδραση της μετορμίνης στην γονιδιακή έκφραση των λιπογενετικών ενζύμων (Ranganathan et al., 2006). Ομοίως, οι περισσότερες μελέτες σε ασθενείς με IGT ή ΣΔτ2 δεν έδειξαν σημαντική επίδραση της μετορμίνης στην μάζα του σπλαγχνικού λίπους (Rasouli et al., 2005; Seufert et al., 2004).

Σε μοριακό επίπεδο, η ενεργοποίηση της AMPK φαίνεται να διαμεσολαβεί εν μέρει τις δράσεις της μετορμίνης στο λιπώδη ιστό, όπως και σε άλλους ιστούς (Habinowski and Witters 2001; Salt et al.,2000; Gaidhu et al.,2006; Yamaguchi et al.,2005).

#### 4.2.1.2 Δράση στο ενδοθήλιο

Η βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης με τη χορήγηση μετορμίνης οδηγεί σε παράλληλη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας και συγκεκριμένα βελτιώνει την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή (Muniyappa et al., 2007).

Επιπλέον, η μετορμίνη φαίνεται να έχει θετικές επιδράσεις στο ενδοθήλιο, ανεξαρτήτως της δράσης της ως ινσουλινοευαισθητοποιητή. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων από ανθρώπους και πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η μετορμίνη επάγει την ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO (eNOS), εμποδίζει την κυτταρική απόπτωση που επάγεται από την υπεργλυκαιμία και αναστέλλει την επαγωγή του NFκB από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Davis et al., 2006; Demaille et al., 2005; Hattori et al., 2006). Ως αποτέλεσμα, η μετορμίνη φαίνεται να ελαττώνει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες φλεγμονής και μόρια προσκόλλησης (Σχήμα 16) (Hattori et al., 2006; Huang et al., 2009). Η AMPK φαίνεται να διαμεσολαβεί τη δράση της μετορμίνης στο ενδοθήλιο, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της eNOS και της αναστολής του NF-κB (Davis et al., 2006; Hattori et al.,2006).

#### 4.2.1.3 Δράση στους μηχανισμούς φλεγμονής και γλυκοξειδωσης

Όπως προαναφέρθηκε, η χορήγηση μετορμίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλει την ενεργοποίηση του NFκB. Μ' αυτό το μηχανισμό, η μετορμίνη μπορεί να ελαττώνει τα επίπεδα οξειδωτικού φορτίου και να αναστέλλει την γονιδιακή έκφραση των κυτοκινών TNF-α, IL-6, IL-1 κλπ (Hattori et al.,2006; Huang et al.,2009). Η αποτελεσματικότητα της μετορμίνης στην αναστολή της παραγωγής TNF-α επιβεβαιώθηκε και σε καλλιέργεια ανθρώπινων μονοκυττάρων (Arai et al., 2010).

Επιπλέον, η μετορμίνη φαίνεται ότι ελαττώνει τα επίπεδα των δραστικών AGEs ή/και αναστέλλει τις δράσεις τους. Σε ασθενείς με ΣΔτ2 η μετορμίνη ελαττώνει τα επίπεδα μεθυλγλυοξάλης και AGEs (Beisswenger et al., 1999), ενώ αναστέλλει την AGE-επαγόμενη οξειδωτική βλάβη στο αποπρωτεϊνικό τμήμα της LDL (Rabbani et al., 2010). Όσον αφορά στους υποκείμενους μηχανισμούς, αφενός η μετορμίνη αντιδρά με τα AGEs στον εξωκυττάριο χώρο σχηματίζοντας αδρανή προϊόντα συμπύκνωσης που ανιχνεύονται στα ούρα (Beisswenger and Ruggiero-Lopez 2003). Αφετέρου, η μετορμίνη φαίνεται να διασπά τους διασταυρούμενους δεσμούς (cross-links) των AGEs με τις πρωτεΐνες. Αυτές οι δράσεις φαίνεται να είναι ανεξάρτητες από τις μεταβολές που προκαλεί η μετορμίνη στα επίπεδα γλυκόζης, στην ενδοκυττάρια οδό της ινσουλίνης και στη χρόνια φλεγμονή (Beisswenger and Ruggiero-Lopez 2003, Tanaka et al.,1997; Tanaka et al.,1999).

Συνεπώς, φαίνεται ότι η μεταφορμίνη έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις, ενώ αναστέλλει τα μονοπάτια της γλυκοζυλίωσης δρώντας σε πολλαπλά μοριακά επίπεδα και σε πολλαπλούς ιστούς.

## **4.2.2 Δράσεις της μεταφορμίνης στο ΣΠΩ**

### **4.2.2.1 Μεταβολικές και καρδιαγγειακές δράσεις**

Οι δράσεις της μεταφορμίνης στους ιστούς-στόχους της ινσουλίνης αλλά και σε οδούς ανεξάρτητες της ινσουλίνης συντελούν στις ευεργετικές μεταβολικές συνέπειες της στις ασθενείς με ΣΠΩ. Μελέτες σε βιοψίες υποδόριου λίπους έδειξαν ότι η μεταφορμίνη βελτιώνει σημαντικά την ιστική ινσουλινοαντίσταση μέσω αυξημένης έκφρασης των GLUT-4, η οποία ήταν αρχικά ελαττωμένη στις γυναίκες με ΣΠΩ συγκριτικά με τις υγιείς μάρτυρες (*Jensterle et al., 2008*).

Βελτιώνοντας την ινσουλινοαντίσταση η μεταφορμίνη φαίνεται να βελτιώνει πολλές από τις διαταραχές του Μεταβολικού Συνδρόμου στις γυναίκες με ΣΠΩ. Μια μεταανάλυση τυχαιοποιημένων μελετών έδειξε ότι η μεταφορμίνη ελαττώνει τα επίπεδα της LDL-C σ' αυτόν τον πληθυσμό (*Lord et al., 2003*). Μεταγενέστερες μελέτες σε υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ έδειξαν ότι 3-6 μήνες αγωγής με μεταφορμίνη ελαττώνουν την ολική χοληστερόλη, την LDL-C (*Harborne et al., 2005; Lord et al., 2006b*), καθώς επίσης τα επίπεδα προαθηρογόνων και προθρομβωτικών μορίων, όπως η CRP, ο PAI-1 και τα μόρια προσκόλλησης (*Diamanti-Kandarakis et al., 2006; Orio et al., 2007; Morin-Papunen et al., 2003b; Velazquez et al., 1997*), ενώ αυξάνουν την HDL-C (*Trolle et al., 2007*).

Επιπλέον, η μεταφορμίνη ελαττώνει τα επίπεδα των AGEs (*Diamanti-Kandarakis et al., 2007c*), που είναι αυξημένα τόσο στις λεπτόσωμες όσο και στις παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis et al., 2005a; Diamanti-Kandarakis et al., 2008*). Αυτή η δράση αποδίδεται εν μέρει στη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης, εφόσον η ινσουλίνη επάγει την PI3K-εξαρτώμενη ενδοκυτταρική πρόσληψη και κάθαρση των AGEs μέσω του Macrophage scavenger receptor (*Sano et al., 1998*). Εξάλλου, η μεταφορμίνη φαίνεται να αντιδρά άμεσα με τα AGEs εξωκυτταρικά σχηματίζοντας αδρανή προϊόντα, ενώ διασπά τους διασταυρούμενους δεσμούς των AGEs με τις πρωτεΐνες αναστέλλοντας τις διαδικασίες της γλυκοζυλίωσης (*Beisswenger and Ruggiero-Lopez 2003, Tanaka et al., 1997; Tanaka et al., 1999*). Δεδομένου ότι τα AGEs είναι αυξημένα στον ορό και στις ωθήκες των γυναικών με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis et al., 2005a; Diamanti-Kandarakis et al., 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2007b*), η συμβολή της μεταφορμίνης στην ελάττωση της παραγωγής ή στην αύξηση της κάθαρσης των AGEs μπορεί να συντελεί στις θεραπευτικές δράσεις της στο ΣΠΩ.

Η δράση της μεταφορμίνης ως ινσουλινοευσθητοποιητή σε συνδυασμό με την ανασταλτική δράση της στη χρόνια φλεγμονή και τη συσσώρευση των AGEs πιθανόν συμβάλλουν στην βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας στις ασθενείς με ΣΠΩ. Ειδικότερα, οι ασθενείς με ΣΠΩ, που λαμβάνουν το φάρμακο, παρουσιάζουν βελτίωση τόσο των δοκιμασιών όσο και των εργαστηριακών δεικτών της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Ενδεικτικές είναι η αύξηση της εξαρτώμενης από τη ροή διαστολής (*flow-mediated dilatation, FMD*) της βραχιονίου αρτηρίας και η ελάττωση των επιπέδων ET-1 μετά από έξι μήνες αγωγής με μεταφορμίνη στις γυναίκες με ΣΠΩ. Αυτές οι επωφελείς δράσεις έχουν διαπιστωθεί τόσο σε λεπτόσωμες όσο και σε παχύσαρκες ασθενείς (*Romualdi et al., 2008; Diamanti-Kandarakis et al., 2005b; Orio et al., 2005; Diamanti-*

*Kandarakis et al.,2001*). Επιπλέον, τόσο η στεφανιαία εφεδρεία όσο και η στεφανιαία μικροαγγειακή λειτουργία, που εκτιμήθηκαν με διαθωρακική Doppler υπερηχοκαρδιογραφία, βελτιώθηκαν σημαντικά μετά από 6μηνη αγωγή με μετορμίνη στις ασθενείς με ΣΠΩ (*Torcu et al., 2006* ). Αυτά τα δεδομένα πιθανόν υποδηλώνουν ένα σημαντικό καρδιαγγειακό όφελος της αγωγής με μετορμίνη,εφόσον οι προαναφερθείσες παράμετροι θεωρούνται ευαίσθητοι προγνωστικοί δείκτες της καρδιαγγειακής νόσου (*Bonetti et al., 2003; Britten et al.,2004*).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι παθοφυσιολογικά συνδεδεμένη με την ινσουλινοαντίσταση, η μετορμίνη διατηρεί την αποτελεσματικότητά της στην βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας ακόμα και σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ χωρίς εμφανή ινσουλινοαντίσταση (*Romualdi et al.,2008*). Συνεπώς, φαίνεται ότι οι ενδοθηλιακές δράσεις της μετορμίνης είναι εν μέρει ανεξάρτητες της βελτίωσης της ινσουλινοαντίστασης σε επίπεδο ενδοθηλίου.

Στις πιθανές ινσουλινοανεξάρτητες δράσεις της μετορμίνης στο ενδοθήλιο μπορεί να ενέχονται άλλοι μηχανισμοί, όπως η ελάττωση των επιπέδων AGEs (*Diamanti-Kandarakis et al.,2007c*) και της χρόνιας φλεγμονής, αλλά και η βελτίωση της υπερανδρογοναιμίας. Ως προς τη χρόνια φλεγμονή, η μετορμίνη φαίνεται να ελαττώνει τα επίπεδα της χρόνιας φλεγμονής ακόμα και σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ,χωρίς εμφανείς μεταβολικές διαταραχές (*Orio et al.,2007*).

Ως προς τη σχέση υπερανδρογοναιμίας και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας,πολλές κλινικές μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ έχουν δείξει ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης ορού συσχετίζονται με δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (*Paradisi et al.,2001; Kravariti et al.,2005; Orio et al.,2004*). Δεδομένα σ'αυτόν τον πληθυσμό έδειξαν ότι η μετορμίνη ελαττώνει τα επίπεδα της ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (asymmetric dimethylarginine , ADMA), που είναι ενδογενής αναστολέας της συνθέσεως του NO, και αυτή η δράση συσχετίζεται με την παράλληλη βελτίωση τόσο της ινσουλινοευσαιθησίας όσο και της υπερανδρογοναιμίας (*Ozgurtas et al.,2008*).

Επιπλέον,σε τυχαιοποιημένες μελέτες σύγκρισης της μετορμίνης με placebo σε διαβητικούς τύπου 2 και σε μη διαβητικές γυναίκες παρατηρήθηκε μια πιθανή άμεση δράση του φαρμάκου στο ενδοθήλιο, ανεξαρτήτως των μεταβολών της ινσουλίνης, του σωματικού βάρους και των δεικτών φλεγμονής (*De Jager et al.,2005; Jadhav et al.,2006*). Αυτή η δράση πιθανόν αποδίδεται στην ιδιότητα της μετορμίνης να ενεργοποιεί την AMPK, η οποία φωσφορυλιώνει την ενδοθηλιακή συνθέταση του NO στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (*Davis et al.,2006; Morrow et al.,2003*).

#### **4.2.2.2 Δράσεις στις ενδοκρινικές και αναπαραγωγικές διαταραχές**

Το θεραπευτικό φάσμα της μετορμίνης στο ΣΠΩ περιλαμβάνει τις δράσεις του φαρμάκου στις ενδοκρινικές και αναπαραγωγικές διαταραχές που χαρακτηρίζουν το σύνδρομο. Στις γυναίκες με ΣΠΩ έχει δειχθεί ότι η αγωγή με μετορμίνη βελτιώνει την ωοθυλακιορρηξία, τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, ενώ ελαττώνει τα ανδρογόνα (*Velazquez et al.,1994; Diamanti-Kandarakis et al.,1998; Nestler 2008*). Αυτές οι μεταβολές είτε αποδίδονται στην επίδραση της μετορμίνης στην ινσουλινοαντίσταση είτε οφείλονται σε άμεσες δράσεις του φαρμάκου στην ωοθηλική λειτουργία.

Συγκεκριμένα, βελτιώνοντας την ινσουλινοαντίσταση και ελαττώνοντας την υπερινσουλιναίμια η μετορμίνη αναστέλλει το διεγερτικό ερέθισμα της ινσουλίνης στην ωοθηλική παραγωγή ανδρογόνων. Βάσει πειραματικών δεδομένων η ινσουλίνη φαίνεται

να διεγείρει άμεσα πολλά από τα στεροειδογενετικά ένζυμα της έσως θήκης και της κοκκιώδους στιβάδας (**Σχήμα 4**), συμπεριλαμβανόμενων της P450c17, της 3β-HSD και της StAR.

Κλινικές μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ έδειξαν ότι η μετορμίνη αναστέλλει το διπλό ένζυμο CYP17 με δραστηριότητα 17<sup>α</sup>-υδροξυλάσης και 17-20 λυάσης. Αυτή η παρατήρηση αποδίδεται εν μέρει στην ελάττωση της υπερινσουλιαιμίας (*Nestler και Jakubowicz 1996; Diamanti-Kandarakis and Papavasiliou 2006*) και εν μέρει στις άμεσες δράσεις της μετορμίνης στα ένζυμα της ωθηκικής στεροειδογένεσης, συμπεριλαμβανομένων των CYP17 και 3βHSD (*Attia et al.,2001; Mansfield et al.,2003; Tosca et al.,2006; Hirsch et al.,2012*).

Επιπλέον, η υπερινσουλιαιμία επάγει την έκφραση των υποδοχέων LH στα κοκκιώδη κύτταρα (**Σχήμα 4**) και άρα, η ελάττωση της υπερινσουλιαιμίας μέσω της μετορμίνης αίρει το ερέθισμα για την πρώιμη και υπέρμετρη έκφραση των υποδοχέων LH. Ως αποτέλεσμα η μετορμίνη πιθανόν αναστέλλει την πρώιμη ωχρινοποίηση βελτιώνοντας την ωοθυλακιορρηξία στο ΣΠΩ (*Poretsky et al.,1999*).

Ειδικότερα, η αγωγή με μετορμίνη βελτιώνει τα ποσοστά ωοθυλακιορρηκτικών κύκλων στις γυναίκες με ΣΠΩ είτε ως μονοθεραπεία συγκριτικά με placebo είτε ως προσθήκη στην αγωγή με κιτρική κλομιφαίνη (CC) έναντι της μονοθεραπείας με CC (ανασκόπηση από *Diamanti-Kandarakis et al., 2010; Lord et al., 2003*).

Η πιο πρόσφατη Cochrane μετα-ανάλυση έδειξε ότι η προσθήκη μετορμίνης στην κλασική αγωγή πρόκλησης ωορρηξίας βελτιώνει το ποσοστό κυήσεων ,αλλά όχι το ποσοστό γέννησης ζωντανών νεογνών (live birth rate ,LBR) (*Tang et al.,2012*). Ωστόσο, η προθεραπεία με μετορμίνη για τρεις μήνες πριν την πρόκληση ωορρηξίας και η συνέχισή της παράλληλα με την αγωγή πρόκλησης ωορρηξίας μέχρι και την δωδέκατη εβδομάδα της κύησης βελτίωσε σημαντικά το LBR στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Morin-Papunen et al.,2013*). Το όφελος από τη χορήγηση μετορμίνης έναντι placebo ήταν μεγαλύτερο στις παχύσαρκες γυναίκες με ΣΠΩ (*Morin-Papunen et al.,2013*). Επιπλέον,η μετορμίνη πιθανόν υπερέχει της CC στις μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες με ΣΠΩ που εμφανίζουν σπλαγγνική παχυσαρκία (*Moll et al.,2008*). Συνεπώς, η μετορμίνη προσφέρει όφελος στις γυναίκες με ΣΠΩ που επιθυμούν τεκνοποίηση, με την προϋπόθεση ότι η αγωγή θα ληφθεί για μακρό χρονικό διάστημα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στον μηχανισμό δράσης της μετορμίνης,δεδομένου ότι τουλάχιστον έξι μήνες αγωγής είναι απαραίτητοι, προκειμένου να επιτευχθεί ελάττωση της υπερινσουλιαιμίας και επακόλουθη βελτίωση των παραμέτρων της αναπαραγωγικής λειτουργίας. Στον υποκείμενο μηχανισμό δράσης της μετορμίνης ενέχεται η προκαλούμενη αύξηση της έκφρασης GLUT-4 στο ενδομήτριο των υπερινσουλιαιμικών γυναικών με ΣΠΩ,η οποία είναι αρχικά ελαττωμένη. Αυτή η μεταβολή πιθανόν βελτιώνει τη λειτουργία και την εμφυτευτική ικανότητα του ενδομητρίου, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της γονιμότητας (*Carvajal et al.,2013*).

Συνεπώς, η μετορμίνη φαίνεται να βελτιώνει την υπερανδρογοναιμία και την ανωοθυλακιορρηξία που χαρακτηρίζουν το ΣΠΩ. Το όφελος από τη χορήγηση μετορμίνης στη γονιμότητα των γυναικών με ΣΠΩ απαιτεί λήψη του φαρμάκου για τουλάχιστον τρεις μήνες πριν την αγωγή πρόκλησης ωορρηξίας. Ειδικές ομάδες ,όπως οι γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας και όσες έχουν αυξημένο σπλαγγνικό λίπος φαίνεται να ωφελούνται περισσότερο από την προσθήκη μετορμίνης στην αγωγή πρόκλησης ωορρηξίας.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Σκοπός

Το ΣΠΩ χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη και χρόνια φλεγμονή, οι οποίες φαίνεται να έχουν κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου. Επίσης, το ΣΠΩ συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, ο οποίος έγκειται σε πολλαπλούς κλασικούς και νεότερους παράγοντες κινδύνου (*Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012*). Στους νεότερους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου ανήκουν η CRP και τα τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης, γνωστά για το ρόλο τους στην αθηρογένεση. Ειδικότερα, η αύξηση των AGEs παρατηρείται ακόμα και σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ χωρίς εμφανείς μεταβολικές διαταραχές συγκριτικά με τις υγιείς μάρτυρες (*Diamanti-Kandarakis et al., 2008*). Με την πρόοδο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΣΠΩ έχουν διευρυνθεί οι στόχοι της θεραπευτικής-φαρμακευτικής αντιμετώπισης του συνδρόμου. Η θεραπεία του συνδρόμου στοχεύει πλέον όχι μόνο στις αναπαραγωγικές διαταραχές αλλά και στην βελτίωση των μεταβολικών παραμέτρων και των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου.

Τα συνδυασμένα αντισυλληπτικά δισκία (ΣΑΔ) και η μετορμίνη είναι οι δύο κύριες φαρμακευτικές παρεμβάσεις που χρησιμοποιούνται στο ΣΠΩ. Ωστόσο, τα υπάρχοντα δεδομένα είναι αντικρουόμενα ως προς την επίδρασή των ΣΑΔ στους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Οι σχετικές μελέτες έχουν δείξει ουδέτερες ή δυσμενείς μεταβολικές επιδράσεις των ΣΑΔ και πιθανή συσχέτισή τους με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών ή/και θρομβοεμβολικών επεισοδίων (*Sitruk-Ware & Nath 2013; Baillargeon et al., 2005; Merz et al., 2006; Plu-Bureau et al., 2013a; Plu-Bureau et al., 2013b*). Αντιθέτως, η μετορμίνη, ο ευρύτερα συνταγογραφούμενος ινσουλινου-εναισθητοποιητής, φαίνεται να βελτιώνει τις μεταβολικές παραμέτρους και τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου σ' αυτές τις ασθενείς. Ειδικότερα, η υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει δείξει ότι η εξάμηνη αγωγή με μετορμίνη ελαττώνει τους δείκτες χρόνιας φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της CRP, καθώς επίσης τα επίπεδα των AGEs ορού στις γυναίκες με ΣΠΩ (*Diamanti-Kandarakis et al., 2006; Diamanti-Kandarakis et al., 2007c*).

Ωστόσο, καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει συγκρίνει διαφορετικούς τύπους ΣΑΔ και τη μετορμίνη ως προς την επίδρασή τους στα AGEs ορού σε γυναίκες με ΣΠΩ. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να συγκρίνει δύο διαφορετικά ΣΑΔ και τη μετορμίνη ως προς την επίδρασή τους στα επίπεδα AGEs και CRP ορού σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ κατά τη διάρκεια εξάμηνης φαρμακευτικής παρέμβασης.

## 2. Υλικό και Μέθοδοι έρευνας

### 2.1 Πληθυσμός μελέτης

Διακόσιες προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ελληνικής καταγωγής προσήλθαν κατά τη χρονική περίοδο 2008-2010 στα εξωτερικά ενδοκρινολογικά ιατρεία δύο πανεπιστημιακών νοσοκομείων στη Θεσσαλονίκη και την Αθήνα, αντίστοιχα, αιτιώμενες υπερτρίχωση, διαταραχές εμμήνου ρύσεως (ΔΕΡ) ή υπογονιμότητα. Από αυτές, 120 προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εντάχθηκαν στη μελέτη (**Σχήμα 17**).



Κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν η ηλικία 16-35 ετών, ο ΔΜΣ μικρότερος ή ίσος του 25kg/m<sup>2</sup> και η διάγνωση ΣΠΩ σύμφωνα με τα NIH κριτήρια (Zawadski & Dunaif 1992). Επίσης, όλες οι γυναίκες που επιλέχθηκαν να συμμετέχουν στη μελέτη ήταν μη καπνίστριες ή είχαν διακόψει το κάπνισμα τουλάχιστον προ έτους, ήταν κλινικά υγιείς και δεν έπασχαν από χρόνια νοσήματα ή οξεία νόσο. Επίσης, δεν ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή με επίδραση στις ενδοκρινικές, μεταβολικές ή φλεγμονώδεις παραμέτρους για τουλάχιστον έξι μήνες. Επιπλέον κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν τα εξής: α) εγκυμοσύνη ή θηλασμός, β) ιστορικό λήψης φαρμάκων που επηρεάζουν ενδοκρινικές, μεταβολικές ή φλεγμονώδεις παραμέτρους εντός εξαμήνου πριν την έναρξη της μελέτης, γ) παρουσία αντενδείξεων για τη λήψη ΣΑΔ ή μετορμίνης, όπως το ιστορικό ΕΒΦΘ ή πνευμονικής εμβολής, η ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης, έγινε δοκιμασία ανοχής της γλυκόζης (δεν παρατίθενται τα δεδομένα) και οι γυναίκες με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

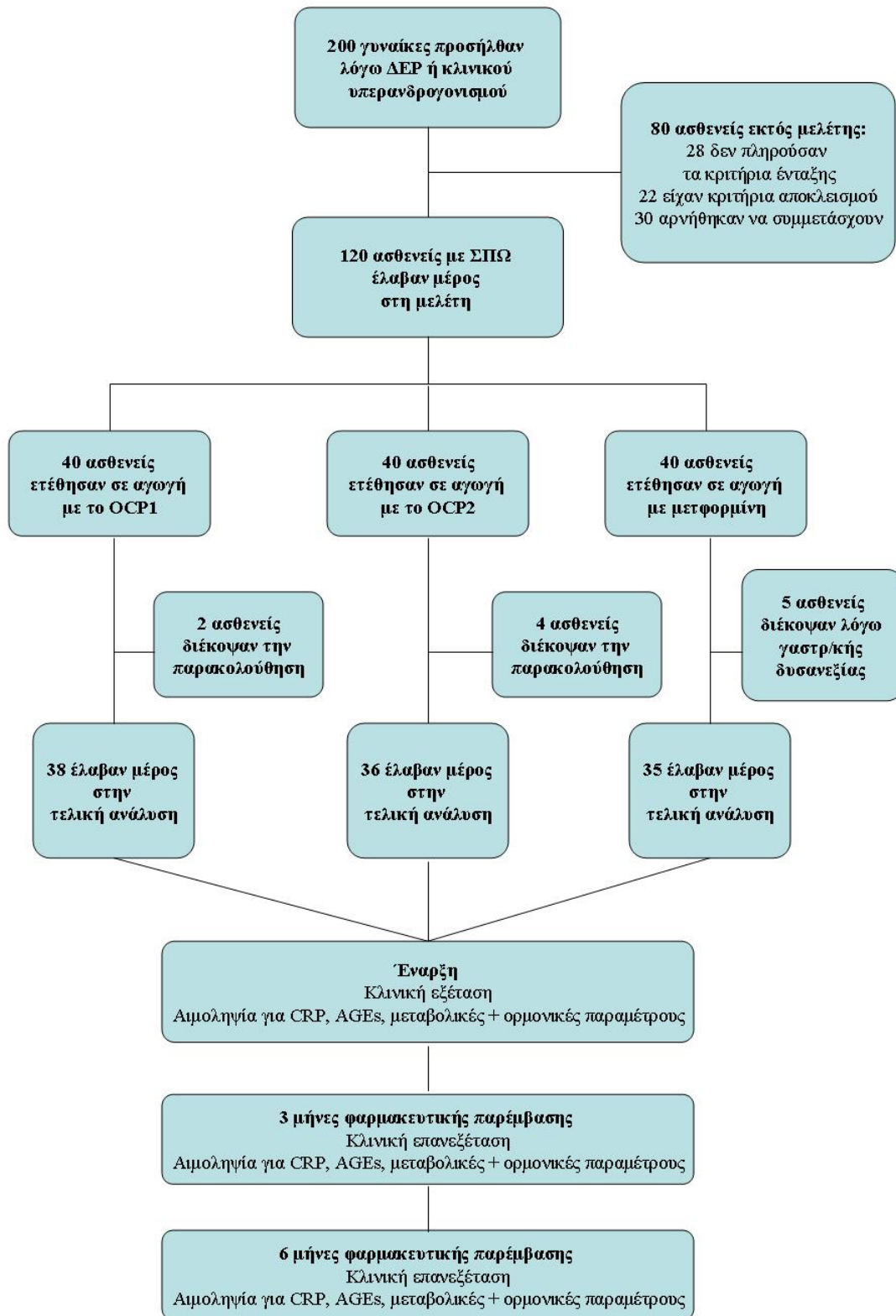
Η διάγνωση του ΣΠΩ βασίστηκε στη συνύπαρξη χρόνιας ανωθυλακιορρηξίας και κλινικού υπερανδρογονισμού ή βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας. Ως χρόνια ανωθυλακιορρηξία ορίστηκε η παρουσία οκτώ ή λιγότερων εμηνόρρυσιακών κύκλων ετησίως σε συνδυασμό με επίπεδα προγεστερόνης ορού την 21<sup>η</sup>-24<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου (μέσο ωχρινικής φάσης) κάτω των 9 nmol/l (3 ng/ml).

Ως βιοχημική υπερανδρογοναιμία ορίστηκε η ανεύρεση επιπέδων τεστοστερόνης ορού άνω της μέσης τιμής τεστοστερόνης που ανευρίσκεται σε υγιείς γυναίκες ίδιας ηλικίας και ίδιου ΔΜΣ με φυσιολογική ωθυλακιορρηξία, κατά την πρώιμη ωθυλακική φάση του κύκλου, προσαυξημένης κατά δύο σταθερές αποκλίσεις. Η κλινική υπερανδρογοναιμία ορίστηκε ως εξής: Ferriman- Gallwey score άνω του 8 (ενότητα 1.4.2, **σχήμα 5**) ή υπαρξη ακμής ή αλωπεκία ανδρικού τύπου.

Για τη διάγνωση του ΣΠΩ αποκλείστηκαν η μη κλασική συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων (ΣΥΕ), τα ανδρογονοεκκριτικά νεοπλάσματα, το σύνδρομο Cushing, η υπερπρολακτιναιμία και οι θυρεοειδοπάθειες. Για τον αποκλεισμό της μη κλασικής ΣΥΕ έγινε δοκιμασία Synacthen με την ενδοφλέβια χορήγηση 250 μg τετρακοσακτίδης (Synacthène 0.25mg/1 ml; Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France ) σε κάθε ασθενή με επίπεδα 17OHP ορού στην ωθυλακική φάση άνω των 6nmol/l .Ο αποκλεισμός των ανδρογονοεκκριτικών νεοπλασμάτων, της υπερπρολακτιναιμίας και της θυρεοειδοπάθειας έγινε με τον προσδιορισμό Testo,DHEAS, προλακτίνης και TSH ορού.

Τα δεδομένα του υπό μελέτη πληθυσμού συγκεντρώθηκαν με προοπτική καταγραφή σε ηλεκτρονική βάση δεδομένων. Σε κάθε συμμετέχουσα δόθηκε έγγραφη ενημέρωση για τη διαδικασία και ζητήθηκε ενυπόγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Σχήμα 17 .Διάγραμμα ροής μελέτης



## 2.2 Πρωτόκολλο μελέτης

Η αρχική επίσκεψη περιελάμβανε κλινική εξέταση και αιμοληψία για τον αρχικό εργαστηριακό έλεγχο. Η κλινική εξέταση των ασθενών έγινε από δύο ιατρούς σε κάθε κέντρο. Κατά την κλινική εξέταση καταγράφηκαν τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά, δηλαδή το σωματικό βάρος, με τη χρήση ζυγού ακριβείας (αναλογική ζυγαριά, οι ασθενείς με ελαφρό ρουχισμό), το ύψος, η μικρότερη περίμετρος της μέσης στο ύψος του ομφαλού (waist:W) και η μεγαλύτερη περίμετρος της πυέλου στο ύψος των ισχίων (hip:H). Με βάση αυτές τις μετρήσεις προσδιορίστηκαν:

- ο ΔΜΣ που υπολογίστηκε με διαίρεση του βάρους του σώματος σε χιλιόγραμμα από το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) για να εκτιμηθεί η παχυσαρκία,
- ο λόγος της μικρότερης περιμέτρου της μέσης προς τη μεγαλύτερη περίμετρο των ισχίων (waist to hip ratio:WHR) για την εκτίμηση της κατανομής του σωματικού λίπους.

Για την κλινική εκτίμηση της υπερτρίχωσης χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα των Ferriman-Gallaway (υποεπένδυση 1.4.2, **σχήμα 5**).

Η αιμοληψία για τον αρχικό εργαστηριακό έλεγχο έγινε μετά από ολονύκτια νηστεία, στις 8 πμ την 2<sup>η</sup> -7<sup>η</sup> ημέρα της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου σε γυναίκες με έμμηνο ρύση ή σε τυχαία ημέρα σε γυναίκες με αμηνόρροια. Η ωοθυλακική φάση του κύκλου επιβεβαιώθηκε με τη μέτρηση επιπέδων προγεστερόνης ορού κάτω των 9 pmol/l (3 ng/ml).

Μετά την ολοκλήρωση της αρχικής κλινικής εξέτασης και τη λήψη του αρχικού εργαστηριακού ελέγχου, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες φαρμακευτικής παρέμβασης και άρχισαν εξάμηνη αγωγή με ένα από τα ακόλουθα φάρμακα ανά ομάδα:

- Ομάδα αντισυλληπτικού δισκίου 1 (OCP1): 40 γυναίκες (n=40) έλαβαν συνδυασμό 35 μg EE και 2 mg οξείκης κυπροτερόνης (CPA pill; Gynofen-35, Bayer).
- Ομάδα αντισυλληπτικού δισκίου 2 (OCP2): 40 γυναίκες (n=40) έλαβαν συνδυασμό 30 μg EE και 3 mg δροσπιρενόνης (DRSP pill; Yasmin, Bayer).
- Ομάδα MET: 40 γυναίκες (n=40) έλαβαν μετφορμίνη (Glucophage; Group Lipha, Lyon, France).

Η λήψη του φαρμάκου άρχισε την πρώτη ημέρα ενός αυτόματου εμμηνορρυσιακού κύκλου στις γυναίκες με αραιομηνόρροια ή σε τυχαία ημέρα στις γυναίκες με αμηνόρροια κατόπιν αποκλεισμού κύησης. Τα OCP1 και OCP2 χορηγήθηκαν κατά το συνιστώμενο σχήμα, δηλαδή ένα δισκίο ημερησίως επί εικοσι μία ημέρες με διακοπή μίας εβδομάδας σε κύκλο 28 ημερών. Η μετφορμίνη χορηγήθηκε με σταδιακή αύξηση δόσης μέχρι την τελική δόση ως εξής: αρχικά 425 mg δις ημερησίως για μια εβδομάδα και ακολούθως 850 mg δις ημερησίως. Αυτό το δοσολογικό σχήμα καθώς και η λήψη του φαρμάκου με τα γεύματα συνιστώνται για την αποφυγή ή ελάττωση της γαστρεντερικής δυσανεξίας στη μετφορμίνη.

Οι ασθενείς έλαβαν οδηγίες διατήρησης των συνηθειών τους ως προς τη δίαιτα και τη φυσική δραστηριότητα. Ειδικά στην ομάδα της μετφορμίνης συνεστήθη η λήψη προφυλακτικών αντισυλληπτικών μέτρων κατά τη σεξουαλική επαφή.

Η επανεκτίμηση έγινε σε δύο επισκέψεις, μια μετά τρεις μήνες και μια μετά έξι μήνες φαρμακευτικής παρέμβασης. Σε κάθε επίσκεψη καταγράφηκε ο αριθμός των δισκίων του φαρμάκου που είχε ληφθεί στο προηγούμενο τρίμηνο, για να εκτιμηθεί η συμμόρφωση κάθε ασθενούς στη φαρμακευτική αγωγή. Η επανεκτίμηση περιελάμβανε κλινική εξέταση και εργαστηριακό επανέλεγχο (**Σχήμα 17**).

Ο εργαστηριακός έλεγχος στην αρχή της μελέτης και στις δύο επισκέψεις επανεκτίμησης έγινε στις 8 πμ μετά από ολονύκτια νηστεία και περιελάμβανε μέτρηση ορμονικών και μεταβολικών παραμέτρων, επιπέδων CRP and επιπέδων AGEs ορού. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις ορού για τις εξής παραμέτρους: γλυκόζη (mg/dl) και ινσουλίνη νηστείας (μIU/ml), ολική τεστοστερόνη (Testo, nmol/l), SHBG (nmol/l), Δ4A (ng/ml), DHEAS (ng/ml), AGEs(U/ml) και CRP(mg/L). Ο free androgen index (FAI) υπολογίστηκε ως το επί τοις εκατό πηλίκο της συγκέντρωσης Testo προς τη συγκέντρωση SHBG ορού ως εξής:  $FAI = \text{Testo (nmol/l)} / \text{SHBG (nmol/l)} \times 100\%$ . Ο βαθμός αντίστασης στην ινσουλίνη εκτιμήθηκε με βάση το homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR), που υπολογίστηκε ως το γινόμενο της γλυκόζης νηστείας επί την ινσουλίνη νηστείας ως εξής  $HOMA-IR = \text{γλυκόζη νηστείας (mmol/l)} \times \text{ινσουλίνη νηστείας (microunits per milliliter)} / 22.5$ . Οι ποσοστιαίες μεταβολές των παραμέτρων ( $D_{\Delta MS}$ ,  $D_{\text{glucose}}$ ,  $D_{\text{insulin}}$ ,  $D_{HOMA-IR}$ ,  $D_{\text{Testo}}$ ,  $D_{FAI}$ ,  $D_{CRP}$ ,  $D_{AGEs}$ ) μετά εξάμηνη φαρμακευτική παρέμβαση υπολογίστηκαν με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$D_{\text{παραμέτρου}} = \text{πηλίκο με αριθμητή [(τιμή παραμέτρου στους 6 μήνες) - (αρχική τιμή παραμέτρου)] και παρονομαστή (αρχική τιμή παραμέτρου)}$

Δύο ασθενείς στην ομάδα OCP1 (2 από τις 40 ασθενείς, 5%) και τέσσερις ασθενείς στην ομάδα OCP2 (4 από τις 40, 10%) δεν ολοκλήρωσαν την παρακολούθηση. Πέντε ασθενείς στην ομάδα MET (5 από τις 40, 12,5%) διέκοψαν τη φαρμακευτική αγωγή λόγω γαστρεντερικής δυσανεξίας. Κατά συνέπεια, 109 ασθενείς ολοκλήρωσαν τη μελέτη (38 στην ομάδα OCP 1, 36 στην ομάδα OCP2, 35 στην ομάδα MET). Αυτές οι ασθενείς δεν παρουσίασαν καμία σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια.

### 2.3 Μέθοδοι εργαστηριακού προσδιορισμού

Τα δείγματα αίματος των ασθενών συλλέχθηκαν σε σωληνάρια ορού και φυγοκεντρήθηκαν αμέσως μετά την πήξη τους. Ο υπερκείμενος ορός διαχωρίστηκε και διανεμήθηκε σε κλάσματα του 0,5 ml, τα οποία καταψύχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη διενέργεια των εργαστηριακών μετρήσεων.

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης πλάσματος έγινε με τη μέθοδο οξειδάσης της γλυκόζης σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή (Roche/Hitachi 902; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Ο προσδιορισμός των ορμονών FSH, LH, Testo, Δ4-A, DHEA-S έγινε με ραδιοανοσολογική μέθοδο και της SHBG έγινε με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (IRMA) με τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια (FSH: Radioisotopic Kit, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, California, 92675, USA; LH: Radioisotopic Kit, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, California, 92675, USA; Testo: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA; Δ4A: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA; DHEAS: Radioisotopic Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA; SHBG: Immunoradiometric Assay (IRMA) Kit, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA). Ο προσδιορισμός της ινσουλίνης ορού έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) (ELISA Kit, Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Η high sensitivity CRP (hsCRP) ορού προσδιορίστηκε με ELISA (high-sensitivity CRP enzyme immunoassay test kit, LI7500; Linear Chemicals).

Οι συντελεστές μεταβλητότητας για κάθε μια μέθοδο ήταν 1.5% για την FSH, 0.7% για την LH, 1.3% για την Testo, 5.9 για την Δ4A, 9.4% για την DHEAS, 5.8% για την

SHBG και 3.8% για την ινσουλίνη. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ των μεθόδων ήταν 3.2% για την FSH, 1.7% για την LH, 2.2% για την Testo, 9.2% για την Δ4Α, 12.1% για την DHEAS, 7.8% για την SHBG, 4.4% για την ινσουλίνη.

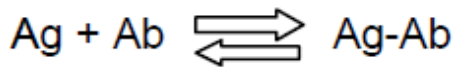
**Competitive AGE enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Τα επίπεδα AGEs στον ορό (U/ml) μετρήθηκαν με την ειδική για AGE ανταγωνιστική ELISA, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη από τους Διαμάντη-Κανδαράκη και συνεργάτες (Diamanti-Kandarakis et al., 2005a). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι των δύο μετρήσεων.

Πριν από τη μέτρηση των AGEs με τη μέθοδο AGE-ELISA, έγινε 1:5 αραιώση των ορών με φωσφορικό διάλυμα άλατος [phosphate-buffered saline (PBS), 0.02% Tween-20 και 1 mM sodium azide (NaN3)]. Ο προσδιορισμός των AGEs ορού έγινε σε αναλυτή Chemwell analyser (Awareness, Florida, USA).

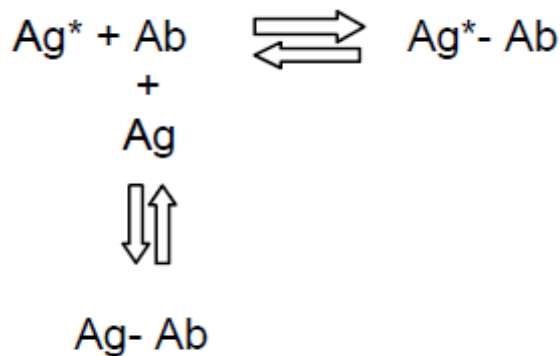
Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA) αποτελεί μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων διαλυτών ουσιών και ανίχνευσης αντισωμάτων-αντιγόνων σε βιολογικά υγρά. Είναι μια ετερογενής μέθοδος στερεάς φάσης και διακρίνεται σε δύο διαθέσιμες τεχνικές για τη μέτρηση του αντιγόνου, την τεχνική τύπου sandwich ή διπλού αντισώματος και την ανταγωνιστική τεχνική (competitive ELISA).

Η τεχνική ELISA βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab). Η αρχή της μεθόδου είναι η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο και ο σχηματισμός ενός συμπλέγματος, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια που περιέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα. Η αντίδραση ακολουθεί το νόμο της δράσεως των μαζών:



όπου Ag: αντιγόνο, Ab: αντίσωμα.

Μια ανάλογη ισορροπία αποκαθίσταται και μεταξύ ενός σημασμένου αντιγόνου Ag\* και αντισώματος Ab:



Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλά ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μια πρότυπη καμπύλη, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος στο δείγμα.

### Στάδια ανταγωνιστικής μεθόδου (Σχήμα 18)

Για την CML-ειδική ανταγωνιστική ELISA, που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο (kit) για την ειδική, ταχεία ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών παραγώγων της CML (CML ELISA Kit, Cell Biolabs). Όπως περιγράφηκε παραπάνω, στη γενική αρχή της ELISA, η ποσότητα των προϊόντων της CML στο δείγμα πρωτεΐνης προσδιορίζεται με βάση μια πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από τη μέτρηση των απορροφήσεων σε ένα πρότυπο δείγμα CML συνδεδεμένης με Bovine serum albumin (BSA).

Συγκεκριμένα, το πρότυπο δείγμα CML-BSA ή το προς μέτρηση δείγμα πρωτεΐνης (10μg/mL) επάζονται στα 96 μικροπηγάδια της πλάκας εργασίας [φωτογραφία 1] για 2 ώρες στους 37°C. Τα δείγματα συνδέονται με ένα αντι- CML αντίσωμα, ακολουθούμενο από ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα επισημασμένο ένζυμο υπεροξειδάσης (Horseradish peroxidase, HRP), προκειμένου να ιχνηθετηθεί το αρχικό αντιγόνο.

#### Υλικά:

- Περιέχονται έτοιμα στο Kit σε θερμοκρασία δωματίου:
  1. Πλάκα μικροτιτλοδότησης εργασίας ELISA 96 μικροπηγαδιών
  2. Αντι- CML αντίσωμα (δοχείο 20 μL)
  3. Δεύτερο HRP-συνδεδεμένο αντίσωμα (δοχείο 50μL)
  4. Διαλύτης μεθόδου (assay diluents) (δοχείο 50μL)
  5. 10X Ρυθμιστής πλύσης (wash buffer) (δοχείο 100mL)
  6. Διάλυμα υποστρώματος (δοχείο 12mL)
  7. Διάλυμα παύσης (stop solution) (δοχείο 12mL)
  8. Αναγόμενος σταθεροποιητής BSA [δοχείο 500μL συγκέντρωσης 1mg/mL αναγόμενο BSA σε Phosphate Buffer Saline (PBS)]
  
- Περιέχονται έτοιμα στο Kit σε θερμοκρασία 4°C (με παγοκύστεις):
  1. CML-BSA πρότυπο (δοχείο 50μL συγκέντρωσης 1.0mg/mL CML-BSA σε PBS)
  
- Δεν περιέχονται στο Kit:
  1. Πρωτεϊνικά δείγματα
  2. 1X PBS
  3. Προσαρμοζόμενες μικροπιπέτες ενός διαμερίσματος των 10-1000μL με μύτες μιας χρήσεως
  4. Προσαρμοζόμενες μικροπιπέτες πολλών διαμερισμάτων των 50-300μL με μύτες μιας χρήσεως
  5. Μικροπλακίδιο ανάγνωσης (microplate reader) με δυνατότητα στα 450-620nm κύματος.

#### Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

- 1X Ρυθμιστής πλύσης: Αραιώνουμε το 10X ρυθμιστή πλύσης προς συγκέντρωση 1X με αποϊονισμένο νερό. Αναδεύουμε για να επιτύχουμε ομογενοποίηση.
- Αντι-CML αντίσωμα και δεύτερο αντίσωμα: Ακριβώς πριν τη χρήση, αραιώνουμε το αντι-CML αντίσωμα σε αναλογία 1:1000 και το δεύτερο αντίσωμα σε αναλογία 1:1000 με το διαλύτη μεθόδου. Τα αραιωμένα διαλύματα δεν μπορούν να αποθηκευθούν για επόμενη χρήση.

Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης:

1. Παρασκευάζουμε διάλυμα αναγόμενου BSA σε συγκέντρωση 10μg/mL προσθέτοντας το έτοιμο διάλυμα 1mg/mL BSA σε 1X PBS. Παράδειγμα: Προσθέτουμε 50μL σε 4.95mL από 1 X PBS.
2. Παρασκευάζουμε διάλυμα CML-BSA σε συγκέντρωση 50ng/mL αραιώνοντας το έτοιμο πρότυπο διάλυμα 1.0mg/mL CML-BSA σε 10μg/mL του αναγόμενου BSA σε δύο βήματα αραιώσης. Παράδειγμα: προσθέτουμε 5μL σε 995μL του 1X PBS, αναδεύουμε καλά και μεταφέρουμε 15μL σε ένα άλλο δοχείο φυαλίδιο, το οποίο περιέχει 1.485 mL του αναγόμενου BSA.
3. Παρασκευάζουμε μια σειρά από πρότυπα CML-BSA διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Standard Tubes	50 ng/mL CML-BSA (μL)	10 μg/mL Reduced BSA (μL)	CML-BSA (ng/mL)
1	1000	0	50
2	500 of tube #1	500	25
3	500 of tube #2	500	12.5
4	500 of tube #3	500	6.26
5	500 of tube #4	500	3.13
6	500 of tube #5	500	1.56
7	500 of tube #6	500	0.78
8	0	500	0

Η πρότυπη καμπύλη που προκύπτει φαίνεται στο σχήμα 18.

Προετοιμασία των δειγμάτων προς μέτρηση:

Τα πρωτεϊνικά δείγματα CML διαλύονται 5-10 φορές σε 10μg/mL αναγόμενο BSA πριν από τη χρήση της μεθόδου.

1. Παρασκευάζουμε εκ νέου διάλυμα αναγόμενου BSA σε συγκέντρωση 10μg/mL αραιώνοντας το έτοιμο διάλυμα 1mg/mL BSA σε 1 X PBS.
2. Αραιώνουμε το προς μέτρηση δείγμα σε 1 X PBS για να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση 10μg/mL.
3. Σε ένα φιαλίδιο, αναμειγνύουμε 10μg/mL αναγόμενου BSA και 10μg/mL του δείγματος προς μέτρηση σε αναλογία 9:1. Παράδειγμα: προσθέτουμε 50μL από το διάλυμα 10μg/mL του δείγματος σε 450μL από το διάλυμα 10μg/mL του αναγόμενου BSA.

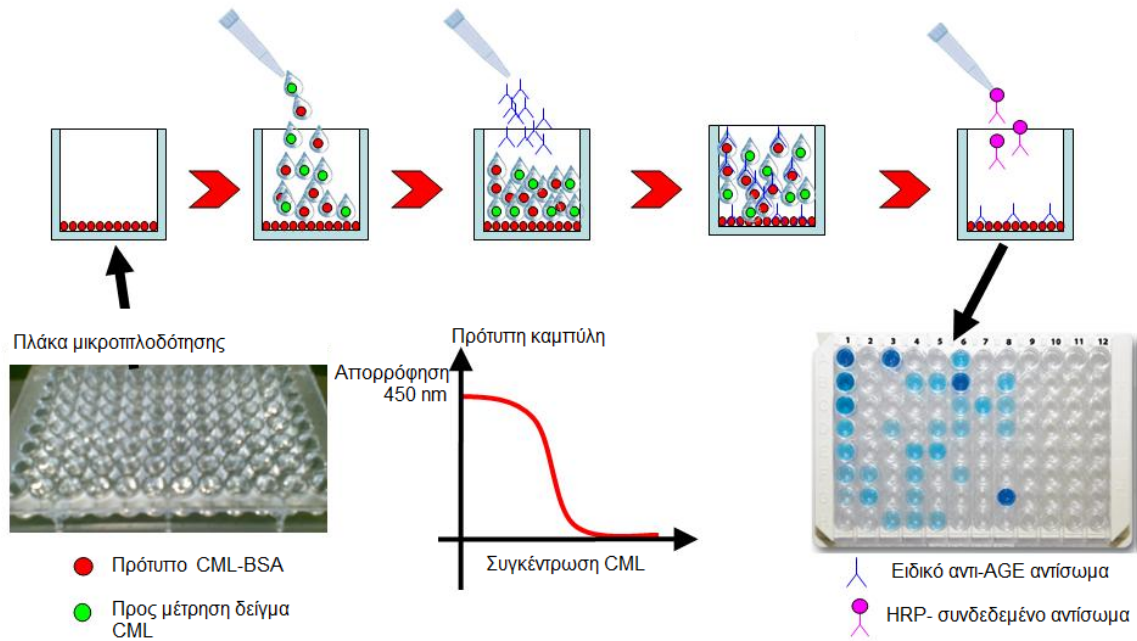
Πρωτόκολλο μεθόδου:

1. Διαλύουμε κάθε δείγμα προς μέτρηση σε 10μg/mL από 1X PBS. Κάθε δείγμα προς μέτρηση ή πρότυπο δείγμα CML-BSA πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον εις διπλούν.
2. Προσθέτουμε 100μL από το 10μg/mL δείγμα προς μέτρηση ή το πρότυπο BSA στα 96 μικροπηγάδια. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για τουλάχιστον 2 ώρες ή στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
3. Πλύση των μικροπηγαδιών 2 φορές με 250μL 1X PBS ανά μικροπηγάδι. Μετά την τελευταία πλύση αδειάζουμε τα μικροπηγάδια και ταμπονάρουμε για να απομακρυνθεί τυχόν περίσσειμα διαλύματος πλύσης.
4. Προσθέτουμε 200μL διαλύτη μεθόδου ανά μικροπηγάδι και επωάζουμε για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτήρα.

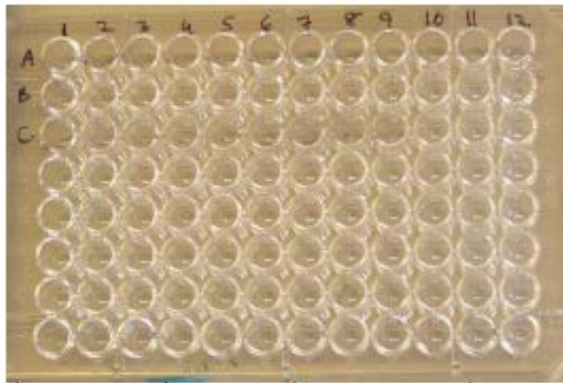
5. Ακολουθούν πλύσεις 3 φορές με 250μL με 1X διαλύτη πλύσης με προσεκτική αναρρόφηση μεταξύ των πλύσεων. Μετά την τελευταία πλύση, αδειάζουμε τα μικροπηγάδια και ταμπονάρουμε για να απομακρυνθεί τυχόν περίσσειμα διαλύτη πλύσης.
6. Προσθέτουμε 100μL από το αραιωμένο αντι-CML αντίσωμα σε όλα τα μικροπηγάδια και επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτήρα. Ακολουθούν πλύσεις σύμφωνα με το βήμα 5.
7. Προσθέτουμε 100μL από το αραιωμένο δεύτερο, HRP συνδεδεμένο-αντίσωμα σε όλα τα μικροπηγάδια. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε περιστροφικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια πλένουμε τα μικροπηγάδια 5 φορές σύμφωνα με το βήμα 5.
8. Φέρνουμε το διάλυμα υποστρώματος σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 100μL από το υπόστρωμα σε κάθε μικροπηγάδι και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-20 λεπτά σε περιστροφικό αναδευτήρα.
9. Διακόπτουμε την ενζυμική αντίδραση προσθέτοντας 100μL διαλύματος παύσης σε κάθε μικροπηγάδι. Τα αποτελέσματα πρέπει να διαβασθούν άμεσα, διότι το χρώμα αλλοιώνεται με την παρέλευση του χρόνου.  
Διαβάζουμε την απορρόφηση κάθε μικροπηγαδιού επάνω στο μικροπλακίδιο ανάγνωσης χρησιμοποιώντας μήκος κύματος αρχικά 450nm. Το αναγώμενο BSA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της απορρόφησης από ένα κενό μικροπηγάδι, ως σημείο αναφοράς.



**Σχήμα 18** Στάδια ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA



**Φωτογραφία 1** Πλάκα μικροπιλοδότησης ELISA των 96 θέσεων/μικροπηγαδιών/wells (8 σειρές και 12 στηλες)



## 2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η κανονικότητα των κατανομών όλων των συνεχών μεταβλητών. Οι τιμές των μεταβλητών του υπό μελέτη πληθυσμού παρατίθενται ως μέσες τιμές  $\pm$  σταθερό σφάλμα.

Για τις συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών υπολογίστηκαν ο συντελεστής Pearson's (για τις κανονικές μεταβλητές) και ο συντελεστής Spearman's (για τις μη κανονικές μεταβλητές). Η σύγκριση των μεταβλητών μεταξύ των χρονικών φάσεων της μελέτης στην ίδια ομάδα (Within-group comparisons: αρχικά -3 μήνες, αρχικά-6 μήνες, 3 μήνες- 6 μήνες) έγινε με: 1) paired t-test για τις κανονικές μεταβλητές 2) Wilcoxon test για τις μη κανονικές μεταβλητές. Η μέθοδος Kruskal-Wallis (μη κανονικές μεταβλητές) ή η μέθοδος ANOVA (κανονικές μεταβλητές) χρησιμοποιήθηκαν για τις συγκρίσεις μεταξύ των τριών ομάδων σε κάθε χρονική φάση.

Οι ανεξάρτητες συσχετίσεις της μεταβολής των AGEs (DAGEs) με τις άλλες μεταβλητές εκτιμήθηκαν με ανάλυση πολυπαραγοντικής παλινδρόμησης κατά βήματα, αφού ελέγχθηκε η κανονικότητα των υπολοίπων (residuals). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές στην ανάλυση περιελήφθησαν η ηλικία, το είδος της φαρμακευτικής παρέμβασης (OCPs=1, μετορμίνη=2) και όλες οι παράμετροι που εμφάνιζαν σημαντική συσχέτιση με το DAGEs στην μονοπαραγοντική ανάλυση. Στο τελικό μοντέλο παλινδρόμησης ο δείκτης ανεκτικότητας και ο συντελεστής πληθωρισμού διακυμάνσεων (*tolerance and variance inflation factor: VIF*) χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της πιθανής πολύ-συγγραμμικότητας μεταξύ των μεταβλητών. Σε όλες τις δοκιμασίες, τιμή  $p < 0,05$  θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

### 3. Αποτελέσματα

#### **Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά στην έναρξη της μελέτης και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση**

Στην έναρξη της μελέτης δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην ηλικία ( $22\pm 0.6$  έτη στην ομάδα OCP1,  $23.2\pm 0.6$  έτη στην ομάδα OCP2,  $21.5\pm 0.5$  έτη στην ομάδα MET), τον ΔΜΣ και το WHR (**Πίνακας 4**).

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών στην έναρξη, στους 3 μήνες και στους 6 μήνες της μελέτης παρουσιάζονται στον **πίνακα 5**.

Ο ΔΜΣ αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες OCP1 και OCP2, ενώ ελαττώθηκε στην ομάδα MET (**Γράφημα 1**). Η αύξηση του ΔΜΣ κατά την 6μηνη περίοδο της φαρμακευτικής παρέμβασης ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη με το OCP1 συγκριτικά με το OCP2 ( $P=0.017$ ) (**Πίνακας 7**). Ωστόσο, οι μέσες τιμές ΔΜΣ δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων στους έξι μήνες της φαρμακευτικής παρέμβασης (**Γράφημα 1**).

#### **Βιοχημικές και ορμονικές παράμετροι στην έναρξη της μελέτης και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση**

Οι βιοχημικές και οι ορμονικές παράμετροι στις γυναίκες με ΣΠΩ στην έναρξη, στους 3 μήνες και στους 6 μήνες της μελέτης παρουσιάζονται στον **πίνακα 5**.

Στην έναρξη της μελέτης οι τρεις ομάδες δεν διέφεραν ως προς τις ορμονικές παραμέτρους, αλλά η ομάδα OCP1 είχε χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης ορού και HOMA-IR συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες και χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης ορού συγκριτικά με την ομάδα MET (**Πίνακας 4, Γράφημα 2, Γράφημα 3**).

Στους τρεις μήνες ως προς τις βιοχημικές-μεταβολικές παραμέτρους, η ομάδα OCP1 παρουσίασε αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης ορού και του HOMA-IR χωρίς σημαντική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης ορού (**Πίνακας 5, Γράφημα 2, Γράφημα 3**). Στην ίδια χρονική φάση, η ομάδα OCP2 παρουσίασε ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης ορού και αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης ορού, με αποτέλεσμα ο HOMA-IR να μην παρουσιάσει σημαντική μεταβολή. Τέλος, η ομάδα MET παρουσίασε σημαντική ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης, χωρίς σημαντική μεταβολή των επιπέδων ινσουλίνης και HOMA-IR (**Πίνακας 5, Γράφημα 2, Γράφημα 3**). Ως προς τις ορμονικές παραμέτρους, οι ομάδες OCP1 και OCP2 παρουσίασαν ελάττωση των επιπέδων Testo, Δ4A, DHEAS, FAI και αύξηση των επιπέδων SHBG ορού (**Πίνακας 5, Γράφημα 4**). Η ομάδα MET παρουσίασε αύξηση των επιπέδων SHBG χωρίς σημαντική μεταβολή των επιπέδων Testo, Δ4A και FAI (**Πίνακας 5, Γράφημα 4**).

Στους έξι μήνες ως προς τις βιοχημικές-μεταβολικές παραμέτρους, η ομάδα OCP1 παρουσίασε αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης ορού και του HOMA-IR χωρίς σημαντική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης ορού (**Πίνακας 5, Γράφημα 2, Γράφημα 3**). Στην ίδια χρονική φάση, η ομάδα OCP2 παρουσίασε ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης ορού και αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης και του HOMA-IR. Τέλος, η ομάδα MET παρουσίασε σημαντική ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης και HOMA-IR (**Πίνακας 5, Γράφημα 2, Γράφημα 3**). Ως προς τις ορμονικές παραμέτρους, οι ομάδες OCP1 και OCP2 παρουσίασαν ελάττωση των επιπέδων Testo, Δ4A, DHEAS, FAI και αύξηση των επιπέδων SHBG ορού (**Πίνακας 5, Γράφημα 4**). Η ομάδα MET παρουσίασε ελάττωση των επιπέδων Testo και FAI, χωρίς σημαντική μεταβολή των επιπέδων Δ4A, DHEAS και SHBG ορού (**Πίνακας 5, Γράφημα 4**). Η ποσοστιαία

ελάττωση του FAI και της Testo ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη με τα OCPs (OCP1 ή OCP2) από ότι με τη MET (**Πίνακας 7**)

Στον **πίνακα 5** οι συγκρίσεις των τιμών των παραμέτρων έγιναν α) μεταξύ των τριών ομάδων στην έναρξη και β) μεταξύ των τριών χρονικών φάσεων ανά ομάδα.

**Πίνακας 4** Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά,βιοχημικές και ορμονικές παράμετροι ανά ομάδα στην έναρξη της μελέτης

	<b>OCP1 (n=38)</b>	<b>OCP2 (n=36)</b>	<b>MET (n=35)</b>
<b>Ηλικία (έτη)</b>	22,0 ± 0,6	23,2 ± 0,6	21,5 ± 0,5
<b>ΔΜΣ 0 (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21,8 ± 0,4	22,4 ± 0,5	23,0 ± 0,7
<b>WHR</b>	0,77±0,01	0,74±0,01	0,75±0,01
<b>Insulin 0 (μIU/ml)</b>	7,2 ± 0,6 ‡	8,5 ± 0,7	11,3 ± 1,1
<b>Glucose 0 (mg/dl)</b>	91,7 ± 1,5*‡	100,1 ± 1,8	97,1± 2,5
<b>HOMA-IR 0</b>	1,7 ± 0,2 *‡	2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3
<b>Testo 0 (nmol/l)</b>	84.9 ± 4,2	86,5 ± 3,4	82,1 ± 2,7
<b>SHBG 0 (nmol/l)</b>	52,8± 3,7	49,5 ± 3,7	45,8 ± 3,4
<b>Δ4Α 0 (ng/ml)</b>	3,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,2
<b>DHEAS 0 (ng/ml)</b>	3370±167	3204 ± 181	3447 ± 147
<b>FAI 0</b>	6,4 ± 0,5	7,7 ± 0,8	7,6 ± 0,8
<b>FSH 0 (IU/L)</b>	5,8 ± 0,2	5,9 ± 0,3	6,0 ± 0,3
<b>LH 0 (IU/L)</b>	9,6 ± 1,1	9,6±1,1	10,3 ± 1,1

\* P<0,05 συγκριτικά με την ομάδα OCP2

‡ P<0,05 συγκριτικά με την ομάδα MET

**Πίνακας 5.**Βιοχημικές και ορμονικές παράμετροι ανά ομάδα στην έναρξη, στους τρεις και στους έξι μήνες της φαρμακευτικής παρεμβάσης

Παράμετροι	Χρόνος	OCP1 (n=38)	OCP2 (n=36)	MET (n=35)
<b>ΔΜΣ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0	21,8 ± 0,4	22,4 ± 0,5	23,0 ± 0,7
	3μήνες	22±0,4*	22,7±0,5*	22,6±0,7*
	6μήνες	22,3±0,4*†	22,7±0,5*	22,4±0,7*†
<b>Glucose (mg/dl)</b>	0	91,7 ± 1,5	100,1±1,8€	97,1±2,5 €
	3μήνες	89,0 ± 1,0	90±1,5*	88,0±3,0*
	6μήνες	89,0 ± 1,3	89,0±1,5*	87±1,2*
<b>Insulin (μIU/ml)</b>	0	7,2 ± 0,6	8,5±0,7	11,3 ± 1,1 €
	3μήνες	10,5 ± 1,0*	10,28 ± 0,7*	13 ± 2,6
	6μήνες	11,5 ± 0,9*	12,54 ± 0,8*†	7,7±0,5*†
<b>HOMA-IR</b>	0	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2 €	2,8 ± 0,3 €
	3μήνες	2,3 ± 0,2*	2,3 ± 0,2	2,4±0,3
	6μήνες	2,4 ± 0,2 *	2,8 ± 0,2 *†	1,6 ± 0,1*†
<b>Testo (nmol/l)</b>	0	2,95 ± 0,15	3,00 ± 0,12	2,85 ± 0,09
	3μήνες	1,83 ± 0,14*	1,91 ± 0,11*	2,88±0,13
	6μήνες	1,61±0,09*	1,99± 0,13*	2,32 ± 0,07*†
<b>Δ4Α (ng/ml)</b>	0	3,2 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,29 ± 0,2
	3μήνες	2,4±0,1*	2,5±0,2*	3,3 ± 0,2
	6μήνες	2,3±0,1*	2,5 ± 0,2*	3±0,1
<b>DHEAS (ng/ml)</b>	0	3370 ± 167	3204 ± 181	3447 ± 147
	3μήνες	2536±164*	2529±153*	3910±210*
	6μήνες	2330±144*	2501±173*†	3546±184†
<b>SHBG (nmol/l)</b>	0	52,8 ± 3,7	49,5±3,7	45,8 ± 3,4
	3μήνες	220,2±15,8*	209,3± 11,4*	52,5±4,3*
	6μήνες	247,9 ± 12,9*†	230,5±13*	44,9±3,0
<b>FAI</b>	0	6,43± 0,49	7,73 ± 0,81	7,61 ± 0,75
	3μήνες	1,01 ± 0,10 *	1,03±0,08 *	6,95 ± 0,69
	6μήνες	0,73 ± 0,06 *†	0,95±0,09*	5,87± 0,37*

\* P<0.05 συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

† P<0.05 συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

€P<0,05 συγκριτικά με την ομάδα OCP1 στην ίδια χρονική φάση

Οι παράμετροι εκφράζονται ως μέσες τιμές±σταθερό σφάλμα. Για τη μετατροπή των παραμέτρων από συμβατικές μονάδες μέτρησης σε μονάδες μέτρησης SI πολλαπλασιάστε επί 3,49 για Δ4Α(αποτέλεσμα σε nmol/L), επί 0,002714 για DHEAS (αποτέλεσμα σε μmol/L), επί 0.0555 για Glucose (αποτέλεσμα σε mmol/L) και επί 6,945 για Insulin (αποτέλεσμα σε pmol/L).

### Επίπεδα αθηρογόνων δεικτών στην έναρξη της μελέτης και μετά τη φαρμακευτική παρέμβαση

Στην έναρξη της μελέτης τα επίπεδα AGEs και CRP ορού δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 6).

Στους τρεις μήνες φαρμακευτικής παρέμβασης τα επίπεδα AGEs ελαττώθηκαν σημαντικά στις ομάδες OCP1 και MET, ενώ δε μεταβλήθηκαν σημαντικά στην ομάδα OCP2. Στους έξι μήνες φαρμακευτικής παρέμβασης τα επίπεδα AGEs ορού σημείωσαν περαιτέρω σημαντική ελάττωση συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στους τρεις μήνες και στις τρεις ομάδες (Πίνακας 6, Γράφημα 5). Η ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων AGEs ορού στο εξάμηνο της φαρμακευτικής παρέμβασης ( $D_{AGEs}$ ) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα MET συγκριτικά με τις αντίστοιχες μεταβολές στις ομάδες OCP1 και OCP2 (Ομάδα OCP1 vs ομάδα OCP2:  $P=0,212$ , Ομάδα OCP1 vs ομάδα MET:  $P=0,022$ , ομάδα OCP2 vs ομάδα MET:  $P=0,001$ ) (Γράφημα 6).

Στους τρεις μήνες φαρμακευτικής παρέμβασης τα επίπεδα της CRP αυξήθηκαν σημαντικά στις ομάδες OCP1 και OCP2, ενώ ελαττώθηκαν σημαντικά στην ομάδα MET (Πίνακας 6, Γράφημα 7). Στους έξι μήνες, τα επίπεδα CRP σημείωσαν περαιτέρω αύξηση στις ομάδες OCP1 και OCP2, ενώ σημείωσαν περαιτέρω ελάττωση στην ομάδα MET (Πίνακας 6, Γράφημα 7). Η OCP-επαγόμενη αύξηση της CRP κατά την εξάμηνη αγωγή ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη με το OCP1 (CPA pill) απ'ότι με το OCP2 (DRSP pill) ( $P=0,003$ ) (Πίνακας 7).

**Πίνακας 6.** Επίπεδα αθηρογόνων δεικτών στην έναρξη, στους 3 μήνες και στους 6 μήνες της φαρμακευτικής παρέμβασης

Παράμετροι	Χρόνος	OCP1 (n=38)	OCP2 (n=36)	MET (n=35)
AGEs (U/ml)	0	7,72±0,33	7,98±0,27	8,51±0,29
	3μήνες	7,32±0,44*	7,93±0,27	7,91±0,23*
	6μήνες	7,22±0,46*‡	7,59±0,32*‡	6,80±0,23*‡
CRP(mg/L)	0	1,3±0,8	1,2±0,9	1,3±0,7
	3μήνες	2,0±0,1*	1,8±0,3*	1,0±0,1*
	6μήνες	2,6±0,2*‡	2,0±0,2*‡	0,7±0,1*‡

\*  $P<0,05$  συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

‡  $P<0,05$  συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

**Πίνακας 7.** Ποσοστιαίες μεταβολές των κυριότερων παραμέτρων ανά ομάδα

	OCP1 (n=38)	OCP2 (n=36)	MET (n=35)
$D_{ΔΜΣ}$	2,41±0,44	1,38±0,27*	-3,22±0,78*‡
$D_{HOMA}$	0,59±0,13	0,55±0,15	-0,21±0,01*‡
$D_{Testo}$	-42,05±3,75	-31,26±4,82	-16,54±3,22*‡
$D_{CRP}$	1,35±0,15	0,75±0,12*	-0,57±0,06*‡
$D_{AGEs}$	-8,87±2,70	-4,13±2,78	-17,71±2,60*‡

\*  $P<0,05$  συγκριτικά με το OCP1

‡  $P<0,05$  συγκριτικά με το OCP2

### **Συσχετίσεις των μεταβολών των αθηρογόνων δεικτών με ανθρωπομετρικές, βιοχημικές και ορμονικές παραμέτρους (απόλυτες τιμές και ποσοστιαίες μεταβολές)**

Μελετήθηκαν οι συσχετίσεις των μεταβολών των αθηρογόνων δεικτών ( $D_{CRP}$  και  $D_{AGEs}$ ) με τις ανθρωπομετρικές, βιοχημικές και ορμονικές παραμέτρους (αρχικές απόλυτες τιμές και ποσοστιαίες μεταβολές) τόσο στο συνολικό πληθυσμό όσο και στις επιμέρους ομάδες φαρμακευτικής παρέμβασης (**Πίνακες 8 και 9**).

Στο σύνολο των γυναικών που μελετήθηκαν, η ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων AGEs ορού κατά την εξάμηνη φαρμακευτική παρέμβαση ( $D_{AGEs}$ ) συσχετίστηκε αρνητικά με τον αρχικό ΔΜΣ (**Πίνακας 8**). Αντιστοίχως, η  $D_{CRP}$  συσχετίστηκε αρνητικά με την  $D_{Testo}$  και θετικά με τις  $D_{ΔΜΣ}$ ,  $D_{HOMA}$  και  $D_{Insulin}$  (**Πίνακας 8**).

Στην ομάδα OCP1 η  $D_{AGEs}$  συσχετίστηκε αρνητικά με τον αρχικό ΔΜΣ και θετικά με την  $D_{Testo}$  και την  $D_{FAI}$ , ενώ η  $D_{CRP}$  συσχετίστηκε αρνητικά με την  $D_{Testo}$  και θετικά με τις  $D_{Glucose}$ ,  $D_{HOMA}$  και  $D_{Insulin}$ . Στην ομάδα OCP2 η  $D_{AGEs}$  συσχετίστηκε αρνητικά με τον αρχικό ΔΜΣ και τα αρχικά επίπεδα Testo ορού, ενώ η  $D_{CRP}$  συσχετίστηκε αρνητικά με την  $D_{Testo}$  (**Πίνακας 9**).

Όταν μελετήθηκαν οι ομάδες των δύο αντισυλληπτικών ως μια ενιαία ομάδα (OCP1+OCP2), η  $D_{AGEs}$  συσχετίστηκε με την ηλικία ( $r=0.26$ ), την  $D_{FAI}$  ( $r=0.28$ ), τον αρχικό ΔΜΣ ( $r=-0.38$ ), τα αρχικά επίπεδα Testo ( $r=-0.29$ ) και την  $D_{ΔΜΣ}$  ( $r=-0.25$ ), ενώ η  $D_{CRP}$  συσχετίστηκε με την  $D_{Testo}$  ( $r=-0.44$ ) και την  $D_{Glucose}$  ( $r=0.28$ ).

Στην ομάδα MET δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τις  $D_{AGEs}$  και  $D_{CRP}$  (**Πίνακας 9**).

Για να μελετηθεί η πιθανή ανεξάρτητη συσχέτιση της  $D_{AGEs}$  με το είδος της φαρμακευτικής παρέμβασης και με κάθεμα από τις μεταβλητές που συσχετίστηκαν με την  $D_{AGEs}$  στη μονοπαραγοντική ανάλυση, έγινε πολυμεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης. Σ' αυτή την ανάλυση η  $D_{AGEs}$ , που ήταν η ανεξάρτητη μεταβλητή, είχε ανεξάρτητη συσχέτιση με το είδος της θεραπείας (OCPs έναντι MET) ( $R^2=0.13$ ;  $\beta \pm SE = -8.58 \pm 3.34$ ) και με τον αρχικό ΔΜΣ ( $\beta \pm SE = -1.23 \pm 0.51$ ). Ο VIF ήταν ίσος με 1.5 (tolerance 0.6), τιμή η οποία δηλώνει την απουσία συγγραμμικότητας στο μοντέλο της πολυμεταβλητής παλινδρόμησης.

**Πίνακας 8.** Σημαντικές συσχετίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών των αθηρογόνων δεικτών με άλλες παραμέτρους στο σύνολο των ασθενών (n=109)

		<b>R</b>	<b>P</b>
<b>D<sub>AGES</sub></b>	<b>ΔΜΣ 0</b>	-0,254	0,009
<b>D<sub>CRP</sub></b>	<b>D<sub>Testo</sub></b>	-0,506	<0,001
	<b>D<sub>ΔΜΣ</sub></b>	0,494	<0,001
	<b>D<sub>HOMA</sub></b>	0,459	<0,001
	<b>D<sub>Insulin</sub></b>	0,448	<0,001
	<b>D<sub>FAI</sub></b>	-0,672	<0,001

**Πίνακας 9.** Σημαντικές συσχετίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών των αθηρογόνων δεικτών με άλλες παραμέτρους ανά ομάδα φαρμακευτικής παρέμβασης

**α) Ομάδα OCP1 (n=38)**

		<b>R</b>	<b>P</b>
<b>D<sub>AGES</sub></b>	<b>ΔΜΣ 0</b>	-0,348	0,035
	<b>D<sub>Testo</sub></b>	0,374	0,032
	<b>D<sub>FAI</sub></b>	0,495	0,003
<b>D<sub>CRP</sub></b>	<b>D<sub>Testo</sub></b>	-0,392	0,035
	<b>D<sub>Glucose</sub></b>	0,395	0,034
	<b>D<sub>HOMA</sub></b>	0,459	<0,001
	<b>D<sub>Insulin</sub></b>	0,448	<0,001

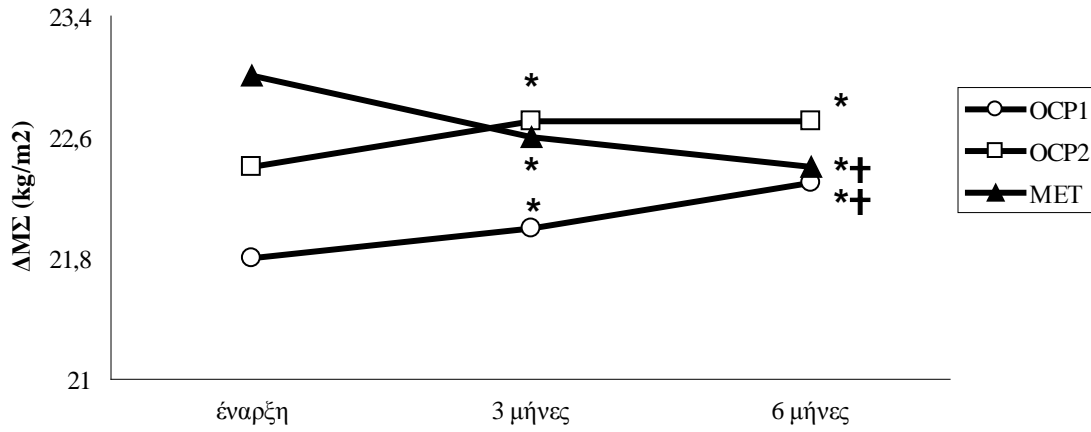
**β) Ομάδα OCP2 (n=36)**

		<b>R</b>	<b>P</b>
<b>D<sub>AGES</sub></b>	<b>ΔΜΣ 0</b>	-0,439	0,008
	<b>Testo 0</b>	-0,344	0,043
<b>D<sub>CRP</sub></b>	<b>D<sub>Testo</sub></b>	-0,428	0,012

**γ) Ομάδα MET(n=35)** Για την ομάδα MET δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση των **D<sub>AGES</sub>** και **D<sub>CRP</sub>** με άλλες παραμέτρους



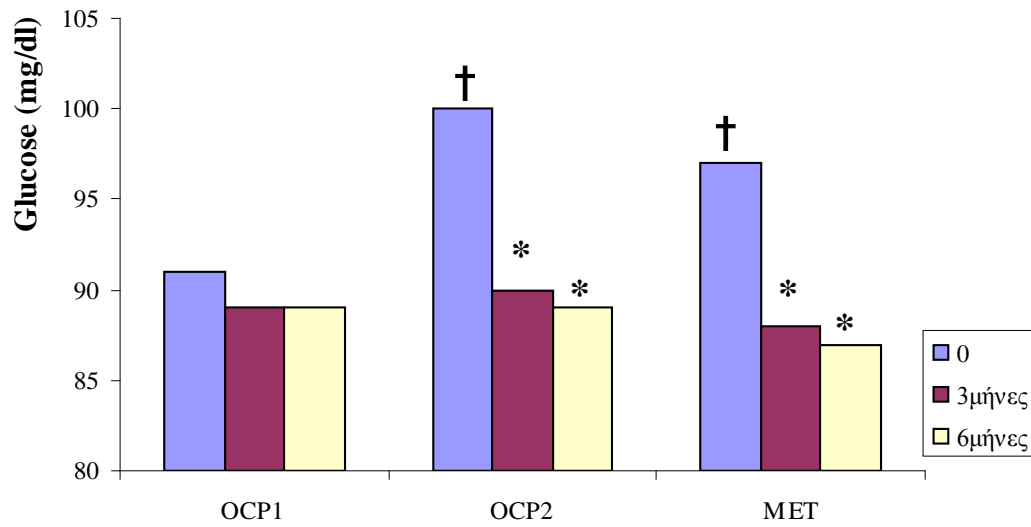
**Γράφημα 1.** Ο δείκτης μάζας σώματος στις τρεις χρονικές φάσεις ανά ομάδα



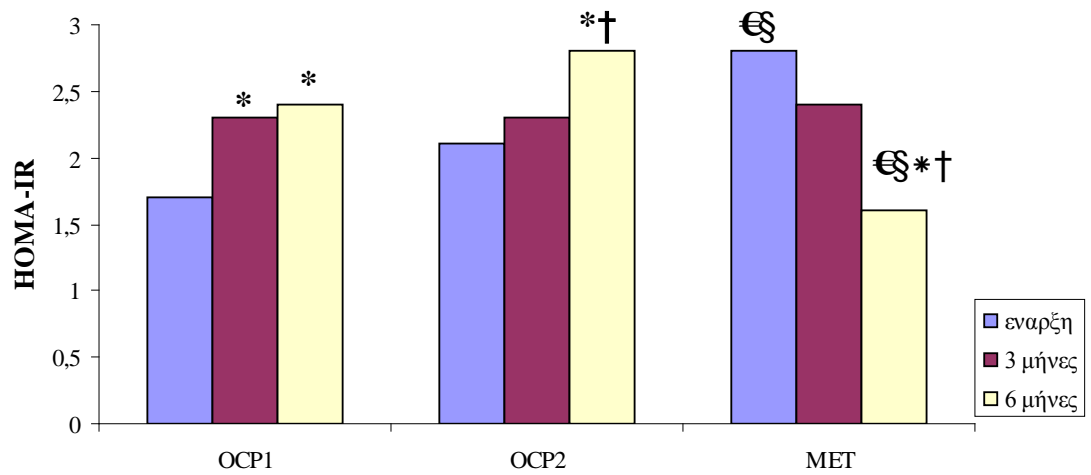
\*  $P < 0.05$  συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

†  $P < 0.05$  συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

**Γράφημα 2** Επίπεδα γλυκόζης ορού στις τρεις χρονικές φάσεις της μελέτης ανά ομάδα



**Γράφημα 3.** Επίπεδα HOMA-IR στις τρεις χρονικές φάσεις της μελέτης ανά ομάδα



\* P<0.05 συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

†P<0.05 συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

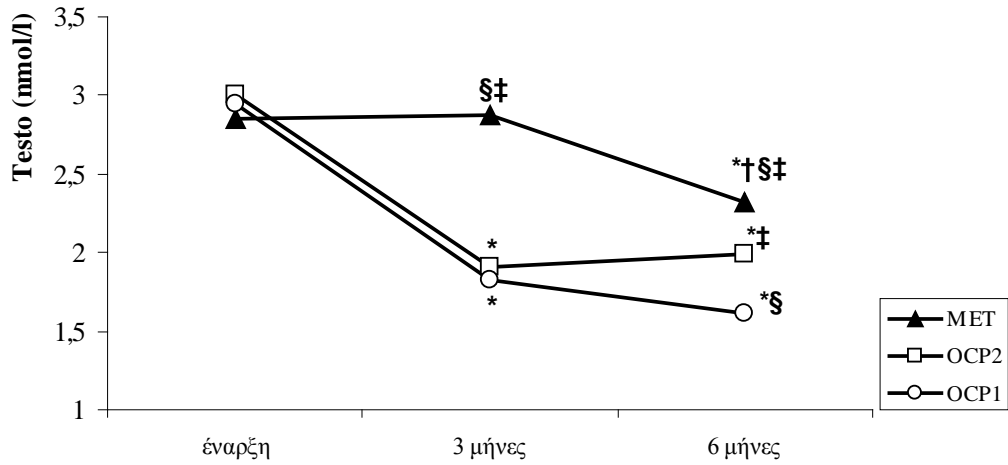
€P<0,05 συγκριτικά με το OCP1 στην ίδια χρονική φάση

§ P<0,05 συγκριτικά με το OCP2 στην ίδια χρονική φάση

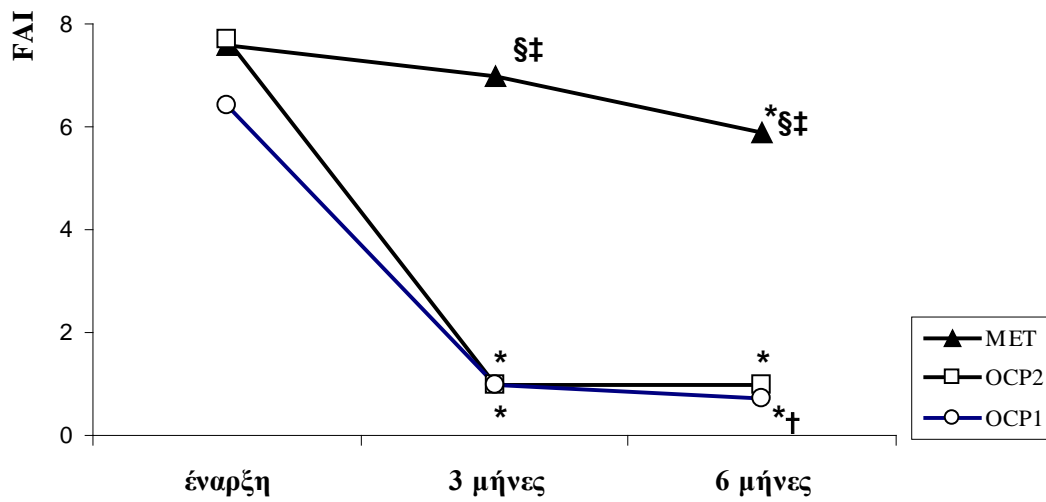
#### Γράφημα 4

- α) Επίπεδα τεστοστερόνης ορού στις τρεις χρονικές φάσεις ανά ομάδα  
 β) Επίπεδα FAI στις τρεις χρονικές φάσεις ανά ομάδα

α)



β)



\*P<0.05 συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

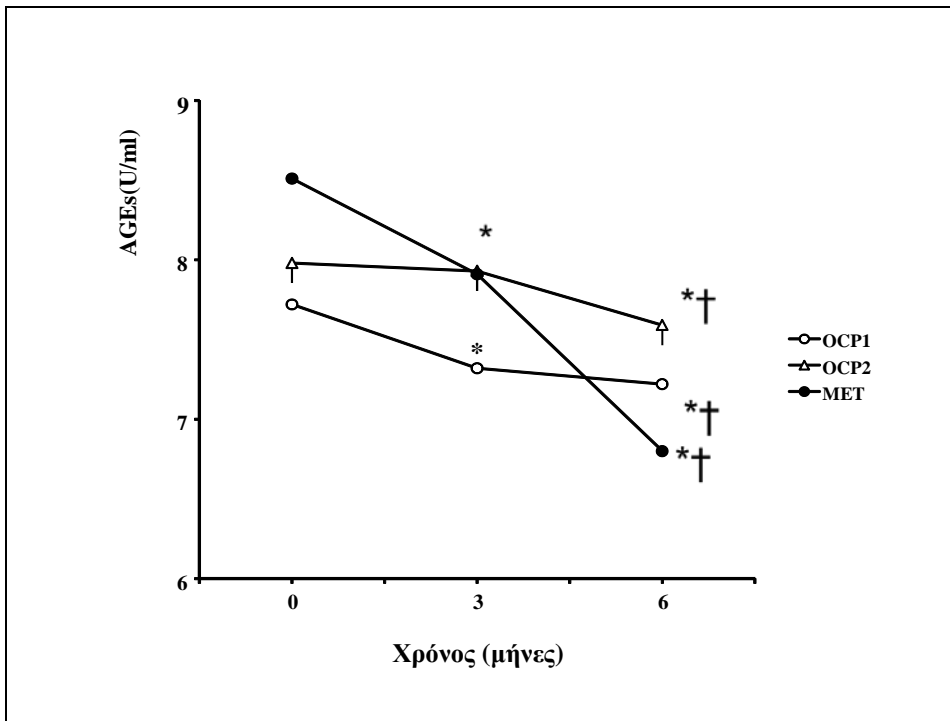
†P<0.05 συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

‡P<0,05 συγκριτικά με το OCP1 στην ίδια χρονική φάση

§ P<0,05 συγκριτικά με το OCP2 στην ίδια χρονική φάση

†

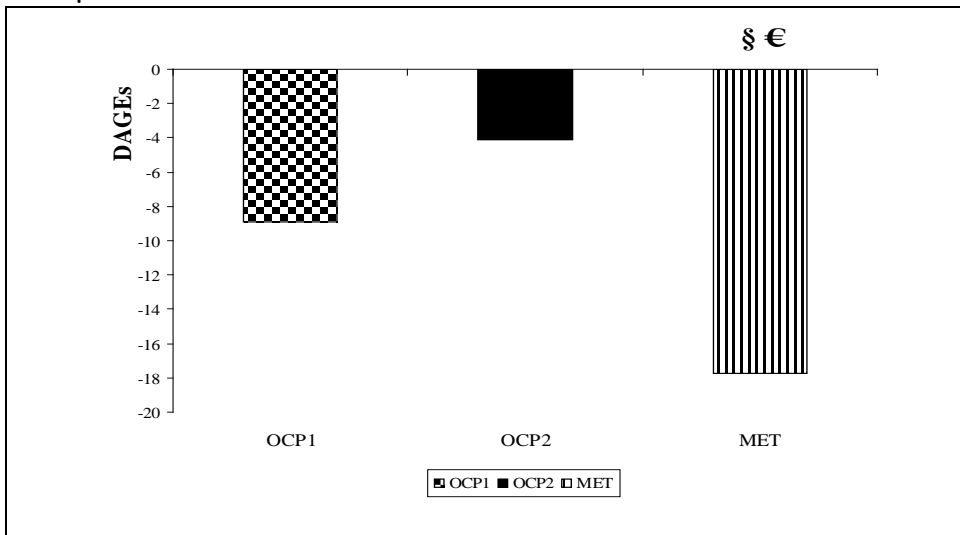
**Γράφημα 5.** Επίπεδα AGEs ορού στις τρεις φάσεις της μελέτης ανά ομάδα



\* P<0.05 συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

† P<0.05 συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

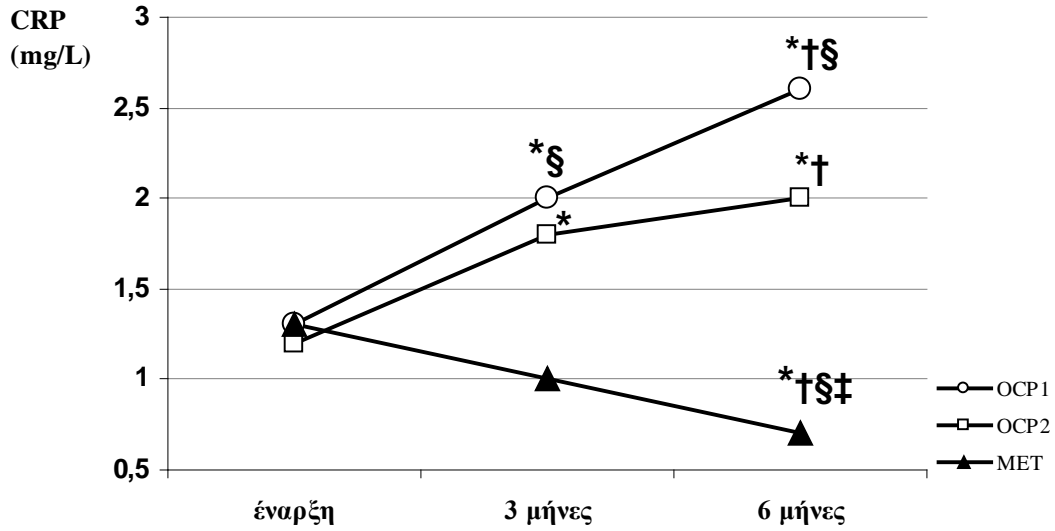
**Γράφημα 6.** Ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων AGEs ορού στους έξι μήνες ( $D_{AGEs}$ ) ανά ομάδα



€P<0,05 συγκριτικά με το OCP1

§ P<0,05 συγκριτικά με το OCP2

**Γράφημα 7.** Επίπεδα CRP ορού στις τρεις χρονικές φάσεις ανά ομάδα



\* P<0.05 συγκριτικά με την έναρξη στην ίδια ομάδα

† P<0.05 συγκριτικά με τους 3 μήνες στην ίδια ομάδα

€P<0,05 συγκριτικά με το OCP1 στην ίδια χρονική φάση

§ P<0,05 συγκριτικά με το OCP2 στην ίδια χρονική φάση

#### 4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η αναθεώρηση της θεραπευτικής προσέγγισης του ΣΠΩ ,που απορρέει από την κατανόηση της σύνθετης παθοφυσιολογίας του, ανέδειξε νέες προτεραιότητες. Ειδικότερα, η συνδυασμένη αντιμετώπιση των αναπαραγωγικών και των μεταβολικών διαταραχών του συνδρόμου και η βελτίωση των αθηρογόνων δεικτών πιθανόν αποτελούν κριτήρια για την επιτυχή,σφαιρική θεραπεία του συνδρόμου. Ως εκ τούτου, ένα από τα ερωτήματα τα οποία καλείται να απαντήσει η σύγχρονη έρευνα είναι αν οι ήδη υπάρχουσες φαρμακευτικές παρεμβάσεις ικανοποιούν τους πολλαπλούς θεραπευτικούς στόχους που αναφέρθηκαν.

Η παρούσα μελέτη συνέκρινε για πρώτη φορά την επίδραση δύο διαφορεικών αντισυλληπτικών δισκίων και της μετορμίνης στα επίπεδα AGEs και CRP στον ορό μη λεπτόσωμων γυναικών με ΣΠΩ. Τόσο τα αντισυλληπτικά δισκία όσο και η μετορμίνη, οι δύο επικρατέστερες φαρμακευτικές παρεμβάσεις στο ΣΠΩ, ελάττωσαν σημαντικά τα επίπεδα AGEs ορού. Αυτή η μεταβολή είχε ανεξάρτητη συσχέτιση μόνο με το είδος του φαρμάκου και τον αρχικό δείκτη μάζας σώματος, ανεξαρτήτως λοιπών παραμέτρων.Ωστόσο,η ελάττωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις γυναίκες που έλαβαν μετορμίνη συγκριτικά με εκείνες που έλαβαν αντισυλληπτικά.

Παράλληλα, η αγωγή με ΣΑΔ είχε δυσμενείς επιδράσεις στις μεταβολικές παραμέτρους και στους αθηρογόνους δείκτες. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση του ΔΜΣ,της ινσουλिनoαντίστασης και της CRP και στις δύο ομάδες των ασθενών που έλαβαν ένα από τα δύο υπό μελέτη αντισυλληπτικά δισκία. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες σε γυναίκες με ΣΠΩ(*Morin-Papunen et al., 2003a; Nader & Diamanti-Kandarakis 2007; Mastorakos et al.,2006; Teede et al.,2010*).

Επομένως, τα αντισυλληπτικά φαίνεται να έχουν θετικές και αρνητικές επιδράσεις στις μεταβολικές παραμέτρους και τους αθηρογόνους δείκτες. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη μικτή επίδραση,η εκτίμηση οφέλους-κινδύνων από τα ΣΑΔ πρέπει να εστιάζεται όχι μόνο στα χαρακτηριστικά των ασθενών,όπως έχει ήδη αναφερθεί από άλλους ερευνητές (*Nader & Diamanti-Kandarakis 2007*), αλλά και στον εκάστοτε αθηρογόνο δείκτη,τον οποίο στοχεύει η θεραπευτική παρέμβαση. Ακόμα και σε λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ τα ΣΑΔ μπορεί να μην είναι η ενδεδειγμένη θεραπευτική επιλογή σε όλες τις περιπτώσεις. Η μετορμίνη μπορεί να πλεονεκτεί έναντι των ΣΑΔ, όταν η θεραπεία έχει ως πρώτιστο στόχο την βελτίωση των μεταβολικών παραμέτρων και των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της ελάττωσης των επιπέδων AGEs και CRP.

Το είδος του αντισυλληπτικού φαίνεται να διαφοροποιεί εν μέρει τις καρδιομεταβολικές επιδράσεις της αντισυλληπτικής αγωγής. Στην παρούσα μελέτη, το OCP2 (DRSP pill) οδήγησε σε μικρότερη αύξηση του ΔΜΣ και της CRP συγκριτικά με το OCP1 (CPA pill). Δεδομένου ότι η CRP έχει συσχετισθεί ευθέως με τον κίνδυνο οξέων στεφανιαίων επεισοδίων, η διαφορά των δύο ΣΑΔ ως προς τη μεταβολή της CRP μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές συνέπειες (*Corrado, et al,2010*). Ειδικότερα, η περιεκτικότητα του οιστρογονικού συστατικού ανά δισκίο και το είδος του προγεσταγόνου φαίνεται να καθορίζουν εν μέρει τις καρδιομεταβολικές επιδράσεις της αντισυλληπτικής αγωγής.

Το αγγειακό τοίχωμα φαίνεται να αποτελεί έναν από τους ιστούς-στόχους των οιστρογόνων, τα οποία ασκούν είτε θετικές είτε δυσμενείς δράσεις με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ωφέλιμο «δοσολογικό εύρος» των εξωγενώς χορηγούμενων οιστρογόνων είναι περιορισμένο. Ως εκ τούτου, η επωφελής αγγειακή δράση τους αναστρέφει σε μελέτες, όπου χορηγήθηκαν μεγαλύτερες δόσεις οιστρογόνων, που οδήγησαν σε υψηλές, εντός των φυσιολογικών ορίων, συγκεντρώσεις οιστρογόνων (Rusa et al., 1999). Κατά συνέπεια, τα ΣΑΔ με μεγαλύτερη δόση ΕΕ πιθανόν οδηγούν σε επίπεδα οιστρογόνων στους ιστούς που υπερβαίνουν το ωφέλιμο «δοσολογικό εύρος». Στην παρούσα μελέτη το OCP1 (CPA pill) είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα ΕΕ ανά δισκίο συγκριτικά με το OCP2, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στη μεγαλύτερη άνοδο της CRP με το OCP1. Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την πιθανή αλληλεπίδραση της CRP και του υποδοχέα των AGEs (RAGE) μέσω ενεργοποίησης του οιστρογονικού υποδοχέα estrogen receptor- $\alpha$  (Mukherjee et al., 2005; Mukhopadhyay & Mukherjee 2005). Ειδικότερα, τα οιστρογόνα συνδεόμενα με τον υποδοχέα ER $\alpha$  και μέσω αυτού με το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ενεργοποιούν τον προαγωγέα του RAGE γονιδίου και επάγουν την έκφραση του RAGE (Mukhopadhyay et al., 2005; Mukherjee et al., 2005). Η πιθανή οιστρογονοεπαγόμενη αύξηση της έκφρασης του RAGE μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στο ΣΠΩ, που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα AGEs. Ο RAGE αλληλεπιδρώντας με τα AGEs και άλλους συνδέτες ενεργοποιεί τον καταρράκτη της φλεγμονής μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF $\kappa$ B. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η έκφραση μιας πλειάδας προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων μορίων, συμπεριλαμβανομένης της CRP (Kislinger et al., 2001; Schmidt et al., 1999).

Επιπλέον, τα δύο αντισυλληπτικά που χορηγήθηκαν στην παρούσα μελέτη διέφεραν ως προς το είδος του προγεσταγονικού συστατικού, γεγονός που επίσης μπορεί να συνετέλεσε στις διαφορετικές καρδιομεταβολικές επιδράσεις τους. Η DRSP, το προγεσταγόνο του OCP2, στερείται ανδρογονικής και γλυκοκορτικοειδικής δράσης ενώ διαθέτει αντιαλατοκορτικοειδική δράση, ιδιότητες που την διαφοροποιούν από την CPA, το προγεσταγόνο του OCP1. Τα πιθανά οφέλη της DRSP έναντι της CPA, πιθανόν έχουν ειδικό ενδιαφέρον για το ΣΠΩ, εφόσον περιλαμβάνουν μικρότερη ή μηδενική αύξηση του σωματικού βάρους και των δεικτών φλεγμονής (Muhn et al., 1995; Palacios et al., 2006).

Δεδομένου ότι η χρόνια φλεγμονή και οι αντιδράσεις γλυκοοξειδωσης φαίνεται να έχουν παθοφυσιολογικό ρόλο στο σύνδρομο (Diamanti-Kandarakis et al., 2008; Gonzalez 2012), τα AGEs και η CRP μπορεί να αποτελούν σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους στις γυναίκες με ΣΠΩ. Ειδικότερα, οι μεταβολές των AGEs πιθανόν εμπλέκονται όχι μόνο στις καρδιομεταβολικές αλλά και στις αναπαραγωγικές διαταραχές του συνδρόμου (Diamanti-Kandarakis et al., 2008; Gonzalez 2012; Christakou & Diamanti-Kandarakis 2013; Jabbour et al., 2009).

Η ποσοστιαία ελάττωση των επιπέδων AGEs κατά την εξάμηνη αγωγή με αντισυλληπτικά δισκία (ομάδες OCP1 και OCP2) συσχετίστηκε με την ποσοστιαία ελάττωση των επιπέδων τεστοστερόνης ορού, η οποία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις ομάδες των αντισυλληπτικών δισκίων συγκριτικά με την ομάδα της μετοφορμίνης. Αυτή η συσχέτιση είναι συμβατή με τη γνωστή από προηγούμενες μελέτες ανεξάρτητη, άμεση συσχέτιση των επιπέδων AGEs με τα επίπεδα τεστοστερόνης ορού στις γυναίκες με ΣΠΩ (Diamanti-Kandarakis et al., 2005a; Diamanti-Kandarakis et al., 2008).

Επομένως, η ιδιότητα των ΣΑΔ να ελαττώνουν την υπερανδρογοναιμία στις γυναίκες με ΣΠΩ πιθανόν συμβάλλει στην ελάττωση των AGEs. Αντιστρόφως, η ελάττωση των AGEs πιθανόν συντελεί στην βελτίωση των ενδοκρινικών παραμέτρων και της ωοθηκικής λειτουργίας των γυναικών με ΣΠΩ. Ο πιθανός ρόλος των AGEs στην ωοθηκική λειτουργία υποστηρίζεται από μελέτες που εντόπισαν AGEs σε όλα τα διαμερίσματα της ανθρώπινης ωοθήκης με μεγαλύτερη συγκέντρωσή στις ωοθήκες των γυναικών με ΣΠΩ συγκριτικά με τις ωοθήκες υγιών μαρτύρων (*Diamanti-Kandarakis et al., 2007c*). Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα σε αρουραίους έδειξαν ότι η διατροφική πρόσληψη AGEs αύξησε την ωοθηκική εναπόθεση των AGEs, επιδείνωσε την υπερανδρογοναιμία και κατέστειλε το ενζυμικό σύστημα κάθαρσης των AGEs στις ωοθήκες (*Diamanti-Kandarakis et al., 2007b; Diamanti-Kandarakis et al., 2007d; Kandaraki et al., 2012*).

Συγκρινόμενη με τα αντισυλληπτικά δισκία, η μετορμίνη πιθανόν υπερέχει στη συνολική βελτίωση των καρδιομεταβολικών παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένων του δείκτη μάζας σώματος, του δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR, των AGEs και της CRP. Η ελάττωση των AGEs στην ομάδα της μετορμίνης ήταν ανεξάρτητη των μεταβολών των ανδρογόνων, της ινσουλινοαντίστασης και της CRP. Συνεπώς, είναι πιθανό ότι η μετορμίνη επιδρά άμεσα στις οδούς παραγωγής ή δράσης των AGEs. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι η μετορμίνη αντιδρά με τα AGEs στον εξωκυττάριο χώρο οδηγώντας στο σχηματισμό αδρανών προϊόντων συμπύκνωσης. Επιπλέον, η μετορμίνη φαίνεται να έχει μέτρια δραστηριότητα στη διάσπαση των δεσμών των AGEs με τις πρωτεΐνες (*Beisswenger & Ruggiero-Lopez 2003; Tanaka et al., 1997*). Συνεπώς, η μετορμίνη φαίνεται να δρα τόσο ως αναστολέας της γλυκοζυλίωσης όσο και ως διασπαστής των δεσμών των AGEs με τα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μόρια.

Η παρούσα μελέτη είχε περιορισμούς. Ο μικρός αριθμός γυναικών που συμμετείχαν σε κάθε ομάδα φαρμακευτικής παρέμβασης πιθανόν περιορίσει τη δυνατότητα της μελέτης να αναδείξει το πλήρες φάσμα των επιδράσεων της θεραπείας στις υπό μελέτη παραμέτρους και τις μεταξύ τους συσχετίσεις. Επιπλέον, η μελέτη βασίστηκε στον προσδιορισμό βιοχημικών δεικτών καρδιαγγειακού κινδύνου, οι οποίοι δεν αντικατοπτρίζουν πλήρως και επακριβώς τις πιθανές κλινικές επιπτώσεις της φαρμακευτικής παρέμβασης στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα.

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1) Τα αντισυλληπτικά δισκία και η μετορμίνη είχαν διαφορετικές επιδράσεις στο σωματικό βάρος, στον δείκτη ινσουλινοαντίστασης, στα επίπεδα AGEs και CRP,
- 2) Τα δυο αντισυλληπτικά δισκία αύξησαν τον δείκτη μάζας σώματος, τον βαθμό ινσουλινοαντίστασης και την CRP, ενώ ελάττωσαν τα επίπεδα AGEs. Συνεπώς, τα ΣΑΔ εμφανίζουν μικτές επιδράσεις στους αθηρογόνους δείκτες, ενώ φαίνεται να επιδεινώνουν το μεταβολικό φαινότυπο.
- 3) Η μετορμίνη ελάττωσε τον βαθμό ινσουλινοαντίστασης και τους αθηρογόνους δείκτες στις λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ. Συγκριτικά με τα ΣΑΔ η μετορμίνη φαίνεται να επιτυγχάνει μεγαλύτερο βαθμό ελάττωσης των AGEs.
- 4) Το είδος του αντισυλληπτικού διαφοροποιεί τις επιδράσεις του στις μεταβολικές παραμέτρους και στους αθηρογόνους δείκτες. Το αντισυλληπτικό με υψηλότερη δόση οιστρογόνου και οξεική κυπροτερόνη οδήγησε σε μεγαλύτερου βαθμού αύξηση του



ΔΜΣ και της CRP συγκριτικά με το αντισυλληπτικό με χαμηλότερη δόση οιστρογόνου και δροσπιρενόνη.

Τα συμπεράσματα αυτής της μελέτης αφορούν τις λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ και δεν μπορούν να γενικευθούν σε υπέρβαρες ή παχύσαρκες ασθενείς, οι οποίες λόγω διαφορετικού μεταβολικού φαινοτύπου πιθανόν εμφανίζουν διαφορετικές μεταβολές των μεταβολικών και αθηρογόνων δεικτών υπό τη φαρμακευτική παρέμβαση. Συνεπώς, η θεραπευτική απόφαση στις γυναίκες με ΣΠΩ περιλαμβάνει καταρχάς την επιλογή ανάμεσα στις διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων (αντισυλληπτικά έναντι μετφορμίνης). Εφόσον επιλεγεί η χορήγηση αντισυλληπτικής αγωγής, ο ιατρός πρέπει να καθορίζει το είδος του αντισυλληπτικού δισκίου ως προς την περιεκτικότητα οιστρογόνου και το είδος του προγεσταγόνου. Στη διάρκεια της φαρμακευτικής παρέμβασης απαιτείται παρακολούθηση των μεταβολικών παραμέτρων και των αθηρογόνων δεικτών και επί επιδείνωσης πιθανή τροποποίηση της αγωγής.

Συμπερασματικά, η κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΣΠΩ οδήγησε σε αλλαγή των θεραπευτικών προτεραιοτήτων με έμφαση στη βελτίωση των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου. Ωστόσο, αυτές οι φαρμακευτικές παρεμβάσεις έχουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα στην πολύπλευρη αντιμετώπιση του ΣΠΩ. Ο ιατρός θα πρέπει να ελέγχει τακτικά τις υπό θεραπεία ασθενείς για την αποφυγή δυσμενών καρδιομεταβολικών επιδράσεων, όπως το πράττει στην αντιμετώπιση άλλων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Βιβλιογραφικό υπόβαθρο:** Η αναθεώρηση της θεραπευτικής προσέγγισης του ΣΠΩ με βάση την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ανέδειξε νέες θεραπευτικές προτεραιότητες. Η συνδυασμένη αντιμετώπιση των αναπαραγωγικών και των μεταβολικών διαταραχών του συνδρόμου και η βελτίωση των αθηρογόνων δεικτών πιθανόν αποτελούν κριτήρια για την επιτυχή και σφαιρική θεραπεία του. Ως εκ τούτου, τίθεται το ερώτημα αν οι διαθέσιμες φαρμακευτικές παρεμβάσεις ικανοποιούν τους προαναφερόμενους θεραπευτικούς στόχους. Σ' αυτό το πλαίσιο η υπάρχουσα σχετική βιβλιογραφία εξετάζει τις δύο επικρατέστερες φαρμακευτικές παρεμβάσεις στο ΣΠΩ, τα αντισυλληπτικά δισκία (ΣΑΔ) και τη μετφορμίνη. Σε ορισμένες από τις σχετικές μελέτες τα ΣΑΔ είχαν ουδέτερη ή επιβαρυντική επίδραση, ενώ η μετφορμίνη φαίνεται να βελτιώνει τόσο τις μεταβολικές παραμέτρους όσο και τα επίπεδα των αθηρογόνων δεικτών.

**Σκοπός:** Η παρούσα μελέτη συνέκρινε για πρώτη φορά την επίδραση δύο διαφορετικών αντισυλληπτικών δισκίων και της μετφορμίνης στα επίπεδα των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced glycation end products, AGEs) και της C-reactive protein (CRP) στον ορό λεπτόσωμων γυναικών με ΣΠΩ.

**Ασθενείς-μέθοδοι:** Εκατόν είκοσι λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες και έλαβαν εξάμηνη φαρμακευτική αγωγή με ένα από τα ακόλουθα φάρμακα: OCP1: συνδυασμός αιθυνλικής οιστραδιόλης με οξεϊκή κυπροτερόνη ή OCP2: συνδυασμός αιθυνλικής οιστραδιόλης με δροσπιρενόνη ή MET: μετφορμίνη.

**Αποτελέσματα:** Οι τρεις ομάδες δεν διέφεραν ως προς την ηλικία και τον δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ). Στους έξι μήνες φαρμακευτικής παρέμβασης τα επίπεδα AGEs ορού ελαττώθηκαν σε όλες τις ομάδες, αλλά ο βαθμός της ελάττωσης ήταν μεγαλύτερος με τη μετφορμίνη. Η θεραπεία με μετφορμίνη συσχετίστηκε θετικά με τον βαθμό ελάττωσης των AGEs ανεξαρτήτως λοιπών παραμέτρων. Τα επίπεδα CRP ελαττώθηκαν με τη μετφορμίνη, ενώ αυξήθηκαν με τα ΣΑΔ και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό με το OCP1 απ' ότι με το OCP2. Επιπλέον, τα αντισυλληπτικά είχαν δυσμενείς επιδράσεις στον ΔΜΣ και το Homeostatic assessment model of insulin resistance (HOMA-IR), ενώ η μετφορμίνη βελτίωσε και τις δύο παραμέτρους.

**Συμπεράσματα:** Τα ΣΑΔ και η μετφορμίνη είχαν διαφορετικές επιδράσεις στους αθηρογόνους δείκτες των λεπτόσωμων γυναικών με ΣΠΩ, αλλά η αγωγή με μετφορμίνη ήταν πιο αποτελεσματική ως προς την ελάττωση των AGEs και της CRP. Αυτά τα αποτελέσματα αφορούν τις λεπτόσωμες γυναίκες με ΣΠΩ και δεν μπορούν να γενικευθούν σε όλο το εύρος του ΔΜΣ των γυναικών με ΣΠΩ. Η σχέση κόστους-οφέλους από την φαρμακευτική αγωγή σε συνδυασμό με τις θεραπευτικές προτεραιότητες και την αρχική κλινικοεργαστηριακή εικόνα της ασθενούς αποτελούν βασικά κριτήρια στην επιλογή της καταλληλότερης φαρμακευτικής παρέμβασης. Στόχος είναι η συνδυαστική αντιμετώπιση του συνδρόμου με την αποτελεσματικότερη, αλλά και ασφαλέστερη από πλευράς ανεπιθύμητων ενεργειών φαρμακευτική αγωγή. Κατά τη διάρκεια της αγωγής πρέπει να ελέγχεται η θεραπευτική ανταπόκριση συμπεριλαμβανόμενων των μεταβολικών και αθηρογόνων δεικτών σε κάθε γυναίκα με ΣΠΩ.

## **ABSTRACT**

**Background :** Current knowledge on the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS) has created a new framework for the treatment of the syndrome, which includes the need for amelioration of atherogenic markers which may be elevated in women with the syndrome. The costs and benefits of two most commonly prescribed pharmaceutical treatments in PCOS, oral contraceptives (OCPs) and metformin have been studied in this framework. Metformin appears to alleviate the cardiovascular risk associated with PCOS, while OCPs may have a neutral or aggravating effect on atherogenic markers.

**Objective:** The present work compares the effects of two types of OCPs and metformin on atherogenic markers, including serum levels of Advanced Glycated End products (AGEs) and C-reactive protein (CRP), in lean women with PCOS.

**Design:** Prospective open-label study

**Results:** One hundred and twenty women with PCOS were treated for six months with one of the following treatments: ethinylestradiol plus cyproterone acetate (OCP 1) or ethinylestradiol plus drospirenone (OCP2) or metformin (MET). The three groups were matched for age and body mass index (BMI). At six months serum AGEs were decreased in all groups, but the decrease was greater with metformin. Treatment with metformin was associated with a greater percent decrease of AGEs. CRP was decreased with metformin, but increased with OCPs, to a greater degree with OCP1 compared to OCP2.

**Conclusions:** This study attempts to evaluate common therapeutic options in women with PCOS by reconsidering and prioritizing the goals of treatment. OCPs and metformin appear to have differential effects on atherogenic molecules in lean PCOS patients, but metformin was superior in reducing serum AGEs and CRP. Clinicians should individualise the benefit-to-risk ratio of pharmaceutical intervention in women with PCOS, in order to choose the formulation with the greatest efficacy and safety in terms of cardiovascular risk.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10: 49
- Ågren UM, Anttila M, Mäenpää-Liukko K, et al. Effects of a monophasic combined oral contraceptive containing norgestrel acetate and 17 $\beta$ -oestradiol compared with one containing levonorgestrel and ethinylestradiol on haemostasis, lipids and carbohydrate metabolism. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2011; 16: 444–457.
- Al-Khalili L, Forsgren M, Kannisto K, Zierath JR, Lönnqvist F, Krook A. Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* 2005; 48(6):1173-9.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23(5):469-80.
- Alexander BT, Cockrell KL, Rinewalt AN, Herrington JN, and Granger JP. Enhanced renal expression of preproendothelin mRNA during chronic angiotensin II hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1388–R1392.
- Alexandre KB, Smit AM, Gray IP, Crowther NJ Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1. *Diabetes Obes Metab*. 2008; 10(8):688-90.
- Amato MC, Verghi M, Galluzzo A, Giordano C. The oligomenorrhoeic phenotypes of polycystic ovary syndrome are characterized by a high visceral adiposity index: a likely condition of cardiometabolic risk. *Hum Reprod*. 2011; 26(6):1486-94.
- Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1929-1935.
- Arai M, Uchiba M, Komura H, Mizuochi Y, Harada N, Okajima K. Metformin, an Antidiabetic Agent, Suppresses the Production of Tumor Necrosis Factor and Tissue Factor by Inhibiting Early Growth Response Factor-1 Expression in Human Monocytes in Vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010; 334:206-213.
- Arner P. Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome. *Biochimie* 2005;87:39-43.
- Atiomo WU, Bates SA, Condon JE, Shaw S, West JH, Prentice AG. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998; 69:236–241.
- Attia G, Rainey W & Carr B. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil. Steril*. 2001;76: 517-524.
- Azziz R. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol* 2006b;91(3):781-5.
- Azziz R, Black V, Hines GA, Fox LM, Boots LR. Adrenal androgen excess in the polycystic ovary syndrome: sensitivity and responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2317–2323.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006a; 91:4237-4245.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009; 91(2):456-88.

Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key T, Knochenhauer E, Yildiz B. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 ;89(6):2745-9.

Ashokkumar N, Pari L. Effect of N-benzoyl-D-phenylalanine and metformin on carbohydrate metabolic enzymes in neonatal streptozotocin diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2005 ;351(1-2):105-13.

Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2434.

Baillargeon JP, et al. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3863–3870.

Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011 ;121(2):43-55.

Barrett-Connor E & Goodman-Gruen D. Prospective study of endogenous sex hormones and fatal cardiovascular disease in postmenopausal women. *BMJ* 1995; 311 1193–1196.

Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63: 582– 592.

Batukan C, Muderris II. Efficacy of a new oral contraceptive containing drospirenone and ethinyl estradiol in the long-term treatment of hirsutism. *Fertil Steril*. 2006;85(2):436-40.

Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1708–16.

Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 198– 202.

Beisswenger PJ, Ruggiero-Lopez D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* 2003;29 (4 II): 6S95-6S103.

Bird ST, Hartzema AG, Brophy JM, Etminan M, Delaney JA, et al. Risk of venous thromboembolism in women with polycystic ovary syndrome: a population-based matched cohort analysis. *CMAJ* 2013; 185: E115-E120.

Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Peters SL, et al. Effects of CRP infusion on endothelial function and coagulation in normocholesterolemic and hypercholesterolemic subjects. *J Lipid Res* 2007; 48: 952–960.

Blank S, McCartney C and Marshall J. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 2006; 12 (4): 351-361.

Bogaty P, Dagenais GR, Joseph L, Boyer L, Leblanc A, Bélisle P, et al. Time variability of C-reactive protein: implications for clinical risk stratification. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60759.

Bohler H Jr, Mokshagundam S, Winters SJ. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril*. 2010; 94(3):795-825.

Bonetti P, Lerman L, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:168–175.

Boomsma C, Eijkemans M, Hughes E, Visser G, Fauser B, Macklon N. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006;12:673–83.

Bousser M, Conard J, Kittner S et al. Recommendations on the risk of ischaemic stroke associated with use of combined oral contraceptives and hormone replacement therapy in women with migraine. The International Headache Society Task Force on Combined Oral Contraceptives & Hormone Replacement Therapy. *Cephalalgia* 2000; 20: 155–156.

Bousser M & Kittner S. Oral contraceptives and stroke. *Cephalalgia* 2000; 20: 183–189.

Braunstein G, Johnson B, Stanczyk F, Bittner V, Berga S, Shaw L, et al. Relations between endogenous androgens and estrogens in postmenopausal women with suspected ischemic heart disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 :4268–4275.

Britten M, Zeiher A & Schachinger V. Microvascular dysfunction in angiographically normal or mildly diseased coronary arteries predicts adverse cardiovascular long-term outcome. *Coronary Artery Disease* 2004;15: 259–264

Cagnacci A, Ferrari S, Tirelli A et al. Route of administration of contraceptives containing desogestrel/etonogestrel and insulin sensitivity: a prospective randomized study. *Contraception* 2009; 80: 34–39.

Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003;108:1930–2.

Carmassi F, De Negri F, Fioriti R, De Giorgi A, Giannarelli C, Fruzzetti F, et al. Insulin resistance causes impaired vasodilation and hypofibrinolysis in young women with polycystic ovary syndrome. *Thromb Res.* 2005;116(3):207-14.

Carvajal R, Rosas C, Kohan K, Gabler F, Vantman D, Romero C, et al. Metformin augments the levels of molecules that regulate the expression of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the endometria of hyperinsulinemic PCOS patients *Hum Reprod* 2013; 0: det116v1-det116.

Cascella T, Palomba S, De Sio I, Manguso F, Giallauria F, De Simone B et al. Visceral fat is associated with cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2008;23:153-9.

Cassese A, Esposito I, Fiory F, Barbagallo AP, Paturzo F, Mirra P, et al. In skeletal muscle advanced glycation end products (AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs. *J Biol Chem.* 2008;283(52):36088-99.

Chang YJ, Chan WH. Methylglyoxal has injurious effects on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development, via apoptosis. *Toxicol Lett* 2010;193:217–23.

Charitidou C, Farmakiotis D, Zournatzi V, et al. The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):958-65.

Chen J, Huang L, Song M, Yu S, Gao P, Jing J. C-reactive protein upregulates receptor for advanced glycation end products expression and alters antioxidant defenses in rat endothelial progenitor cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:359–367.

Chen Y, Naftilan A, and Oparil S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 1992;19: 456–463.

Chen Y, Zeleniuch-Jacquotte A, Arslan AA, Wojcik O, Toniolo P, Shore RE, et al. Endogenous hormones and coronary heart disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2011; 216 :414–419.

Christakou C, Diamanti-Kandarakis E. PCOS and cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des* 2013 Feb 20. [Epub ahead of print].

Christian R, Dumesic D, Behrenbeck T, Oberg A, Sheedy P, 2nd, Fitzpatrick L. Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*2003;88:2562-2568.

Ciaraldi T, Kong A, Chu N, et al Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; 51: 30–36.

Cleasby M, Dzamko N, Hegarty B, Cooney G, Kraegen E, Ye J. Metformin prevents the development of acute lipid-induced insulin resistance in the rat through altered hepatic signaling mechanisms. *Diabetes* 2004; 53:3258–3266.

Collier C, Bruce C, Smith A, Lopaschuk G, and Dyck D. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E182-E189.

Corbould A. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *J Endocrinol* 2007;192:585-594.

Corbould A. Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome? *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(7):520-32.

Corrado E, Rizzo M, Coppola G, et al. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 1–11.

Cussons A, Stuckey B, Watts G. Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: new insights and perspectives. *Atherosclerosis.* 2006 ;185(2):227-39.

Dahlgren E, Landin K, Krotkiewski M, Holm G, Janson P. Effects of two antiandrogen treatment on hirsutism and insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13:2706-2711.

Davis B, Xie Z, Viollet B, Zou M. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 2006; 55:496-505.

de Groot P, Dekkers O, Romijn J, Dieben S, Helmerhorst F. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011;17(4):495-500.

De Jager J, Kooy A, Lehert P, et al. Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2005; 257:100–109.

Denison F, Roberts K, Barr S and Norman J. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function *Reproduction* 2010; 140(3): 373-385.

Detaille D, Guigas B, Chauvin C, et al. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* 2005; 54:2179–2187.

Devaraj S, Xu D, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003; 107:398–404.

Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem*. 2009;55(2):229-38.

Dhar A, Dhar I, Jiang B, Desai K, Wu L. Chronic Methylglyoxal Infusion Minipump Causes Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction and Induces Type 2 Diabetes in Sprague-Dawley Rats. *Diabetes* 2011; 60:899-908.

Dicker A, Ryden M, Naslund E, Muehlen IE, Wiren M, Lafontan M, Arner P. Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia* 2004;47:420-428.

Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Piperi C, et al. Effect of metformin administration on plasma advanced glycation end product levels in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2007c ;56(1):129-34.

Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Protogerou A, et al. Metformin administration improves endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2005b;152:749–56.

Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandarakis E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010 ;162(2):193-212.

Diamanti-Kandarakis E, Katsikis I, Piperi C, Kandarakis E, Piouka A, Papavasiliou A, et al. Increased serum advanced glycation end products is a distinct finding in lean women with PCOS. *Clin Endocrinol* 2008;69 634–641.

Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Bergiele A, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4006.

Diamanti-Kandarakis E, Kouli C, Tsianateli T, Bergiele A. Therapeutic effects of metformin on insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 1998;138(3):269-74.

Diamanti-Kandarakis E, Panidis D. Unravelling the phenotypic map of polycystic ovary syndrome (PCOS): a prospective study of 634 women with PCOS. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007a;67(5):735-42.

Diamanti-Kandarakis E and Papavasiliou A. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome *Trends Mol Med* 2006; 12: 324-32.

Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, et al. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod* 2006; 21(6):1426-31.

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A & Creatsas G. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 2005a; 62 37–43.

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Korkolopoulou P, Kandarakis E, Levidou G, Papalois A, et al. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med (Berl)*. 2007d;85(12):1413-20.

Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Patsouris E, Korkolopoulou P, Panidis D, Pawelczyk L, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* 2007b;127 581–589.



Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C & Migdalis I. Increases endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4666–4673.

Dinger J, Heinemann L, Kühl-Habich D. The safety of a drospirenone-containing oral contraceptive: final results from the European Active Surveillance Study on oral contraceptives based on 142,475 women-years of observation. *Contraception*. 2007; 75(5):344-54.

Dokras A, Bochner M, Hollinrake E, Markham S, Vanvoorhis B, Jagasia D. Screening women with polycystic ovary syndrome for metabolic syndrome. *Obstet Gynecol*. 2005;106:131-137;

Dumesic D, Padmanabhan V, Abbott D. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv* 2008;63:39–48.

Dunaif A, Finegood D. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:942-947.

Ehrmann D, Barnes R, Rosenfield R, Cavaghan M, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diab Care* 1999;22:141-146.

Ehrmann D, Kasza K, Azziz R, Legro R, Ghazzi M. Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:66-71.

Ehrmann D, Liljenquist D, Kasza K, Azziz R, Legro R, Ghazzi M. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:48-53.

Ehrmann D, Breda E, Corcoran M, Cavaghan M, Imperial J, Toffolo G, et al. Impaired beta-cell compensation to dexamethasone-induced hyperglycemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 ;287(2):E241-6.

Escobar-Morreale H, Luque-Ramírez M, San Millán J. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev*. 2005; 26(2): 251-82.

Escobar-Morreale H, San Millán J. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 ;18(7):266-72.

Evans J, Maddux B, Goldfine I. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7-8):1040-52.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285(19): 2486-97.

Faulds G, Ryden M, Ek I, Wahrenberg H, Arner P 2003 Mechanisms behind lipolytic catecholamine resistance of subcutaneous fat cells in the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2269–2273.

Fausser B, Devroey P and Macklon N. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet* 2005; 365,1807–1816.

Fausser B, Tarlatzis B, Rebar R, Legro R, Balen A, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012; 97(1):28-38.

Fiory F, Lombardi A, Miele C, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E. *Diabetologia*. 2011 ;54(11):2941-52.

Franks S, Stark J and Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome *Hum Reprod Update* 2008; 14 (4): 367–378.

Furfaro A, Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, Puzzo A, Pronzato M, et al. Metalloproteinases and advanced glycation end products: coupled navigation in atherosclerotic plaque pathophysiology? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120(10): 586-90.

Gaidhu M, Fediuc S, Ceddia R. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal and insulin-stimulated glucose uptake, lipid synthesis, and fatty acid oxidation in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*. 2006; 281(36):25956-64.

Gallo MF, Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Helmerhorst FM. Combination contraceptives: effects on weight. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (9) CD 003987

Gaspard U, Endrikat J, Desager J et al. A randomized study on the influence of oral contraceptives containing ethinylestradiol combined with drospirenone or desogestrel on lipid and lipoprotein metabolism over a period of 13 cycles. *Contraception* 2004; 69: 271–278.

Gill R, Kemp JA, Sabin C, Pepys MB. Human C-reactive protein increases cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1214–1218.

Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:1158-1165.

Giudice L. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20(2):235-44.

Glintborg D, Hermann AP, Brusgaard K, Hangaard J, Hagen C, Andersen M. Significantly higher adrenocorticotropin-stimulated cortisol and 17-hydroxy-progesterone levels in 337 consecutive, premenopausal, caucasian, hirsute patients compared with healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 ;90(3):1347-53.

Glueck C, Papanna R, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism*. 2003;52:908-915.

Goldin A, Beckman J, Schmidt AM and Creager M. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* 2006;114:597-605

Goldstein B, Scalia R, Ma X. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009; 6(1): 27–35.

González F, Nair K, Daniels J, Basal E, Schimke J, Blair H. Hyperandrogenism sensitizes leukocytes to hyperglycemia to promote oxidative stress in lean reproductive-age women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 ;97(8):2836-43.

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan J. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006a;91:336–334

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Increased activation of nuclear factor  $\kappa$ B triggers inflammation and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006b;91:1508–1512.

Gonzalez F, Thusu K, Abdel-Rahman E, Prabhala A, Tomani M, Dandona P. Elevated serum levels of tumor necrosis factor alpha in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 1999;48(4):437-41.

Goodarzi M and Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab*. 2005; 7(6):654-65. Review.

Gourdy P. Diabetes and oral contraception. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27:67–76.

Greenland P, Alpert J, Beller G, et al. ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation* 2010; 122:e584 – 636.

Gugliucci, A. and Bendayan, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* 1996;39: 149–160

Guido M, Romualdi D, Giuliani M, Suriano R, Selvaggi L, Apa R, et al. Drospirenone for the treatment of hirsute women with polycystic ovary syndrome: a clinical, endocrinological, metabolic pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2817-23.

Habinowski SA, Witters LA. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 852–856 .

Halperin IJ, Kumar SS, Stroup DF, Laredo SE. The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Hum Reprod*. 2011; 26(1):191-201.

Harborne LR, Sattar N, Norman JE, Fleming R. Metformin and weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome: comparison of doses. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(8):4593-8.

Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:815-30.

Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006; 47(6):1183-8.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS and Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006; 12:13–21.

Hemelaar M, Kenemans P, Schalkwijk C, et al. No increase in C-reactive protein levels during intranasal compared to oral hormone therapy in healthy post-menopausal women. *Hum Reprod* 2006; 21: 1635–1642.

Hernandez RK. Risk of non-fatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives containing drospirenone compared with women using oral contraceptives containing levonorgestrel: case-control study using United States claims data. *Br Med J* 2011; 340: d2151.

Hirsch A, Hahn D, Kempná P, Hofer G, Nuoffer JM, Mullis PE, et al. Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain. *Endocrinology* 2012; 153(9):4354-66.

Holmang A, Larsson BM, Brzezinska Z, Bjorntorp P. Effects of short-term testosterone exposure on insulin sensitivity of muscles in female rats. *Am J Physiol* 1992;262:E851-E855.

Huang NL, Chiang SH, Hsueh CH, Liang YJ, Chen YJ, Lai LP. Metformin inhibits TNF-alpha-induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB-alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *Int J Cardiol.* 2009;134(2):169-75.

Hughesdon P. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called 'hyperthecosis'. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1982; 37, 59-77.

Iliescu R, Cucchiarelli VE, Yanes LL, Iles JW, Reckelhoff JF. Impact of androgen-induced oxidative stress on hypertension in male SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R731-R735.

Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, et al. Effects of Metformin and Rosiglitazone Monotherapy on Insulin-Mediated Hepatic Glucose Uptake and Their Relation to Visceral Fat in Type 2 Diabetes. *Diab Care* 2003; 26:2069-2074.

Ishibashi T, Kawaguchi M, Sugimoto K, Uekita H, Sakamoto N, Yokoyama K, et al. Advanced glycation end product-mediated matrix metallo-proteinase-9 and apoptosis via renin-angiotensin system in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(6):578-89.

Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthati VL, Falck JR, et al. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappa B activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324:103-110.

Jabbour H, Sales K, Catalano R, Norman J. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* 2009;138: 903-919.

Jabs W, Theissing E, Nitschke M, et al. Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue. *Circulation* 2003; 108: 1428-1431.

Jadhav S, Ferrell W, Greer IA, Petrie JR, Cobbe SM, Sattar N. Effects of metformin on microvascular function and exercise tolerance in women with angina and normal coronary arteries: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:956-963.

Jensterle M, Janez A, Mlinar B, Marc J, Prezelj J, Pfeifer M. Impact of metformin and rosiglitazone treatment on glucose transporter 4 mRNA expression in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2008;158:793-801.

Jialal I, Devaeaj S. Role of CRP in the assessment of cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 2003; 91: 200-2.

Jick SS & Gerstman BB, Piper JM, Freiman JP et al. Oral contraceptives oestrogen and progestin potencies and the incidence of deep venous thromboembolism. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 32-37.

Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Eguchi N, et al. Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and

achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2011; 26: 604–10.

Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*. 2004; 10:107-117.

Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact* 2008; 171:251–71.

Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Piperi C, Palioura E, Palimeri S, Korkolopoulou P, et al. Reduced ovarian glyoxalase-I activity by dietary glycotoxins and androgen excess: a causative link to polycystic ovarian syndrome. *Mol Med*. 2012; 18:1183-9.

Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodelling. *Cardiovasc Res* 2011;91: 546-555.

Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010; 375:132–40.

Kemmeren JM, Algra A & Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *Br Med J* 2001; 323: 1–9.

Ketel I, Serne E, Ijzerman R, Korsen T, Twisk J, Hompes P, et al. Insulin-induced capillary recruitment is impaired in both lean and obese women with PCOS. *Hum Reprod* 2011; 26 (11): 3130-3137.

Kim YB, Ciaraldi TP, Kong A, Kim D, Chu N, Mohideen P, et al. Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110beta protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; 51(2):443-8.

Kim DH, Puri N, Sodhi K, Falck J, Abraham N, Shapiro J, et al. Cyclooxygenase-2 dependent metabolism of 20-HETE increases adiposity and adipocyte enlargement in mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J. Lipid Res.* 2013;54:786-793.

Kim Y, Park K-G, Lee Y-S, et al. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes* 2008; 57(2):306 – 314.

Kislinger T, Tanji N, Wendt T, et al. Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21: 905–910.

Koenig W, Sund M, Frohlich M, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99: 237–42.

Korytkowski MT, Mookan M, Horwitz MJ, Berga SL. Metabolic effects of oral contraceptives in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3327-3334.

Kousta E, Cella E, Lawrence N, Penny A, Millauer B, White D, et al. The prevalence of polycystic ovaries in women with a history of gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 ;53(4):501-7.

Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou SN, et al. Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5088-95.

Krintus M, Sypniewska G, Kuligowska-Prusinska M. Effect of second and third generation oral contraceptives on C-reactive protein, lipids and apolipoproteins in young, non-obese, non-smoking apparently healthy women. *Clin Biochem* 2010; 43:626-628.

Kwok S, Canoy D, Ashton W, Lowe G, Wood D, Humphries S, et al. Increased C-reactive protein levels in overweight and obese women taking exogenous hormones: the United Kingdom Women's Heart Study (UKWHS). *Clin Endocrinol* 2009; 71: 727-732.

Lansdown A, Rees DA. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012; 77(6):791-801.

Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H2031-H2041.

Laughlin GA, Goodell V, Barrett-Connor E. Extremes of endogenous testosterone are associated with increased risk of incident coronary events in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(2):740-7.

Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med*. 2001; 111(8):607-13.

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

Lehman DW. Novel serum cardiac risk biomarkers: risk assessment for primary prevention. *Prim Care Case Rev* 2003; 6(3):121-8.

Lenhard JM, Klier SA, Paulik MA, Plunket KD, Lehmann JM, Weiel JE Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism: alterations of two distinct molecular pathways. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54(7):801-8.

Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 2004; 95:877-883.

Li J, Schmidt AM: Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem*. 1997; 272(26): 16498-16506.

Lidegaard Ø, Nielsen LH, Skovlund CW et al. Risk of venous thromboembolism from use of oral contraceptives containing different progestogens and oestrogen doses: Danish cohort study, 2001-9. *Br Med J* 2011; 343: d6423.

Lidegaard Ø, Løkkegaard E, Jensen A, Skovlund CW, Keiding N. Thrombotic Stroke and Myocardial Infarction with Hormonal Contraception. *N Engl J Med* 2012; 366:2257-66.

Lopez LM, Grimes DA & Schulz KF. Steroidal contraceptives: effect on carbohydrate metabolism in women without diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; 4: CD006133.

Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 327(7421): 951-3.

Lord J, Thomas R, Fox B, Acharya U, Wilkin T The central issue? Visceral fat mass is a good marker of insulin resistance and metabolic disturbance in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG* 2006a; 113: 1203–1209.

Lord J, Thomas R, Fox B, Acharya U, Wilkin T. The effect of metformin on fat distribution and the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome—a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BJOG*. 2006b; 113(7):817-24.

Lowe G, Upton M, Rumley A. et al. Different effects of oral and transdermal hormone replacement therapies on factor IX, APC resistance, t-PA, PAI and C-reactive protein: a cross-sectional population survey. *Thromb Haemost* 2001;86: 550–556

Madjid M and Willerson J. Inflammatory markers in coronary heart disease. *Br Med Bulletin* 2011; 100: 23–38.

Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lonn M, Stener Victorin E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2007; 3781-3791.

Mannerås-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Odén A, Holm G, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E304-311.

Manning JM, Edwards IJ, Wagner WD et al. Effects of contraceptive estrogen and progestin on the atherogenic potential of plasma LDLs in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 1216–1223

Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*. 2003; 79(4):956-62.

Martinez F, Ramirez I, Perez-Campos E, et al. Venous and pulmonary thromboembolism and combined hormonal contraceptives. Systematic review and meta-analysis. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2012; 17: 7–29.

Mastorakos G, Koliopoulos C, Deligeoroglou E, Diamanti-Kandarakis E, Creatsas G. Effects of two forms of combined oral contraceptives on carbohydrate metabolism in adolescents with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 2006;85: 420–427.

Mathieu-Costello O, Kong A, Ciaraldi TP, et al. Regulation of skeletal muscle morphology in type 2 diabetic subjects by troglitazone and metformin: relationship to glucose disposal. *Metabolism* 2003; 52: 540–546.

Matsumine M, Shibata N, Ishitani K, Kobayashi M, Ohta H. Pentosidine accumulation in human oocytes and their correlation to age-related apoptosis. *Acta Histochem Cytochem* 2008; 41:97–104.

Mendez JD, Xie J, Aguilar-Hernandez M, Mendez-Valenzuela V. Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications. *Mol Cell Biochem*. 2010; 341(1-2):33-41.

Merz CN, Johnson BD, Berga S, Braunstein G, Reis SE, Bittner V, WISE Study Group. Past oral contraceptive use and angiographic coronary artery disease in postmenopausal women: data from the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women’s Ischemia Syndrome Evaluation. *Fertil Steril* 2006;85:1425–1431.

Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, et al. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin induced insulin receptor substrate (IRS) signalling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J Biol Chem* 78 (48): 47376-47387

Moggetti P, Tosi F, Bonin C, Sarra D, Fiers T, Kaufman JM, et al. Divergences in Insulin Resistance Between the Different Phenotypes of the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(4):E628-37.

Moll E, Korevaar J, Bossuyt P & d. Van V. Does adding metformin to clomifene citrate lead to higher pregnancy rates in a subset of women with polycystic ovary syndrome? *Hum. Reprod.* 2008; 23: 1830-1834.

Moran L, Misso M, Wild R and Norman R. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 2010; 16: 347-363.

Morin-Papunen L, Rautio K, Ruokonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS. Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003b; 88(10):4649-54.

Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruokonen A, Martikainen HK, Tapanainen JS. Endocrine and metabolic effects of metformin versus ethinyl estradiol-cyproterone acetate in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3161-3168.

Morin-Papunen L, Rantala AS, Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Hippeläinen M, Perheentupa A, et al. Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(5):1492-500.

Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruokonen A, Martikainen HK, Tapanainen JS. Metformin versus ethinyl estradiol-cyproterone acetate in the treatment of non obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003a; 88: 148-156.

Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278:31629-31639.

Muhn P, Fuhrmann U, Fritzscheier KH, Krattenmacher R, Schillinger E. Drospirenone: a novel progestogen with antiminerlocorticoid and antiandrogenic activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 761:311-335.

Mukherjee TK, Reynolds PR, Hoidal JR. Differential effect of estrogen receptor alpha and beta agonists on the receptor for advanced glycation end product expression in human microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745(3):300-9.

Mukhopadhyay S, Mukherjee TK. Bridging advanced glycation end product, receptor for advanced glycation end product and nitric oxide with hormonal replacement/estrogen therapy in healthy versus diabetic postmenopausal women: a perspective. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745(2):145-55.

Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 2007; 28(5):463-91.

Murri M, Luque-Ramírez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(3):268-88.

Nader S, Diamanti-Kandarakis E, Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives and metabolic issues: new perspectives and a unifying hypothesis *Hum Reprod* 2007; 22: 317-322.



Nader S, Riad-Gabriel MG, Saad MF. The effect of a desogestrel-containing oral contraceptive on glucose tolerance and leptin concentration in hyperandrogenic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3074-3077.

Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol*. 1999; 13:946-957.

Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:5925-5933.

Nestler J. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2008;358: 47-54.

Nestler J, Jakubowicz D. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1996;335(9):617-23.

Orio F, Manguso F, Di Biase S, et al. Metformin administration improves leukocyte count in women with polycystic ovary syndrome: a 6-month prospective study. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(1):69-73.

Orio F, Palomba S, Cascella T, et al. Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4588-93.

Orio F, Jr, Palomba S, Cascella T, et al. Improvement in endothelial structure and function after metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: results of a 6-month study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6072-6076.

Ozgurtas T, Oktenli C, Dede M, et al. Metformin and oral contraceptive treatments reduced circulating asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Atherosclerosis*. 2008; 200: 336-344.

Packard R and Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry* 2008; 54:1; 24-38.

Palacios S, Foidart JM, Genazzani A. Advances in hormone replacement therapy with drospirenone, a unique progestogen with aldosterone receptor antagonism. *Maturitas* 2006;55: 297-307.

Papachroni K, Piperi C, Levidou G, Korkolopoulou P, Pawelczyk L, Diamanti-Kandarakis E, et al. Lysyl oxidase interacts with AGE signalling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *J Cell Mol Med* 2010;14: 2460-9.

Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;103:1410-1415.

Parkin L, Sharples K, Hernandez RK et al. Risk of venous thromboembolism in users of oral contraceptives containing drospirenone or levonorgestrel: nested case-control study based on UK General Practice Research Database. *Br Med J* 2011; 340: d2139.

Patel SM, Ratcliffe SJ, Reilly MP, Weinstein R, Bhasin S, Blackman MR, et al. Higher serum testosterone concentration in older women is associated with insulin resistance, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94: 4776-4784.

Paul A, Ko KW, Li L, et al. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;109:647-655.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107: 499–511.

Pehlivanov B, Mitkov M. Efficacy of an oral contraceptive containing drospirenone in the treatment of women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2007;12:30–5.

Penfold, S. A., Coughlan, M. T., Patel, S. K., Srivastava, P.M., Sourris, K. C., Steer, et al. Circulating high-molecular-weight RAGE ligands activate pathways implicated in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2010; 78, 287–295

Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, et al. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* 2006;440:1217–1221.

Perseghin G, Scifo P, Pagliato E, Battezzati A, Benedini S, Soldini L, et al. Gender factors affecting fatty acids-induced insulin resistance in non-obese humans: effects of oral steroidal contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3188-3196.

Piltonen T., Puurunen J, Hedberg P, Ruokonen A, Mutt SJ, Herzig KH, et al. Oral, transdermal and vaginal combined contraceptives induce an increase in markers of chronic inflammation and impair insulin sensitivity in young healthy normal-weight women: a randomized study *Hum. Reprod*. 2012; 27(10): 3046-3056.

Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Maitrot-Mantelet L, Canonico M. Hormonal contraceptives and arterial disease: an epidemiological update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013b;27(1):35-45.

Plu-Bureau G, Maitrot-Mantelet L, Hugon-Rodin J, Canonico M. Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: an epidemiological update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013a; 27:25–34

Poretsky L, Cataldo N, Rosenwaks Z, and Giudice L. The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease *Endocr Rev* 1999; 20: 535-582.

Quan A, Chakravarty S, Chen JK, Chen JC, Loleh S, Saini N, et al. Androgens augment proximal tubule transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F452–F459.

Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*. 2010; 59(4):1038-45.

Ranganathan G, Unal R, Pokrovskaya I, et al. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J Lipid Res*. 2006. 47: 2444–2450.

Rask-Madsen C and Kahn CR. Tissue-Specific Insulin Signaling, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 2052-2059

Rasouli N, Raue U, Miles LM, et al. Pioglitazone improves insulin sensitivity through reduction in muscle lipid and redistribution of lipid into adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288(5):E930-4.

Reckelhoff JF, Yanes LL, Iliescu R, Fortepiani LA, Granger JP. Testosterone supplementation in aging men and women: possible impact on cardiovascular-renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289: F941-F948.

Ren T, He J, Jiang H, Zu L, Pu S, Guo X, Xu G. Metformin reduces lipolysis in primary rat adipocytes stimulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  or isoproterenol *J Mol Endocrinol* 2006;37:175–183.

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998;280:1843–1848.

Rexrode KM, Manson JE, Lee IM, Ridker PM, Sluss PM, Cook NR et al., Sex hormone levels and risk of cardiovascular events in postmenopausal women. *Circulation* 2003; 108:1688–1693.

Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Van Obberghen E. Methyl glyoxal impairs the insulin signalling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes*. 2006; 55(5):1289-99

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001; 344: 1959– 1965.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391–397.

Rimm EB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE. Oral contraception use and the risk of type 2 diabetes in a large prospective study of women. *Diabetologia* 1992; 35: 967-972

Rizzo M, Berneis K, Hersberger M, Pepe I, Di Fede G, Rini GB, et al. Milder forms of atherogenic dyslipidemia in ovulatory versus anovulatory polycystic ovary syndrome phenotype. *Hum Reprod* 2009;24:2286-2292.

Romualdi D, Costantini B, Selvaggi L, et al Metformin improves endothelial function in normoinsulinemic PCOS patients: a new prospective. *Hum Reprod* 2008 ;23(9):2127-33.

Roos N, Kieler H, Sahlin L, Ekman-Ordeberg G, Falconer H, Stephansson O. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: population based cohort study. *BMJ* 2011; 343 :d6309.

Rosenfield RL. Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28(2): 265-93. Review.

Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:405–413.

Rusa R, Alkayed N, Crain B, et al. 17beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke* 1999; 30: 1665-1670.

Sakkinen P, Abbott RD, Curb J Detal. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epid* 2002;55:445.

Sakkinen PA, Macy EM, Callas PW, et al. Analytical and biologic variability in measures of hemostasis, fibrinolysis and inflammation: assessment and implications for epidemiology. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 261-7.

Salley KE, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW, Nestler JE. Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome--a position statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(12):4546-56

Salt IP, Connell JM, Gould GW. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 2000; 49(10):1649-56.

Sampson M, Kong C, Patel A, Unwin R, Jacobs HS. Ambulatory blood pressure profiles and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity in lean women with and without the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol(Oxf)* 1996;45:623–629

Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes* 2005; 54:2314-2319

Sano H, Higashi T, Matsumoto K, Melkko J, Jinnouchi Y, Ikeda K, et al. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1998; 273:8630–7.

Schmidt J, Landin-Wilhelmsen K, Brännström M, Dahlgren E. Cardiovascular disease and risk factors in PCOS women of postmenopausal age: a 21-year controlled follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:3794–3803.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84: 489-497.

Schürks M, Rist PM, Bigal ME et al. Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2009; 339: b3914.

Seufert J, Lübben G, Dietrich K, Bates PC. A comparison of the effects of thiazolidinediones and metformin on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther.* 2004; 26(6):805-18.Review.

Shaw LJ, Bairey Merz CN, Azziz R, Stanczyk FZ, Sopko G, Braunstein GD, et al. Postmenopausal women with a history of irregular menses and elevated androgen measurements at high risk for worsening cardiovascular event-free survival: results from the National Institutes of Health – National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)-sponsored Women’s Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1276–1284.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al .The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005; 310(5754):1642-6.

Shifren, J.L., Rifai, N., Desindes, S. et al. A comparison on the short-term effects of oral conjugated equine estrogens vs. transdermal estradiol on C-reactive protein, other serum markers of inflammation and other hepatic proteins in naturally menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93, 1702–1710

Singh H, Cheng J, Deng H, Kemp R, Ishizuka T, Nasjletti A, et al. Vascular cytochrome P450 4A expression and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis contribute to endothelial dysfunction in androgen-induced hypertension. *Hypertension* 2007a; 50(1): 123-9.

Singh P, Hoffmann M, Wolk R, Shamsuzzaman AS, Somers VK. Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007b; 27: e302–e307.

Sitruk-Ware R, Nath A. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:13–24.

Smith C , Mullen K , Junkin K, et al Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1):E172 - E181.

Solomon CG, Hu FB, Dunaif A, et al. Menstrual cycle irregularity and risk for future cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(5):2013-7.

Sondheimer SJ. Update on the metabolic effects of steroidal contraceptives. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20:911–923.

Soska V, Fiala J, Nebeska K, Jarkovsky J, Hrubá D. The atherogenic index of plasma is increased by hormonal contraception. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011;71(2):94-100.

Speiser P., Azziz R., Baskin L., Ghizzoni L., Hensle T., Merke D., et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(9):4133–4160.

Stec D, Gannon KP, Beaird JS, and Drummond HA. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) stimulates migration of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19: 121–128

Svendsen PF, Nilas L, Nørgaard K, Jensen JE, Madsbad S. Obesity, body composition and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008; 23(9): 2113-21.

Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, et al. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2414-2421.

Talbott E, Zborowski J, Rager J, Boudreaux M, Edmundowicz D, Guzick D. Evidence for an association between metabolic cardiovascular syndrome and coronary and aortic calcification among women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5454-5461.

Tanaka Y, Iwamoto H, Onuma T, Kawamori R. Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products. *Curr Ther Res* 1997; 58 (10): 693-697.

Tanaka Y, Uchino H, Shimizu T, et al. Effect of metformin on advanced glycation end product formation and peripheral nerve function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 376(1-2):17-22.

Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycosylation end products is induced by the glycation product themselves and TNF- $\alpha$  through nuclear factor  $\kappa$ B and by 17- $\beta$ -estradiol through Sp1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:25781–25790.

Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen A. Insulin sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiroinositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2012;5: CD003053.

Tanigaki K, Mineo C, Yuhanna IS, Chambliss KL, Quon MJ, Bonvini E et al. C-reactive protein inhibits insulin activation of endothelial nitric oxide synthase via the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of Fc $\gamma$ RIIB and SHIP-1. *Circ Res* 2009; 104:1275–1282.

Tanigaki K, Vongpatanasin W, Barrera J, Atochin D, Huang P, Bonvini E, et al. C-Reactive Protein Causes Insulin Resistance in Mice Through Fc $\gamma$  Receptor IIB-Mediated Inhibition of Skeletal Muscle Glucose Delivery. *Diabetes* 2013; 62(3):721-731.

Taponen S, Martikainen H, Jarvelin MR, et al. Metabolic cardiovascular disease risk factors in women with self-reported symptoms of oligomenorrhea and/or hirsutism: Northern Finland Birth Cohort 1966 Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2114-2118.

Tatone C, Carbone MC, Campanella G, Festuccia C, Artini PG, Talesa V, et al. Female reproductive dysfunction during ageing: role of methylglyoxal in the formation of advanced glycation endproducts in ovaries of reproductively-aged mice. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010; 24:63–72.

Tatone C, Heizenrieder T, Di Emidio G, Treffon P, Amicarelli F, Seidel T, et al. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. *Hum Reprod* 2011; 26:1843–59.

Teede HJ, Meyer C, Hutchison SK, Zoungas S, McGrath BP, Moran LJ. Endothelial function and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: the effects of medical therapy. *Fertil Steril* 2010; 93: 184–191.

Teoh H, Quan A, Lovren F, et al. Impaired endothelial function in C-reactive protein overexpressing mice. *Atherosclerosis* 2008; 201:318–325.

The Diabetes Prevention Program Research Group. Relationship of Body Size and Shape to the Development of Diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Obesity* (Silver Spring). 2006 ; 14(11): 2107–2117.

Thornalley P. The glyoxalase system: new developments towards functional characterisation of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 1990; 269; 1-11.

Tiras MB, Yalcin R, Noyan V, et al. Alterations in cardiac flow parameters in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1999;14:1949–52.

Topcu S, Tok D, Caliskan M, et al. Metformin therapy improves coronary microvascular function in patients with polycystic ovary syndrome and insulin resistance *Clin Endocrinol* 2006; 65, 75–80.

Tosca L., Solnais P, Ferre P, Fougelle F & Dupont J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2006;75: 342-351.

Toulis K., Goulis D., Mintziori G. Meta-analysis of cardiovascular disease risk markers in women with polycystic ovary syndrome *Hum Reprod Update* 2011 17: 741-760.

Trolle B., Flyvbjerg A., Kesmodel U. and Lauszus F.F. Efficacy of metformin in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blinded, placebo-controlled cross-over trial *Hum Reprod* 2007; 22(11):2967–2973.

Van Kesteren PJ, Kooistra T, Lansink M, van Kamp GJ, Asscheman H, Gooren LJ, et al. The effects of sex steroids on plasma levels of marker proteins of endothelial cell functioning. *Thromb Haemost* 1998;79: 1029–1033.

van Rooijen M, Hansson LO, Frostegård J, Silveira A, Hamsten A, Bremme K. Treatment with combined oral contraceptives induces a rise in serum C-reactive protein in the absence of a general inflammatory response. *J Thromb Haemost.* 2006;4(1):77-82.

Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Vander Jagt TJ, Gomez MS, Gonzales DM, Deck LM, et al. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:1133–1140.

Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism.* 1994 ;43(5):647-54.

Velazquez EM, Mendoza SG, Wang P, Glueck CJ. Metformin therapy is associated with a decrease in plasma plasminogen activator inhibitor-1, lipoprotein(a), and immunoreactive insulin levels in patients with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 1997;46(4):454-7.

Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003;108:1676–1678.

Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1890–1896.

Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002; 106:913–919.

Victor V, Rocha M, Bañuls C , Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, et al. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(10):3115-22.

Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol.* 2006 1;574(Pt 1):41-53.

Virtanen KA, Lonroth P, Parkkola R, et al Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3902–3910.

Vitale C, Fini M, Speziale G, Chierchia S. Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010; 24(6):675-85.

Vryonidou A, Papatheodorou A, Tavridou A, et al. Association of hyperandrogenemic and metabolic phenotype with carotid intima-media thickness in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90: 2740-2746.

Vural B, Caliskan E, Turkoz E, Kilic T, Demirci A. Evaluation of metabolic syndrome frequency and premature carotid atherosclerosis in young women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2005;20:2409-2413.

Wang HY, Gao PJ, Ji KD, Shen WF, Fan CL, Lu L, et al. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. *Hypertens Res.* 2007; 30(2):133-41.

Wang X, Bao W, Liu J, Yang Y, et al. Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis *Diab Care* 2013;36:166-175.

Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* 2003;27:362(9389): 1017-21.

Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Margara R, Trew GH, Lavery SA, et al. Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 ; 92(5):1975-8.

Weghofer A, Munne S, Chen S, Barad D, Gleicher N. Lack of association between polycystic ovary syndrome and embryonic aneuploidy. *Fertil Steril* 2007; 88: 900–5.

Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2304-11.

Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Quinn PG, McAllister JM. Increased cytochrome P450 17alpha-hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. *Mol Endocrinol* 2004; 18:588-605.

Wiermann M. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advan Physiol Educ* 2007;31:26-33.

Wiegratz I, Lee JH, Kutschera E et al. Effect of dienogest-containing oral contraceptives on lipid metabolism. *Contraception* 2002; 65: 223–229

Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3984–3991

Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81: 302–309.

Wilson P, Nam B, Pencina M et al. C-reactive protein and risk of cardiovascular disease in men and women from the Framingham Heart Study. *Arch Intern Med* 2005;165:2473–8.

Wood J, Ho C, Nelson-Degrave V, McAllister J, Strauss J 3rd. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 2004; 63:51-60.

Wu CC, Cheng J, Zhang FF, Gotlinger KH, Kelkar M, Zhang Y, et al. Androgen-dependent hypertension is mediated by 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced vascular dysfunction: role of inhibitor of kappaB Kinase. *Hypertension*. 2011; 57(4):788-94.

Wu C, Grandi S, Filion K, Abenhaim H, Joseph L, Eisenberg M. Drospirenone-containing oral contraceptive pills and the risk of venous and arterial thrombosis: a systematic review. *BJOG*. 2013b;120(7):801-11

Wu CC, Mei S, Cheng J, Ding Y, Weidenhammer A, Garcia V, et al. Androgen-Sensitive Hypertension Associates with Upregulated Vascular CYP4A12-20-HETE Synthase. *J Am Soc Nephrol*. 2013a May 2. [Epub ahead of print]

Wunder D, Yared M, Bersinger N, et al. Serum leptin and C-reactive protein levels in the physiological spontaneous menstrual cycle in reproductive age women. *Eur J Endocrinol* 2006;155: 137–142.

Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:18073-18080.

Xu J, Morita I, Ikeda K, Miki T, Yamori Y. C-reactive protein suppresses insulin signalling in endothelial cells: role of spleen tyrosine kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21:564–573.

Yamaguchi S, Katahira H, Ozawa S, et al. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289(4):E643-9.

Yildirim A, Aybar F, Kabakci G, Yarali H, Oto A. Heart rate variability in young women with polycystic ovary syndrome. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2006 ;11(4):306-12.

Yildiz B. Assessment, diagnosis and treatment of a patient with hirsutism. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4:294-300

Yildiz B, Bozdag G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2012; 27(10):3067-73.



Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937–952.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, et al AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 2004; 279:47898–47905.

Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GE, eds (series ed: Hershman SM). *Current Issues in Endocrinology and Metabolism*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992: 377.

Zou M-H and Y Wu Y AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function *Clin Exp Pharm Physiol* 2008;35:535–545.