



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΩΝ**  
Διευθύντρια Επ. Καθηγήτρια Αλεξ.Μπαργιώτα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2014-2015

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**  
**ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ**  
**ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Γ. ΣΑΚΚΑ**  
**ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

© 2015 ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΑΚΚΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν.5343/32 αρ. 202 παρ.2).

Εγκρίθηκε από τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1ος Εξεταστής<br>(Επιβλέπουσα) | <b>Δρ. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα</b><br>Επ. Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                |
| 2ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Στεφανίδης Ιωάννης</b><br>Καθηγητής Νεφρολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                          |
| 3ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Ποταμιάνος Σπυρίδων</b><br>Αν. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας               |
| 4ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Νταφόπουλος Κωνσταντίνος</b><br>Αν. Καθηγητής Γυναικολογίας – Μαιευτικής<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| 5ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Τρυποσκιάδης Φίλιππος</b><br>Καθηγητής Καρδιολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                      |
| 6ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Φουρτούνας Κωνσταντίνος</b><br>Αν. Καθηγητής Νεφρολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                 |
| 7ος Εξεταστής                  | <b>Δρ. Μακαρίτσης Κωνσταντίνος</b><br>Επ. Καθηγητής Παθολογίας<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                  |

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μπαργιώτα Αλεξάνδρα καθώς και τον Καθηγητή κ. Κουκούλη Γεώργιο, οι οποίοι μου ανέθεσαν το θέμα της διδακτορικής διατριβής και με επέβλεψαν καθ' όλη τη διάρκεια της. Η καθοδήγησή τους ήταν καθοριστική όχι μόνο για την διατριβή, αλλά και για την πορεία της ζωής μου.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής, Καθηγητή κ. Στεφανίδη Ιωάννη, Αν. Καθηγητή κ. Ποταμιάνο Σπυρίδωνα, Αν. Καθηγητή κ. Νταφόπουλο Κωνσταντίνο, Καθηγητή κ. Τρυποσκιάδη Φίλιππο, Αν. Καθηγητή κ. Φουρτούνα Κωνσταντίνο και Επ. Καθηγητή κ Μακαρίτση Κωνσταντίνο για την βοήθεια που μου προσέφεραν και τις χρήσιμες συμβουλές και επισημάνσεις τους.

Σημαντική ήταν η βοήθεια της κ. Γούτου Μαρίας και του κ. Στακιά Νικολάου για τη στήριξη και τη βοήθειά τους στο τεχνικό κομμάτι της μελέτης αυτής.

Ευχαριστώ απο τα βάθη της καρδιάς μου την κ. Ευσταθιάδου Ζωή, για την αμέριστη βοήθειά της, τόσο ηθικά, όσο και πνευματικά. Καθώς και τον κ. Πολύζο Στέργιο, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την οικογένειά μου και ιδιαίτερα την κόρη μου Άρτεμις, για την αγάπη και την υποστήριξή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους άνδρες που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη.

Στη μνήμη της γιαγιάς μου, Φεβρωνίας

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΕΠΙΘΕΤΟ:** Σακκά

**ΟΝΟΜΑ:** Χριστίνα

**ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:** Γεώργιος

Ημερομηνία γέννηση 28/6/1973

Τόπος γέννησης : Τρίκαλα, Ελλάδα

Εθνικότητα: Ελληνική

Διεύθυνση οικίας: Σαρανταπόρου142, 43100 Καρδίτσα

Τηλ οικίας: 2441040958

Κινητό: 6988205454

Email address: [cgsakka@hotmail.com](mailto:cgsakka@hotmail.com)

Οικογενειακή κατάσταση: Διαζευγμένη 1 κόρη

Γένος: θήλυ

### ***Μόρφωση***

***Απολυτήριο λυκείου Καρδίτσας βαθμός «Άριστα»***

Σεπτέμβριος 1992- Ιούλιος 1993 πανεπιστήμιο Πάτρας ,**τμήμα βιολογίας**

Σεπτέμβριος 1993- Ιούλιος 1999 πανεπιστήμιο Πάτρας ,**τμήμα ιατρικής**

**Πτυχίο ιατρικής** του πανεπιστήμιου Πατρών στις 20 Ιουλίου 1999 «**Λίαν Καλώς**»

### ***Γλώσσες***

Αγγλικά: άριστα

Γαλλικά :άριστα

Ιταλικά: πολύ καλά

Ισπανικά : πολύ καλά

Ελληνικά: μητρική γλώσσα

### ***Επαγγελματική εμπειρία***

Σεπτέμβριος **1999**- Ιανουάριος **2001** υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου, ΚΥ Παλαμά , ΠΙ Καρδιτσομάγουλας

Ιανουάριος **2001**- Μάρτιος **2002** άμισθος βοηθός της ενδοκρινολογικής κλινικής της ιατρικής σχολής Λάρισας, πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μάρτιος **2002** –Ιανουάριος **2004** ειδικευόμενη της παθολογικής κλινικής του νοσοκομείου Καρδίτσας

Ιανουάριος **2004**- Ιανουάριος **2005** επί παράταση βοηθός της παθολογικής κλινικής του νοσοκομείου Καρδίτσας

Ιανουάριος **2006**- Ιανουάριος **2009** ειδικευόμενη ενδοκρινολογίας της ενδοκρινολογικής κλινικής Νοσοκομείου **Λουξεμβούργου**, έμμισθη θέση πλήρους απασχόλησης.

Ιανουάριος 2009-Μάιος 2011 ειδικευόμενη ενδοκρινολογίας της ενδοκρινολογικής κλινικής Β ΙΚΑ-ΕΤΑΜ, έμμισθη θέση πλήρους απασχόλησης.  
Ιούνιος 2011 απόκτηση τίτλου ειδικότητας ενδοκρινολογίας  
Ιούνιος 2011 μέχρι σήμερα ιδιωτικό ιατρείο στην Καρδίτσα

### **Παρουσιάσεις σε συνέδρια**

#### **10th EUROPEAN CONGRESS OF ENDOCRINOLOGY Berlin, Germany, 3-7**

**May, 2008**

**C. Sakka, Z. Efstathiadou, S. Polyzos, M. Goutou, N. Stakias, G. Koukoulis.**

**Association of estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms with sex steroid levels in men. Abstract 678**

**ENDO 2006. 88<sup>th</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ENDOCRINE SOCIETY. Boston MA, 24-28 June 2006**

C. Sakka, Z. Efstathiadou, M. Goutou, N. Stakias G. Koukoulis.

Association of Estrogen Receptor Alpha and Beta Genes with Sex Steroid Levels and Cardiovascular Risk Factors in Men

#### **10th EUROPEAN CONGRESS OF ENDOCRINOLOGY Berlin, Germany, 3-7**

**May, 2008**

**C. Sakka, Z. Efstathiadou, S. Polyzos, M. Goutou, N. Stakias, G. Koukoulis.**

**Association of estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms with sex steroid levels in men. Abstract 678**

**35<sup>ο</sup> ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, Αθήνα 19-22 Μαρτίου 2008**

X. Σακκά, Z. Ευσταθιάδου, Σ. Πολύζος, Μ. Γούτου, Ν. Στακιάς, Γ. Κουκούλης.

Συσχέτιση πολυμορφισμών των γονιδίων των οιστρογονικών υποδοχέων Α και Β με τα επίπεδα λιπιδίων και την ινσουλινική αντίσταση σε άνδρες. *Προφορική ανακοίνωση No 73<sup>A</sup>*

#### ***Prevalence of obesity in central Greece: a population based study***

Ch Sakka, S Tsirona, E Markousi, E Tsiapali, A Piterou, M Goutou, F Katsaros, G Koukoulis. 14<sup>th</sup> European congress of obesity Athens 1-4 June 2005

#### ***Prevalence of the metabolic syndrome in the adult population of central Greece***

F Katsaros, M Goutou, Ch Sakka, A Piterou, E Tsiapali, S Tsirona, G Koukoulis. 14<sup>th</sup> European congress of obesity Athens 1-4 June 2005

### ***Επιπολασμός του μεταβολικού συνδρόμου στους Έλληνες ενήλικες***

Γούτου Μ, Σακκά Χ, Πιττερού Α, Τσιρώνα Σ, Κατσαρός Φ, Στακιάς Ν, Νταμάνη Ε, Κουκούλης Γ. 32ο πανελλήνιο συνέδριο ενδοκρινολογίας και μεταβολισμού, Πάτρα 31 Μαρτίου –2 Απριλίου 2005

### ***Εκτίμηση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό σύμφωνα με την κλίμακα Framingham***

Σακκά Χ, Γούτου Μ, Τσιαπάλη Ε, Πιττερού Α, Τσιρώνα Σ, Κατσαρός Φ, Μαρκούση Ε, Νταμάνη Ε, Κουκούλης Γ. 32ο πανελλήνιο συνέδριο ενδοκρινολογίας και μεταβολισμού Πάτρα 31 Μαρτίου –2 Απριλίου 2005

Διαγνωστική προσέγγιση και αντιμετώπιση αρρώστων με προκάρδιο άλγος σε νοσοκομείο δευτεροβάθμιας περίθαλψης

Σιδεράς Σ, Παμπούκας Κ, Κατσαρός Φ, Τσιρώνα Σ, Σακκά Χ, Αρσένος Π, Κόγιας Ι. 4 βορειοελλαδικό καρδιολογικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη 20-22 Μαΐου 2004

### ***Prevalence of obesity in central Greece***

C Sakka, E Markousi, M Goutou, S Tsirona, S Mountantonakis, F Katsaros, E Damani, N Liakos, G Koukoulis. 12<sup>th</sup> Balkan congress of endocrinology, 30<sup>th</sup> pan Hellenic congress of endocrinology and metabolism, Thessaloniki may 21-25, 2003

### ***Strong relationship of obesity with insulin resistance and blood lipids profile***

F Katsaros, M Goutou, S Tsirona, C Sakka, E Damani, N Liakos, E Markousi, S Mountantonakis, G Koukoulis. 12<sup>th</sup> balcan congress of endocrinology, 30<sup>th</sup> panhellenic congress of endocrinology and metabolism, Thessaloniki may 21-25, 2003.

### ***Αυξημένη συχνότητα της παχυσαρκίας στον άρρενα θεσσαλικό πληθυσμό***

C Sakka, E Markousi, F Katsaros, S Mountantonakis, S Tsirona, M Goutou, G Koukoulis, N Stathakis. 29 πανελλήνιο συνέδριο ενδοκρινολογίας και μεταβολισμού, Ιωάννινα 21-24 Μαρτίου 2002

### ***Δημοσιεύσεις***

#### **High rates of obesity prevalence in adults living in central Greece: data from the ARGOS study.**

Koukoulis GN, Sakka C, Katsaros F, Goutou M, Tsirona S, Tsiapali E, Piterou A, Stefanidis I, Stathakis N.

*Hormones* (Athens). 2010 Jul-Sep;9(3):253-62.

PMID: 20688623

#### **Associations of Estrogen Receptor Alpha and Beta Gene Polymorphisms with Sex Steroid Levels and Body Fat Content in Men.**

Sakka C, Efstathiadou ZA, Polyzos SA, Goutou M, Stakias N, Koukoulis GN.

*Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010 Mar 3.



PMID: 20200813

[AR CAG repeat length is not associated with serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men.](#)

Goutou M, Sakka C, Stakias N, Stefanidis I, Koukoulis GN.

*Int J Androl.* 2009 Dec;32(6):616-22. Epub 2008 Jul 24.

PMID:18657194

**Associations of estrogen receptor alpha and Beta gene polymorphisms with lipid levels and insulin resistance in men.**

Efstathiadou ZA, Sakka C, Polyzos SA, Goutou M, Stakias N, Bargiota A, Koukoulis GN.

*Metabolism.* 2015 May;64(5):611-7. doi: 10.1016/j.metabol.2015.01.006. Epub 2015 Jan 22.

*Εκπαιδευτικά σεμινάρια*

**Εκπαίδευση στην εξειδικευμένη υποστήριξη ζωής(Advanced Life Support ,ALS)**

**1999**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ABSTRACT

### Α ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

- 1.1 ΤΙΜΕΣ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ
- 1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ
  - 1.2.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗ
  - 1.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ
  - 1.2.3 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
  - 1.2.4 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΟΣΤΑ
  - 1.2.5 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
  - 1.2.6 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ
  - 1.2.7 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
  - 1.2.8 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ
- 1.3 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ, ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΚΑΙ ΔΙΥΔΡΟΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ
- 1.4 ΤΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ Η ΑΡΤΗΡΙΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΩΤΙΔΕΣ
- 1.5 ΤΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ Η ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ
- 1.6 ΤΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΣΥΜΒΑΜΑΤΑ
- 1.7 ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ

- 2.1 ΟΙ ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ
- 2.2 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ
  - 2.2.1 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ  $\alpha$  ΚΑΙ  $\beta$  (ER $\alpha$  ΚΑΙ ER $\beta$ )
  - 2.2.2 ERKO (ER KNOCKOUT) ΠΟΝΤΙΚΙΑ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

- 3.1 Ο ΚΛΑΣΣΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΣΥΝΔΕΣΗΣ
- 3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ER ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ
- 3.3 ΓΕΝΟΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ER ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΑΠΟ ERΕ
- 3.4 ΜΗ ΓΕΝΟΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ
- 3.5 ΙΣΤΙΚΗ ΕΞΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ER ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΩΝ ER

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ (ERs) ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

- 4.1 ERs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ
- 4.2 ERs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ
- 4.3 ERs ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ
- 4.4 ERs ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ
- 4.5 ERs ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
- 4.6 ERs ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

#### **4.7 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ERs ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΩΣ ΔΡΟΥΝ ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΣΑΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

- 5.1 ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ**
  - 5.1.1 ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**
  - 5.1.2. ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ**
  - 5.1.3. ΠΡΟΣΤΑΚΥΚΛΙΝΗ**
  - 5.1.4. ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ**
  - 5.1.5. ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ**
  - 5.1.6. ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ**
  - 5.1.7. MCP-1 (MONOCYTE-ATTRACTING PROTEIN – 1)**
  - 5.1.8. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΕΣ**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ER ΚΑΙ ΤΟΥ G PROTEIN COUPLED ER ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ –ΥΠΟΦΥΣΗ –ΟΡΧΕΙΣ**

- 6.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ GnRH,LH ΚΑΙ FSH ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ**
  - 6.1.1 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟ**
  - 6.1.2 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΠΟΦΥΣΗ**
  - 6.1.3 ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΞΟΝΑΣ ΥΓΓ, ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΖΩΩΝ**

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ**

##### **Β ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

##### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

##### **2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

##### **2.1 ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

##### **2.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ**

##### **2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

##### **2.4 ΓΟΝΙΔΙΟ ER $\alpha$**

##### **2.5 ΓΟΝΙΔΙΟ ER $\beta$**

##### **2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

##### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

##### **3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ**

##### **3.2 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ER $\alpha$**

##### **3.3 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ER $\beta$**

##### **3.4 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ER $\alpha$ ΚΑΙ ΤΟΥ ER $\beta$**

##### **3.5 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ**

##### **3.6 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ER $\alpha$**

### **3.7 ΣΥΝΕΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ER $\alpha$ ΚΑΙ ΤΟΥ ER $\beta$**

#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός :** Τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανδρική φυσιολογία. Μελετήσαμε την πιθανή σχέση τεσσάρων SNPs (single nucleotide polymorphisms) του οιστρογονικού υποδοχέα α και β στα επίπεδα των στεροειδών του φύλου και των λιπιδίων στους άνδρες.

**Μέθοδος :** Μετρήθηκε SHBG, η ολική και ελεύθερη τεστοστερόνη (TT, FT), οιστραδιόλη (E2) και (FE2) τα λιπίδια, η γλυκόζη, η ινσουλίνη και ο HOMA-IR σε ένα πληθυσμό 170 υγιών ανδρών. Το BMI, η περιμέτρος μέσης και το ποσοστό λίπους μετρήθηκε σε όλους τους συμμετέχοντες. Μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί PvuII και XbaI του ERα και οι RsaI και AluI του ERβ.

**Αποτελέσματα:** Ο PvuII σχετίστηκε με τα επίπεδα της E2 [μέση (IQR) pp 58.5 [42.1-73.4] pg/ml vs. Pp 48.8 (42.9-60.1) και PP 57.7 (44-70.5), p=0.032], και το ποσοστό λίπους % [μέση±SD pp 24.6±5.3 vs Pp 22.4±5.2 και PP 21.2±6.7, p=0.044], μετά από προσαρμογή για την ηλικία και την WC. Επιπλέον η επίδραση του PvuII στην E2 ήταν ανεξάρτητη από το % λίπους (p=0.038).

Μια συνεργική δράση και των δυο πολυμορφισμών ERα στην E2 (p=0.023), FE2 (p=0.03) και % λίπους (p=0.004) ήταν παρούσα.

Τελικά υπάρχει μια συνεργική δράση του ERα και ERβ στην TT (p=0.009), ανεξάρτητα από τη ηλικία, WC και % λίπους.

Βρέθηκε συσχετισμός του AluI με την LDL (μέση±SD, αα 4.3±1.1 vs. Αα 3.7±1.0 και ΑΑ 4.2±1.1, p=0.023) και RsaI με τον HOMA-IR [μέση(IQR) RR 1.55(0.88-2.49) vs. Rr/rr 1.69(0.72-2.29), p=0.032]. Υπάρχει συνεργική δράση του RsaI και AluI του ERβ με τα επίπεδα της LDL, % λίπους και WC, καθώς και συνεργική δράση και των δυο γονιδίων στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης (p=0.01) και της LDL (p=0.027) μετά από προσαρμογή για πιθανούς συγχρητικούς παράγοντες.

Βρέθηκαν σημαντικές ανεξάρτητες συσχετίσεις του PvuII με το % λίπους (μέση±SD, pp 24.6±5.3 vs Pp 22.4±5.2 και PP 21.2±6.7, p=0.044), και RsaI με % λίπους (RR 22.6 ±5.5 vs. Rr/rr 25.2 ±6.3, p=0.015) και WC (μέση±SD RR 97.4 ±10.4 vs. Rr/rr 102.6 ±12.6, p=0.013). Συνεργική δράση στο % λίπους και τους πολυμορφισμούς ERα (p=0.004), καθώς και ανάμεσα στους τέσσερις πολυμορφισμούς.

**Συμπεράσματα:** Οι γενετικοί πολυμορφισμοί ERα σχετίζονται με τα επίπεδα της οιστραδιόλης και τα ποσοστά λίπους στους άνδρες. Επιπλέον υπάρχει μια συνεργική δράση στο γονίδιο ERα and ERβ στα επίπεδα της τεστοστερόνης. Το γονίδιο του ERβ σχετίζεται με τα επίπεδα LDL στους άνδρες ανεξάρτητα από τους συγχρητικούς παράγοντες. Επιπλέον υπάρχει συνεργική δράση ανάμεσα και στους τέσσερις πολυμορφισμούς και το ποσοστό λίπους.

## ABSTRACT

**Objective:** Estrogens play an important role in male physiology. We investigated the possible association of four single nucleotide polymorphisms in Estrogen Receptor  $\alpha$  and Estrogen Receptor  $\beta$  genes with circulating levels of sex steroids and lipid levels in men.

**Design and Methods:** SHBG, total and calculated free testosterone (TT and cal FT), estradiol (E2) and free Estradiol (FE2) Lipids, glucose, insulin and HOMA-IR were determined in a population-based cohort of 170 apparently healthy Greek men. Body mass index (BMI), waist circumference (WC) and percentage of body fat (%fat) content were measured in all participants. Genotyping for the PvuII and XbaI polymorphisms of the ESR1 gene and for the RsaI and AluI polymorphisms of the ESR2 gene was performed.

**Results:** PvuII showed an association with E2 levels [median (IQR) pp 58.5 (42.1-73.4) pg/ml vs. Pp 48.8 (42.9-60.1) and PP 57.7 (44-70.5),  $p=0.032$ ], and with %fat [mean $\pm$ SD pp 24.6 $\pm$ 5.3 vs Pp 22.4 $\pm$ 5.2 and PP 21.2 $\pm$ 6.7,  $p=0.044$ ], after adjustment for age and WC. Furthermore, the effect of PvuII on E2 was independent of %fat ( $p=0.038$ ).

A synergistic effect of the two ESR1 polymorphisms on E2 ( $p=0.023$ ), FE2 ( $p=0.03$ ) and %fat ( $p=0.004$ ) was present.

Finally, a synergistic effect of the ESR1 and ESR2 genes on TT ( $p=0.009$ ), independent of age, WC and %fat also emerged.

Associations of AluI with LDL-Chol (mean $\pm$ SD, aa 4.3 $\pm$ 1.1 vs. Aa 3.7 $\pm$ 1.0 and AA 4.2 $\pm$ 1.1,  $p=0.023$ ) and RsaI with HOMA-IR [median(IQR) RR 1.55(0.88-2.49) vs. Rr/r 1.69(0.72-2.29),  $p=0.032$ ] were found. Synergistic effects of RsaI and AluI of ESR2 gene on LDL-Chol levels, %fat and WC, as well as a synergistic effect of both ESR1 and ESR2 genes on levels of T-Chol ( $p=0.01$ ) and LDL-Chol ( $p=0.027$ ) were also shown. These findings remained significant after adjustment for potential confounders.

Significant independent associations of PvuII with %fat (mean $\pm$ SD, pp 24.6 $\pm$ 5.3 vs Pp 22.4 $\pm$ 5.2 and PP 21.2 $\pm$ 6.7,  $p=0.044$ ), and RsaI with % fat (RR 22.6  $\pm$ 5.5 vs. Rr/r 25.2  $\pm$ 6.3,  $p=0.015$ ) and WC (mean $\pm$ SD RR 97.4  $\pm$ 10.4 vs. Rr/r 102.6  $\pm$ 12.6,  $p=0.013$ ) were found.

Synergistic effects on %fat, between the ESR1 polymorphisms ( $p=0.004$ ), between the ESR2 polymorphisms and among all four ESR polymorphisms studied were also present.

**Conclusions:** Genetic variation in ER1 is associated with serum estradiol levels and body fat content regulation in men. Furthermore, a synergistic effect of ESR1 and ESR2 genes is exerted on serum testosterone levels. ESR2 is associated with LDL-Chol levels in men

independently of confounders. Furthermore, a synergistic effect of ESR1 and ESR2 on T-Chol, LDL-Chol and %fat, was shown.

## **A ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ**

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την λειτουργία πολλών ιστών στόχων συμπεριλαμβανόμενων των ιστών του ανδρικού και γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, όπως ο μαζικός αδένας, η μήτρα, ο κόλπος, οι ωοθήκες, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα και ο προστάτης (Clark και συν.1992). Τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των οστών (Turner και συν.1994) και στο καρδιαγγειακό σύστημα εμφανίζοντας αθηροπροστατευτική δράση (Farhat και συν.1996).

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν μια πλειάδα δράσεων στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπως τη μάθηση, τη μνήμη, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας καθώς και τη συμπεριφορά αναπαραγωγής (McCarthy και Pfaus 1996). Φυσικοί και συνθετικοί ανταγωνιστές των οιστρογόνων χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο αριθμό κλινικών εφαρμογών, όπως στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Συχνή είναι η χρήση των οιστρογόνων στη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

Μια δράση των οιστρογόνων που συχνά αποσιωπάται είναι η δράση τους σε ιστούς που δεν αποτελούν τα κλασικά όργανα-στόχους των οιστρογόνων, όπως το γαστρεντερικό και το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα οιστρογόνα παράγονται κυρίως στις ωοθήκες και στους περιφερικούς ιστούς. Οι τρεις κύριες μορφές των οιστρογόνων είναι η 17β-οιστραδιόλη (που έχει την πιο μεγάλη βιολογική δράση), η οιστριόλη και η οιστρόνη.

Τα οιστρογόνα διαχέονται μέσα και έξω στα κύτταρα, αλλά κατακρατούνται με μεγάλη συνοχή και ειδικότητα στους ιστούς στόχους με μια ενδοπυρηνική δεσμευτική πρωτεΐνη, τον οιστρογονικό υποδοχέα (ER). Στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, μαζί με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, περιλαμβάνονται οι υποδοχείς των θυροειδικών ορμονών, του ρετινοϊκού οξέος και της βιταμίνης D3. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός από υποδοχείς για τους οποίους δεν έχει βρεθεί ακόμα το συνδετικό τους μόριο και λέγονται «ορφανοί» υποδοχείς.

## 1.1 Τιμές των ορμονών στους άνδρες

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνονται μόνο οι βασικές τιμές. Οι τιμές στα παιδιά διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία τους (Bhasin και συν. 2011, Sikaris 2002)

Πίνακας 1.

Ορμόνη	Ηλικία	Τιμή
Προγεστερόνη	Ενήλικας	< 1.0 ng/ml (< 3.18 nmol/L)
17-OH προγεστερόνη	Προεφηβική	< 1.1 ng/dl (< 3.3 nmol/L)
	Ενήλικας	5 – 250 ng/dl (0.15 – 7.5 nmol/L)
E2	Προεφηβική	< 10 pg/ml (< 37 pmol/L)
	Εφηβική	< 23 pg/ml (< 84 pmol/L)
	Ενήλικας	< 60 pg/ml (< 185 pmol/L)
Οιστρόνη	Ενήλικας	10 – 50 pg/ml (37 – 185 pmol/L)
Οιστριόλη	Ενήλικας	< 2 ng/ml (< 7 nmol/L)
FSH	Ενήλικας	1.0 – 12.0 U/L
LH	Ενήλικας	2.0 – 14.0 U/L
SHBG	Ενήλικας	6 – 50 nmol/L
DHEA	< 6 χρόνων	20 – 130 ng/dl (0.7 – 4.5 nmol/L)
	6-8 χρόνων	20 – 275 ng/dl (0.7 – 9.5 nmol/L)
	8-10 χρόνων	31 – 345 ng/dl (1.1 – 12 nmol/L)
	10-20 χρόνων	110 – 900 ng/dl (3.8 – 31.2 nmol/L)
	> 20 χρόνων	160 – 800 ng/dl (5.6 – 27.8 nmol/L)
DHEAS	1-8 χρόνων	10 – 20 µg/dl (0.3 – 0.5 µmol/L)
	8-10 χρόνων	30 – 50 µg/dl (0.8 – 1.4 µmol/L)
	10-12 χρόνων	30 – 40 µg/dl (0.8-1.1 µmol/L)
	12-14 χρόνων	80 – 140 µg/dl (2.2 – 3.8 µmol/L)



	14-50 χρόνων	110 – 690 µg/dl (3.0 – 18.7 µmol/L)
<b>Ανδροστενεδιόνη</b>	< 6 χρόνων	0.1 – 0.2 (0.3 – 0.7 nmol/L)
	6-8 χρόνων	0.1 – 0.3 (0.3 – 1.0 nmol/L)
	8-10 χρόνων	0.1 – 0.3 (0.3 – 1.0 nmol/L)
	10-12 χρόνων	0.3 – 0.7 (1.0 – 2.4 nmol/L)
	12-14 χρόνων	0.5 – 1.0 (1.7 – 3.5 nmol/L)
	> 14 χρόνων	0.8 – 2.3 (2.8 – 8.0 nmol/L)
	<b>Ανδροστενεδιόλη</b>	
<b>Ολική τεστοστερόνη(πρωινό δείγμα)</b>	Προεφηβική	8 – 14 ng/dl (0.28 – 0.49 nmol/L)
	Εφηβική	84 – 480 ng/dl (2.91 – 6.24 nmol/L)
	Ενήλικας	300 – 1000 ng/dl (10.4 – 34.7 nmol/L)
<b>Ελεύθερη τεστοστερόνη</b>	20 –40 χρόνων	15.0 – 40.0 pg/ml (520 – 1387 pmol/L)
	41 –60 χρόνων	13.0 – 35.0 pg/ml (451 – 1213 pmol/L)
	61 –80 χρόνων	12.0 – 28.0 pg/ml (416 – 971 pmol/L)
<b>Διυδροτεστοστερόνη</b>	Προεφηβική	< 3 – 13 ng/ml (< 0.1 – 0.4 nmol/L)
	Ενήλικας	30 – 100 ng/ml (1.0 – 3.4 nmol/L)
<b>Δεοξυκορτικοστερόνη</b>	Προεφηβική	2 – 34 ng/ml (61 – 1030 pmol/L)
	Ενήλικας	2 – 19 ng/ml (61 – 576 pmol/L)
<b>Κορτιζόλη</b>	Ενήλικας(πρωί)	5 – 20 µg/ml (140 – 552 nmol/L)
	Ενήλικας(απόγευμα)	2.5 – 10 µg/ml (69 – 276 nmol/L)
<b>Προλακτίνη</b>		0 – 15 ng/ml

## 1.2 Φυσιολογία των οιστρογόνων στους άνδρες

Στους άνδρες τα ανδρογόνα (ανδροστενεδιόνη, διυδροεπιανδροστερόνη που παράγονται στα επινεφρίδια και η τεστοστερόνη που παράγεται στους όρχεις) χρησιμεύουν ως πρόδρομες ουσίες για την χημική μετατροπή σε οιστρόνη και οιστραδιόλη μέσω του ενζύμου της αρωματάσης. Οι όρχεις από μόνοι τους παράγουν περίπου το 20% της ολικής οιστραδιόλης ενώ το σχεδόν το 20% της ολικής οιστρόνης παράγεται από τα επινεφρίδια μέσω της ανδροστενεδιόνης.

Το αίμα μεταφέρει σταθερή ποσότητα τεστοστερόνης (T) σε οιστραδιόλη (E2) στο πλάσμα π.χ. το κλάσμα παραγωγής στο αίμα της (T) σε οιστραδιόλη είναι 0.33% και της ανδροστενεδιόνης σε οιστρόνη είναι 1.14%, από το τελευταίο το 5% μετατρέπεται σε οιστραδιόλη. Η μέση συγκέντρωση E2 στους άνδρες είναι 2ng/dl και ο μεταβολικός ρυθμός κάθαρσης είναι 1600 L/24 ώρες, συνεπάγεται ότι ο ρυθμός παραγωγής E2 στο αίμα, είναι περίπου 30-40 μg/24 ώρες. Αυτό το πόσο προέρχεται από τα ακόλουθα: με εκκριτική παραγωγή από τα κύτταρα Leydig 5-10 μg/ημέρα, από περιφερική μετατροπή της T του πλάσματος 20 μg και 10-15 μg από περιφερική μετατροπή της ανδροστενεδιόνης.

Η αρωματάση είναι το ένζυμο μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα Simpson και συν. Η ολική ποσότητα της οιστραδιόλης που δημιουργείται στους περιφερικούς ιστούς μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότερη καθώς μέρος της περιφερικά μετατρεπόμενης E2 μεταβολίζεται περαιτέρω *in situ* (σε οιστρόνη, οιστριόλη ή 2-υδροξυ-οιστραδιόλη) και για αυτό το λόγο δεν εισέρχεται στην κυκλοφορία.

Ο λιπώδης ιστός είναι η πιο σημαντική πηγή παραγωγής οιστρογόνων στους άνδρες. Ο μυϊκός ιστός, ο εγκέφαλος, ο μαστός, το δέρμα, το ήπαρ και ο οστίτης ιστός είναι ικανοί να συνθέσουν οιστρογόνα από τις πρόδρομες μορφές τους. Τα επίπεδα της κυκλοφορούσας E<sub>2</sub> στους νέους άνδρες είναι περίπου 70-150 pmol/L, που είναι ισοδύναμο με τα επίπεδα της πρώιμης θυλακικής φάσης στις γυναίκες.

### 1.2.1 Οιστρογόνα στους άνδρες και γήρανση

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ενώ τα επίπεδα της T στο πλάσμα εμφανίζουν μια πτώση με την αύξηση της ηλικίας, τα επίπεδα των οιστρογόνων παραμένουν σχετικά σταθερά κατά την γήρανση των ανδρών με αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου οιστρογόνων /ανδρογόνων.

Οι παράγοντες που συντελούν στα σχετικά σταθερά επίπεδα οιστραδιόλης E2 στη γεροντική ηλικία είναι η σχετική αύξηση του λιπώδους ιστού με την αύξηση της ηλικίας

καθώς και η παράλληλη αύξηση της δραστηριότητας της αρωματάσης. Τα προαναφερθέντα ανταποκρίνονται στην κλινική παρατήρηση της αυξημένης συχνότητας γυναικομαστίας στους ηλικιωμένους άνδρες. Ο Vermeulen και συν. (1999) μελέτησαν τρεις ηλικιακές ομάδες ανδρών: νεαρούς άνδρες (ηλικίας 24-31 ετών, αριθμός 90) μέσης ηλικίας άνδρες (37-46 ετών, αριθμός 46) και ηλικιωμένους άνδρες (70-79 ετών, αριθμός 283). Οι ερευνητές βρήκαν μια σημαντική συσχέτιση, ανεξάρτητη από την ηλικία, μεταξύ της ολικής συγκέντρωσης T πλάσματος και ολικής E2 πλάσματος ( $r=0.56$ ,  $P<0.01$ ) καθώς και μεταξύ της ελεύθερης T και ελεύθερης E2 ( $r=0.53$ ,  $P<0.01$ ).

Μετά από λεπτομερή ανάλυση των ευρημάτων διαπιστώθηκε ότι η γήρανση δεν επηρεάζει σημαντικά τα κυκλοφορούντα επίπεδα της οιστραδιόλης. Η SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) δεσμεύει την διυδροτεστοστερόνη (DHT) και την T καθώς και την E2. Η δεσμευτική ικανότητα της SHBG αυξάνεται με την ηλικία με συνέπεια η μέση τιμή των επιπέδων της βιοδιαθέσιμης E2 (δηλ της μη συνδεδεμένης με την SHBG) να ελαττώνεται με την αύξηση της ηλικίας (Barros και συν. 2011).

Αυξανόμενη της ηλικίας, παρατηρούμε μια πτώση της ολικής και της ελεύθερης τεστοστερόνης που δεν συνοδεύεται από παράλληλη μείωση των επιπέδων της ολικής και ελεύθερης E2. Αυτό εξηγείται μερικώς από την αύξηση του λιπώδους ιστού και μερικώς από την αύξηση της δραστηριότητας της αρωματάσης που συνοδεύουν την αύξηση της ηλικίας.

### 1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα της οιστραδιόλης

Η τεστοστερόνη είναι η κύρια πρόδρομη ουσία της παραγωγής της οιστραδιόλης στους άνδρες και υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση της T και της E2 καθώς και μεταξύ της ελεύθερης T και ελεύθερης E2. Ο Bhasin και συν. (2010) παρατήρησε ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης στο επίπλου είναι το 1/10 της δραστηριότητας στο γλουτιαίο λίπος, που ανταποκρίνεται στο εύρημα ότι το γλουτιαίο λίπος το κυρίως μέρος αρωματοποίησης στους άνδρες. Η αύξηση του λίπους και κυρίως του γλουτιαίου είναι ο κύριος ρυθμιστής της ελάττωσης των επιπέδων της τεστοστερόνης.

Άλλες μελέτες παρουσιάζουν μια πτώση των επιπέδων της βιοδιαθέσιμης E2 και T με την πρόοδο της ηλικίας. Πιθανόν αυτή η ασυμφωνία οφείλεται στο διαφορετικό τρόπο μέτρησης της ολικής και ελεύθερης E2 σε αυτές τις μελέτες. Η E2 συνδέεται με την SHBG ασθενέστερα σε σύγκριση με την τεστοστερόνη. Τα επίπεδα της SHBG αυξάνονται με την πρόοδο της ηλικίας στους άνδρες και αυτό εξηγεί την παράλληλη πτώση της βιοδιαθέσιμης και ελεύθερης E2. Το ίδιο συμβαίνει και με την ελεύθερη T που παρουσιάζει όμως σε μικρότερο βαθμό ελάττωση από την αυτή των επιπέδων της ολικής T (Calof και συν, 2005).

### 1.2.3 Οιστρογόνα και εγκεφαλική λειτουργία

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς έχουν βρεθεί σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές όπως ο εγκεφαλικός φλοιός, ο υποθάλαμος, η υπόφυση και το λιμπικό σύστημα (η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος) και συνεχώς ανευρίσκονται καινούρια δεδομένα για τη δράση των οιστρογόνων στον εγκέφαλο. Οι μελέτες διενεργούνται κυρίως σε μοντέλα ζώων. Στη διάρκεια της εξέλιξης του νευρικού συστήματος κατά την εμβρυϊκή περίοδο τα οιστρογόνα επηρεάζουν τη φυλετική διαφοροποίηση των ιστών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (Camacho και συν, 2013).

Τα οιστρογόνα είναι υπεύθυνα για την προαγωγή της εξέλιξης του νευρικού συστήματος, τη διαφοροποίηση των νευρώνων και τη δημιουργία συνάψεων. Έχει διαπιστωθεί ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν ποικίλες διαδικασίες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, όπως οι γνωσιακές λειτουργίες, ο συντονισμός των κινήσεων, ο πόνος και οι συγκινησιακές καταστάσεις, μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα  $\alpha$  και  $\beta$  (ER $\alpha$  και ER $\beta$ ). Μερικές από τις δράσεις των οιστρογόνων γίνονται μέσω υποδοχέων ενώ άλλες επιτυγχάνονται μέσω δεύτερου μηχανισμού μηνύματος, νευρικής διέγερσης και ιοντικών καναλιών (Cauley και συν, 1987).

Είναι γνωστό ότι οι άνδρες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου από τις γυναίκες, αυτό συνεπάγεται εγκεφαλικές διαταραχές λόγω αγγειακών βλαβών στους άνδρες συχνότερα από τις γυναίκες. Στη νόσο Alzheimer, οι άνδρες βρίσκονται σε πλεονεκτική θέση σε σχέση με τις γυναίκες, τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν ένα νευροπροστατευτικό ρόλο στην αποτροπή ή καθυστέρηση της νόσου. Οι μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες φαίνεται να προστατεύονται από τη νόσο Alzheimer όταν λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα αυξάνουν τη χολινοακετυλτρανσφεράση, το ένζυμο που χρειάζεται για την σύνθεση της ακετυλχολίνης, και συνεπώς ενισχύουν τη χολινεργική δράση. Η χολινεργική δράση υπολείπεται στη νόσο Alzheimer. Η E2 μειώνει την παραγωγή του 40 και 42 αμινο-βήτα αμυλοειδικών πεπτιδίων που συσσωρεύονται για να συνθέσουν εγκεφαλικές πλάκες σε ευάλωτες εγκεφαλικές περιοχές υπεύθυνες για τη νόσο Alzheimer (Deroo και συν, 2006).

Πρόσφατα βρέθηκε ότι στα θηλυκά ποντίκια η E2 αυξάνει την έκφραση των γονιδίων του υποδοχέα της 5-υδροξυ τρυπταμίνης και του σερετονινικού μεταφορέα σε περιοχές του εγκεφάλου, που στους ανθρώπους αντιστοιχούν σε περιοχές σχετιζόμενες με τη μάθηση, τη διανοητική κατάσταση και τη μνήμη. Στα αρσενικά ποντίκια ο ευνουχισμός μείωσε την πυκνότητα των 5-υδροξυ τρυπταμινικών υποδοχέων στον προεγκέφαλο (forebrain), ενώ τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα -χωρίς τη μη αρωματοποιημένη διδροτεστοστερόνη (DHT)-

αύξησαν. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η δράση της τεστοστερόνης στον εγκέφαλο επιτυγχάνεται με την αρωματοποίηση της σε οιστραδιόλη. Τα οιστρογόνα αλληλεπιδρούν με ακετυλχολινεργικά, σεροτονεργικά (5-HT), μονοαμινοξειδάσης και κατεχολαμινεργικά συστήματα του εγκεφάλου καθώς και μέσω συνάψεων που επάγονται από οιστρογόνα. Οι τελευταίοι δυο τρόποι ενοχοποιούνται στην κατάθλιψη και την σχιζοφρένεια (Haddad και συν, 2007).

Υπάρχει η ένδειξη ότι τα ανδρογόνα συμβάλλουν στην προστασία από τη νόσο Alzheimer με το δικό τους τρόπο, έτσι υποκαθιστώντας τα ανδρογόνα στους ηλικιωμένους άνδρες που η τεστοστερόνη είναι κάτω από κάποιο επίπεδο, θα υποκαθιστούσαμε στην πραγματικότητα τόσο τα ανδρογόνα όσο και τα οιστρογόνα. Υπάρχει όμως ασυμφωνία των ερευνών στους ηλικιωμένους άνδρες. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε σχέση μεταξύ μάθησης και οιστρογόνων στις γυναίκες αλλά όχι στους άνδρες ενώ άλλη βρήκε συσχέτιση μεταξύ μάθησης και βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης αλλά όχι με την E2.

Τα οιστρογόνα συμβάλλουν στη σαφήνεια της μνήμης μέσω της δράσης τους στους νευρώνες του υπόκαμπου. Η δράση αυτή των οιστρογόνων ενισχύεται με την συνειδητή ανάκληση γεγονότων και αυτοβιογραφικών στοιχείων. Η σαφήνεια της μνήμης (explicit memory) είναι ο πιο ευαίσθητος τομέας στην αποστέρηση των οιστρογόνων.

Οι γυναίκες που λαμβάνουν οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης καθώς και οι άνδρες με επίπεδα οιστρογόνων μεγαλύτερα από αυτά των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών επιδεικνύουν καλύτερα αποτελέσματα σε μαθησιακά καθήκοντα. Ο υπόκαμπος πιθανόν παίζει ρόλο –κλειδί, στην επαγομένη από τα οιστρογόνα, μαθησιακή λειτουργία. Πρόσφατα βρέθηκαν ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα επιδρούν και στις λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού την προσοχή την υπο επεξεργασία μνήμη (working memory). Δυο πρόσφατες μετααναλυτικές μελέτες με διαφορετικά σκευάσματα οιστρογόνων και διαφορετικές ψυχομετρικές παραμέτρους δεν κατέληξαν σε σαφή συμπεράσματα για την επίδραση των οιστρογόνων στην μνήμη.

Αναμένεται ότι τα οιστρογόνα, μέσω νευροδιαβιβαστικών μηχανισμών, μπορούν να επιδρούν στη διάθεση, στη σαφή μνήμη και τη λεκτική ευχέρεια. Οι γυναίκες πλεονεκτούν σε σχέση με τους άνδρες στην έκβαση της οξείας νευρολογικής βλάβης και υποφέρουν λιγότερο από μεταισχαιμικές και μετατραυματικές βλάβες του εγκεφάλου. Υπάρχει η θεωρία ότι τα οιστρογόνα δρουν ως αντιοξειδωτικές ουσίες και η προγεστερόνη σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες. Στο μέλλον ο πιθανός θεραπευτικός ρόλος μη θυλοεποποιητικών εκλεκτικών ρυθμιστών των οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs - Selective Estrogen Receptor Modulators) θα καθοριστεί με μεγαλύτερη σαφήνεια.

Πρόσφατες μελέτες ερευνούν τη σχέση οιστρογόνων και ανδρικής σεξουαλικότητας. Σε πρόσφατη μελέτη η υποκατάσταση οιστρογόνων σε άνδρα με έλλειψη αρωματάσης αύξησε τη σεξουαλικότητα που καθορίζεται από τη γενετήσια ορμή (libido).

#### **1.2.4 Οιστρογόνα και Οστά**

Σε διάφορες μελέτες υπάρχουν αποδείξεις ότι τα οιστρογόνα προστατεύουν τις γυναίκες από την οστεοπόρωση. Στους άνδρες έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ατόμων με σοβαρή διαταραχή της δράσης των οιστρογόνων. Αυτά τα άτομα είχαν καθυστέρηση στη σύγκλιση των επιφύσεων και οστεοπενία. Ο ρόλος των οιστρογόνων, στο μεταβολισμό των οστών στον άνδρα με διαταραχή στο ERα και σε έναν άλλο με έλλειψη αρωματάσης, φάνηκε από το γεγονός ότι η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων είχε ευεργετική δράση στη σκελετική ανάπτυξη και ωρίμανση.

Στους φυσιολογικούς ηλικιωμένους άνδρες τα οιστρογόνα διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο από ότι η T στην απορρόφηση του οστού. Στους ηλικιωμένους άνδρες επίπεδα οιστρογόνων χαμηλότερα από τα φυσιολογικά σχετίζονται με σκελετικά κατάγματα. Η σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της E2 σε επίπεδα κάτω από 40 pmol/l είναι η κύρια αιτία απώλειας οστού στους ηλικιωμένους άνδρες.

Τα αποτελέσματα οιστρογόνων και ανδρογόνων στα οστά πιθανόν επιτυγχάνονται μέσω του ινσουλινομορφου αυξητικού παράγοντα (IGF-1). Σε ευνουχισμένους transsexuals η χορήγηση μεγάλων δόσεων οιστρογόνων ήταν ικανή για τη διατήρηση της οστικής μάζας.

#### **1.2.5 Οιστρογόνα και Καρδιαγγειακό σύστημα**

Παραδοσιακά πιστεύεται ότι η σχέση των φυλετικών ορμονών με το καρδιαγγειακό σύστημα καθορίζεται από την ευεργετική δράση των οιστρογόνων και την βλαπτική δράση των ανδρογόνων στο λιπίδια (Hodgin και συν, 2002). Τα ευρήματα σε άνδρες με έλλειψη της αρωματάσης ενισχύουν αυτή την άποψη. Οι άνδρες με έλλειψη αρωματάσης εμφανίζουν μεταβολικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του μεταβολικού συνδρόμου (υψηλά τριγλυκερίδια, χαμηλή HDL, υψηλό λόγο LDL/HDL και ινσουλινοαντίσταση) που βελτιώνεται με τη χορήγηση οιστρογόνων. Η αύξηση της HDL οφείλεται στα οιστρογόνα αλλά μπορεί να οφείλεται και στην πτώση των ανδρογόνων σαν αποτέλεσμα του αρνητικού feedback από τα εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα στην έκκριση της υποφυσιικής LH (η LH αυξάνεται στους άνδρες με μειωμένη βιολογική δράση οιστρογόνων). Πρόσφατες μελέτες δεικνύουν ότι η επίδραση των ενδογενών οιστρογόνων στο καρδιαγγειακό σύστημα δεν

περιορίζεται στα λιπίδια, τη γλυκόζη και την ινσουλίνη αλλά στη δράση των στεροειδών του φύλου σε βιολογικά συστήματα (κατανομή λίπους, παράγωγες ουσίες των αγγείων – ενδοθηλίνη, νιτρικό οξείδιο, αιμοπετάλια, παράγοντες φλεγμονής και πήξεως) . Παραδοσιακά υπάρχει η αντίληψη ότι οι γυναίκες, σε σχέση με τους άνδρες, προστατεύονται από καρδιαγγειακά νοσήματα μέχρι την εμμηνόπαυση. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην ευεργετική δράση των οιστρογόνων στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Huang και συν, 2006).

Είναι παράδοξο ότι σε διασταυρούμενες μελέτες οι άνδρες με υψηλά οιστρογόνα και σχετικά χαμηλή T, εμφάνιζαν αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (ΣΝ) και εμφράγματος. Μελέτες σε ηλικιωμένους άνδρες κατέληξαν σε αντίθετα συμπεράσματα από τη γενική αντίληψη για τα ανδρογόνα ότι επηρεάζουν τα λιπίδια αυξάνοντας τον κίνδυνο για ΣΝ. Σε μια μελέτη ανδρών με διαβήτη τύπου 2, οι ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα ολικής και ελεύθερης τεστοστερόνης, υψηλότερη HDL και χαμηλότερα τριγλυκερίδια από ότι η ομάδα των μαρτύρων.

Ο κοινός παρονομαστής σε αυτές τις μελέτες μπορεί να είναι η σπλαχνική παχυσαρκία και τα χαμηλά επίπεδα T πλάσματος. Η μεγάλη ποσότητα λίπους σε αυτούς τους άνδρες μπορεί να είναι μια αιτία για την υψηλή E2 σε αυτούς τους άνδρες.

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των επιπέδων των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και του κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Η μείωση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων ή ελαττωματική δράση των οιστρογόνων στους άνδρες οδηγούν σε δυσλιπιδαιμία. Τα οιστρογόνα έχουν απευθείας δράση στο αγγειακό τοίχωμα. Ελαττωματική δράση των οιστρογόνων οδηγεί σε μειωμένη αγγειοδιαστολή λόγω μειωμένης παραγωγής/ διάθεσης NO σε περιφερικές αρτηρίες μετά από ένα ισχαιμικό ερέθισμα. Σε υγιείς νέους ευγοναδικούς άνδρες χαμηλή δόση E2 ενίσχυσε την αγγειοδιαστολή χωρίς να επιδρά στο μέγεθος του αγγείου ή στις λείες μυϊκές ίνες αυτού (Hulley και συν, 1998).

Μελέτες *in vitro* έδειξαν απευθείας δράση χαμηλών δόσεων οιστρογόνων σε νευρωνικού τύπου νιτρική συνθετάση σε ουδετερόφιλα ανδρών. Μελέτες σε υπογοναδικούς άνδρες και άνδρες με στεφανιαία νόσο έδειξαν ευεργετική επίδραση των οιστρογόνων και SERMs στο ενδοθήλιο. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μετρήσεις της αγγειακής δραστηριότητας στο βραχίονα καθώς κι ενδοθηλιακών και μη αντιδράσεων στην ισχαιμία. Οι ερευνητές πιστεύουν ότι η επίδραση της E2 στο ενδοθήλιο, σε αυτά τα πειράματα, δεν οφείλονται στην ικανότητα της E2 ή της ταμοξιφαίνης να ελαττώνουν τη χοληστερίνη στο αίμα (Khan και συν, 2003).

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα οι ER βρίσκονται σε μεγάλη πυκνότητα (20 έως 80 χιλιάδες ανά κύτταρο), και όπως διαπιστώθηκε με ανοσοσήμανση, η πυκνότητα τους είναι

παρόμοια σε κύτταρα ανδρών και γυναικών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και μελέτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic Mobility Assays) και μορίου σύνδεσης (Ligand Bindin) (Karas και συν, 1999).

Υπάρχουν ενδείξεις η δράση των οιστρογόνων στο ενδοθήλιο διαμεσολαβείται από τον ERα καθώς και από μη γενομικούς μηχανισμούς. Η δράση των οιστρογόνων έχει ταχεία έναρξη και παύση και δεν περιλαμβάνει το μηχανισμό του NO στα λεία μυϊκά κύτταρα (Kent και συν, 2004).

### 1.2.6 Οιστρογόνα και προστάτης

Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η συνεργική δράση οιστρογόνων ανδρογόνων είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη του προστάτη στη διάρκεια της ζωής ενός άνδρα.

Σε ηλικιωμένους άνδρες η T πλάσματος και ειδικότερα η ελεύθερη T μειώνεται ενώ το επίπεδο της E2 μένει σχετικά σταθερό. Η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη (ΚΥΠ) συμβαίνει σε ηλικιωμένους άνδρες, η επαγομένη αύξηση του λόγου οιστραδιόλης / τεστοστερόνης έχει ενοχοποιηθεί για αυτό το γεγονός, μετά από παρατηρήσεις σε σκύλους. Ιστολογικά η ΚΥΠ είναι περισσότερο ασθένεια του στρώματος παρά του επιθηλίου, σύμφωνα με μελέτες που η συγκέντρωση της οιστραδιόλης και της οιστρόνης αυξήθηκαν στο στρώμα αλλά όχι στο επιθήλιο (Lapauw και συν 2008).

Στο φυσιολογικό προστάτη, σε αντίθεση με την ΚΥΠ, η συγκέντρωση της E2 και της οιστρόνης είναι μεγαλύτερη στο επιθήλιο από το στρώμα. Το επίπεδο της στρωματικής DHT δεν δείχνει να συσχετίζεται με την ηλικία. Ένας υποθετικός μηχανισμός, που εξηγεί τη δράση των οιστρογόνων στο προστάτη, είναι ότι τα οιστρογόνα επάγουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του ανδρογονικού υποδοχέα. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι η αύξηση της SHBG με την ηλικία διευκολύνει τη γένεση cAMP στον προστάτη, προάγοντας την ανάπτυξη του. Έτσι η αναστολή της βιολογικής δράσης της E2 μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη στρωματική υπερπλασία.

Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μιας μελέτης που η μείωση του επιπέδου των οιστρογόνων, χρησιμοποιώντας την αταμεστάνη που είναι αναστολέας της αρωματάσης, δεν είχε καμία δράση στην κλινικά εγκατεστημένη ΚΥΠ. Η διακοπή του αρνητικού feedback των οιστρογόνων στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα είχε σαν παρενέργεια την αύξηση του επιπέδου των ανδρογόνων.



### 1.2.7 Οιστρογόνα και ανοσοποιητικό σύστημα

Η αθηροσκλήρυνση είναι μια ενεργής φλεγμονώδης διαδικασία. Σε μελέτες με υπερχοληστερολαιμικά ποντίκια που είχαν είτε έλλειψη σε μακροφάγα –μονοκύτταρα είτε σε ώριμα Β και Τ λεμφοκύτταρα ανέπτυξαν υποδεκαπλάσιες και υποδιπλάσιες αντίστοιχα λιπώδεις γραμμώσεις από τα ποντίκια control.

Στα ποντίκια με έλλειψη σε διάφορες κυτοκίνες φάνηκε ο επιβαρυντικός ρόλος των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (όπως IF- $\gamma$ , ιντερφερόνη γάμμα) ιντερλευκινών (II- 1 $\alpha$  και  $\beta$ , II-12, II-18) και ο προστατευτικός ρόλος των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (κυρίως της, II-10) στη αθηροσκληρυντική διαδικασία.

Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο είναι κριτικής σημασίας στην έναρξη και τον σχηματισμό των λιπωδών γραμμώσεων. Τα λευκοκύτταρα πρώτα υπόκεινται σε αλληλεπίδραση σελεκτίνης και του μορίου πρόσδεσης στη σελεκτίνη, το οποίο επιτρέπει στα κύτταρα να κυλήσουν στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. Οι υποδοχείς των χυμοκινών έρχονται σε επαφή με τις χυμοκίνες που εκκρίνονται στο ενδοθήλιο, προκαλώντας την ενεργοποίηση των ιντεκρινών. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο για την ισχυρή προσκόλληση διαμέσου των μορίων προσκόλλησης (που ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών) όπως ICAM (ενδιάμεσα μόρια προσκόλλησης) και VCAM-1 (αγγειακά μόρια προσκόλλησης). Αυτή η διαδικασία ακολουθείται από την μετανάστευση των λευκοκυττάρων από το αγγειακό στον υποενδοθηλιακό χώρο. Το εναρκτήριο βήμα στην εγκατάσταση των λιπωδών γραμμώσεων αποτελεί στόχο των οιστρογόνων μέσω του VCAM-1.

Τα οιστρογόνα όπως φάνηκε στη μελέτη των Vimani και συν. επηρεάζουν τα αντιφλεγμονώδη κύτταρα στις αθηρωματικές εστίες ιδιαίτερα τις ασταθείς βλάβες που μπορούν να οδηγήσουν σε οξεία συμβάματα όπως έμφραγμα. Τα οιστρογόνα προστατεύουν από την εναπόθεση των λιπωδών γραμμώσεων στα Apo E-KO ποντίκια, χωρίς όμως να έχουν καμία επίδραση ApoE και RAG-2 knock out ποντίκια (με έλλειψη σε Β και Τ λεμφοκύτταρα). Η υπόθεση που υποστηρίζεται από αυτές τις παρατηρήσεις είναι ότι τα λεμφοκύτταρα ή τουλάχιστον ένας υποπληθυσμός τους είναι μεσολαβητές της αθηροπροστατευτικής δράσης. Μετά από διασταύρωση ApoE-KO ποντίκια με ποντίκια με έλλειψη είτε σε Β ή Τ υποδοχέα (TCR) $\alpha\beta$ +T ή (TCR) $\gamma\delta$ +T λεμφοκύτταρα φάνηκε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι ο διαμεσολαβητής για τις αθηροπροστατευτικές δράσεις των οιστρογόνων καθώς ούτε και η αύξηση των κυτοκινών αντίθετα μπορεί να αποσταθεροποιήσουν την αθηρωματική πλάκα (Rossouw και συν. 2002).

### 1.2.8 Οιστρογόνα και ενδοθήλιο

Το ενδοθήλιο συμμετέχει στη ρύθμιση της πήξης, την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, στη φλεγμονή, την διαμέσου των αγγείων ροή των υγρών - κυττάρων, του αγγειακού τόνου και την αύξηση των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων. Ο κύριος παράγοντας σε όλες αυτές τις δραστηριότητες είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) το οποίο παίζει προστατευτικό ρόλο αναστέλλοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, τη χημειοταξία των μονοκυττάρων και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που επάγονται από τις κυτοκίνες (Lee και συν, 2006).

Σε πειράματα σε κουνέλια με υπερχοληστερολαιμική διατροφή η αναστολή του NO στις πρώτες εβδομάδες προάγει την αθηρωμάτωση. Το NO βρέθηκε μειωμένο σε αθηροσκληρωτικά αγγεία τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματικά μοντέλα. Τελικά το NO πιθανόν προστατεύει ενάντια στα τελικά στάδια της αθηροσκλήρυνσης, όπως η θρόμβωση, αναστέλλοντας την προσκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Πειραματικές και κλινικές μελέτες υποδηλώνουν ότι η E2 ενεργεί αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω ευόδωσης της παραγωγής του NO καθώς βρέθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της συνθάσης NO από την E2 (Lobby P και συν) . Μια άλλη υπόθεση είναι ότι μειώνεται η αποδόμηση NO καθώς βρέθηκε μείωση στις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου (Reactive oxygen species ROS) λόγω των οιστρογόνων. Οι ROS αλληλεπιδρούν με το NO για να σχηματίσουν υπεροξυνιτρίλια καταστρέφοντας το NO. Ο ERα φαίνεται ότι είναι ο μεσολαβητής της ενοϊκής δράσης των οιστρογόνων στην παραγωγή του NO (Darblade και συν, 2002).

Η E2 προάγει την ενδοθηλιακή ανάπτυξη, την αγγειογονική δραστηριότητα, την μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η παράμετρος μπορεί να συμμετέχει στη αθηροπροστατευτική δράση (Lin και συν, 2007). Η πιο συχνή θεραπεία των επιλοκών της αθηροσκλήρυνση είναι η ενδοαυλική αγγειοπλαστική που ακολουθείται από την τοποθέτηση ενδοαυλικού stent. Η διαδικασία περιλαμβάνει την πίεση της αθηρωματικής πλάκας στο αρτηριακό τοίχωμα διογκώνοντας ένα μπαλόνι. Τα άμεσα αποτελέσματα είναι καλά αλλά αυτά αλλοιώνονται από το φαινόμενο της επαναστένωσης εντός λίγων μηνών (στο 30-50% των περιπτώσεων) που είναι συνέπεια της περιοριστικής αναδιαμόρφωσης (remodeling) και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κύτταρων του νέου εσωτερικού χιτώνα. Το remodeling αποτρέπεται με την τοποθέτηση ενδοαυλικού stent. Ο πολλαπλασιασμός όμως των κυττάρων δεν εμποδίζεται από την τοποθέτηση του stent και είναι υπεύθυνο για την επαναστένωση σε 20-30% των περιπτώσεων. Δύο προσεγγίσεις που

εγκαταλείφθηκαν ήταν η ακτινοβολία και η χρήση αντιμυτωτικών φαρμάκων που επάλειψαν τα stent, γιατί προκαλούσαν μεταγενέστερα θρόμβωση.

Ο Brouchet και συν. (2001) έδειξαν ότι σε ποντίκια στα οποία προκαλούσαν βλάβη με ηλεκτρικό ρεύμα, καταστρέφοντας τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, στην καρωτίδα η E2 επιτάχυνε την επανενδοθηλίωση μέσου του ERα. Ο βαθμός της αυτόματης επανενδοθηλίωσης ήταν φυσιολογικός όταν η παραγωγή του NO ή η δραστηριότητα του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ανεστάλησαν αλλά καταργήθηκαν σε ποντίκια με έλλειψη του FGF-2 (Fibroblast Growth Factor - 2). Ο FGF-2 φαίνεται να συνεργάζεται με την E2 γιατί η E2 επάγει το mRNA του FGF-2. Παρ'ότι η έκφραση του FGF-2 είναι πολύπλοκη καθώς υπάρχουν πέντε ισομορφές των 18, 22, 22.5, 24 και 34 kDa στους ανθρώπους και τρεις ισομορφές των 18, 21 και 22 kDa στα ποντίκια συντίθενται μέσω διαφορετικής χρήσης της μετάφρασης των κωδικονίων έναρξης. Οι ισομορφές διαφέρουν μόνο στο αμινοτελικό άκρο NH<sub>2</sub>. Σε αντίθεση το κωδικόνιο έναρξης AUG του FGF-2 είναι κυρίως κυττοπλασματικό και εκκρίνεται και αποθηκεύεται στην εξωκυττάρια ουσία. Το κωδικόνιο έναρξης AUG 18kDa πιστεύεται ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και επάγουν την προς τα κάτω ρύθμιση των FGF υποδοχέων. Αυτοί είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τυροσινικής κινάσης με υψηλή συγγένεια που λειτουργούν σε συνεργασία με χαμηλής συγγένειας (πρωτεογλυκάνες της heparan sulfate) που ενεργοποιούν τις MAP (mitogen-activated protein) κινάσες και/ή τα μονοπάτια, τα εξαρτώμενα από τη φωσφολιπάση C. Παράλληλα με αυτές τις μελέτες η E2 διεγείρει την δράση των MAP κινασών μέσω αυτοκρινικής αγκύλης που περιλαμβάνει τον FGF-2. Είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η διεγερτική δράση της E2 στην επανενδοθηλίωση συσχετίστηκε με υψηλού μοριακού βάρους ισομορφές του FGF2).

Τελικά η επανενδοθηλίωση ακολουθείται από μείωση της δημιουργίας των λιπιδίων γραμμώσεων στο σημείο της βλάβης.

Συμπερασματικά η E2 ασκεί αθηροπροστατευτική δράση. Παρότι η χοληστερόλη μειώνεται η επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων είναι αμελητέα. Ανάλογα η E2 επάγει μια αύξηση στη ενδοθηλιακό βιοδιαθέσιμο NO χωρίς να επηρεάζει τον σχηματισμό των λιπιδίων γραμμώσεων. Η E2 επάγει μια αντιφλεγμονώδη απάντηση μέσω των θυμοκυττάρων 1 (Th1) αυξάνοντας την παραγωγή της ιντερφερόνης γάμμα γεγονός που θα μπορούσε να αποσταθεροποιήσει την αθηρωματική πλάκα.

### 1.3 Οιστρογόνα Τεστοστερόνη και Διυδροτεστοστερόνη στους άνδρες και καρδιαγγειακά νοσήματα

Πολυάριθμες διατμηματικές και διαχρονικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της Τ σε ηλικιωμένους άνδρες ελαττώνονται κάθε χρόνο κατά 1% (Rohrman S και συν. 2010, Larauw και συν. 2008).

Τα χαμηλότερα επίπεδα της Τ στους άνδρες σχετίζονται με χαμηλότερο επίπεδο διαβίωσης (Year B και συν. 2010 και Frost M και συν. 2013). Παρ' αυτά νεότερες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα της Τ σε ηλικιωμένους που δεν πάσχουν από κάποια ασθένεια είναι παρόμοια με αυτά των νέων ανδρών. Αυτή η παρατήρηση θα μας επέτρεπε να συμπεράνουμε ότι τα χαμηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης αντικατοπτρίζουν προϋπάρχουσες ασθένειες.

Οι αποδείξεις για τη συσχέτιση της καρδιαγγειακής νόσου με τα επίπεδα της τεστοστερόνης και τους μεταβολίτες αυτής την διυδροτεστοστερόνη και την E2 είναι ελλιπείς (Menke και συν. 2010). Μελέτες παρατήρησης από τον Year έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα Τ σχετίζονται με την παρουσία προκλινικής αθηρωμάτωσης.

Γραμμικές μελέτες παρατήρησης συσχετίζουν τα χαμηλά επίπεδα της Τ αυξάνουν τη θνησιμότητα συμπεριλαμβανόμενης και της θνησιμότητας από τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Η Τ κυκλοφορεί συνδεδεμένη με υψηλή συγγένεια με την σφαιρίνη που συνδέονται τα στεροειδή του φύλου (SHBG) και με μικρότερη συγγένεια με την αλβουμίνη με ένα μικρό κλάσμα ελεύθερο ή αδέσμευτο. Τα επίπεδα της SHBG είναι υψηλότερα σε ηλικιωμένους άνδρες και για αυτό το λόγο τα επίπεδα της ελεύθερης Τ μειώνονται πιο απότομα από ότι η ολική Τ με την αύξηση της ηλικίας ενός άνδρα (Sartorius και συν. 2012). Υπάρχει συνεχιζόμενη συζήτηση πάνω στην εγκυρότητα της «υπόθεσης της ελεύθερης ορμόνης» και κατ' επέκταση πάνω στη χρησιμότητα είτε της ελεύθερης Τ είτε του κλάσματος που δεν συνδέεται με την SHBG σαν δείκτες της ανδρογονικής κατάστασης των ηλικιωμένων ανδρών (Maggio και συν. 2012).

Οι μετρήσεις της ελεύθερης Τ με τη μέθοδο equilibrium dialysis είναι τεχνικά δύσκολες. Παρ' αυτά οι υπολογισμοί που βασίζονται στην εξίσωση μάζας δράσης μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν ακριβώς τα επίπεδα της μετρούμενης ελεύθερης Τ (Jones και συν. 2009). Η Τ μετατρέπεται από το ενδοκυττάριο ένζυμο 5 $\alpha$  αναγωγάση σε διυδροτεστοστερόνη που είναι ισχυρός συνδέτης του ανδρογονικού υποδοχέα. Η Τ μετατρέπεται από τη αρωματάση σε E2 που είναι συνδέτης του οιστρογονικού υποδοχέα  $\alpha$  και  $\beta$ . Η διυδροτεστοστερόνη και η E2 μοιράζονται της ίδιες θέσεις συνδέσεως στην SHBG με την Τ. Ανάλογα με την ολική Τ και ελεύθερη Τ, η ελεύθερη DHT και η ελεύθερη E2

τείνουν να ελαττώνονται απότομα με την αύξηση της ηλικίας στους άνδρες, ενώ τα επίπεδα της ολικής DHT και της ολικής E2 είναι πιο σταθερά (Malkin και συν, 2004).

#### 1.4 Τα Στεροειδή του φύλου και η Αρτηριοσκλήρυνση στις καρωτίδες

Η T μπορεί να μειώνει την εξέλιξη της αρτηριοσκλήρυνσης τροποποιώντας τα αποτελέσματα της αντίστασης στην ινσουλίνη, στη φλεγμονή, στη λειτουργία του ενδοθηλίου στην προκλινική αθηροσκλήρυνση στα αγγεία. Ο Fogelberg και συν (1990) αναφέρει την αθηρωμάτωση που συμβαίνει σε κουνέλια που τους χορηγήθηκε ανδρογόνο που δεν μπορεί να υποστεί αρωματοποίηση. Αυτό δείχνει ότι η T μπορεί να είναι προαθηρογόνος όταν δεν μετατρέπεται σε E2. Ο Nathan και συν (2001) έδειξε ο η T δεν ελάττωσε την αθηρωμάτωση σε ποντίκια που είχαν υποστεί ορχεκτομή, όταν σε αυτά τους χορηγήθηκε αναστολέας της αρωματάσης. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι E2 που προκύπτει από την αρωματοποίηση ασκεί αθηροπροστατευτική δράση. Σε αντίθεση η DHT δρα μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα ώστε να τροποποιήσει την αγγειογένεση σε ενδοθηλιακά κύτταρα ανδρών αλλά όχι γυναικών (Sieveking και συν. 2010). Οι μετρήσεις με υπέρηχο του πάχους του εσωτερικού μέσου χιτώνα της καρωτίδας carotid intima-media thickness (CIMT) παρέχουν ένα δείκτη της υπάρχουσας αθηρωμάτωσης και προγνωστικό δείκτη για αγγειακά επεισόδια (Lorenz και συν. 2011).

Οι μελέτες παρατήρησης σε άνδρες που εξέτασαν την επίδραση των στεροειδών είτε στην αορτή είτε στην εξέλιξη την CIMT συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα:

Πίνακας 2.

Αποτελέσματα της μελέτης	Αριθμός ανδρών της μελέτης	Βιβλιογραφική αναφορά
Αντίστροφη συσχέτιση της T με CIMT	1482	Svartberg και συν 2006
Υψηλός επιπολασμός καρωτιδικών πλακών με χαμηλά επίπεδα T. Καμία συσχέτιση μεταξύ T με CIMT.	1177	Doig και συν 2009
Αντίστροφη συσχέτιση της T και καρωτιδικών πλακών .	1101	Vikan και συν 2009
H E2 είχε θετική συσχέτιση με την πρόοδο CIMT	313	Tivesten και συν 2006

### 1.5 Τα στεροειδή του φύλου και η αορτική και περιφερική αγγειακή νόσος.

Στον πίνακα που ακολουθεί (3.) φαίνονται οι μελέτες παρατήρησης ανάμεσα στα στεροειδή του φύλου και την αορτική και περιφερική αγγειακή νόσο. Η αγγειακή νόσος των κάτω άκρων εμφανίζεται με συμπτώματα διαλείπουσας χωλότητας όταν η αποφρακτική αθηρωματική νόσος περιορίζει τη ροή αίματος με αποτέλεσμα πόνο στον τετρακέφαλο. Οι μελέτες παρατήρησης που εξετάζουν τη σχέση με τα στεροειδή του φύλου και την περιφερική αγγειακή νόσο (ΠΑΝ) χρησιμοποίησαν το δείκτη της διαλείπουσας χωλότητας με η χωρίς μείωση του δείκτη αστραγάλου /βραχίονα (ankle /brachial index,ABI) για να καθορίσουν την ΠΑΝ. Ο δείκτης ABI περιλαμβάνει το λόγο της πίεσης του αίματος στην οπίσθια κνημιαία αρτηρία στο ύψος του αστραγάλου και στη βραχιόνια αρτηρία στο χέρι. Όταν ο ABI είναι <0.90 σημαίνει την απουσία ΠΑΝ.

Πίνακας 3.

Αποτελέσματα της μελέτης	Αριθμός ανδρών της μελέτης	Βιβλιογραφική αναφορά
Χαμηλά επίπεδα FT συσχετίζονται με κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα	3620	Year και συν 2010
Μειωμένος επιπολασμός ασβεστοποίησης της κοιλιακής αορτής με υψηλά επίπεδα T.	504	Hak και συν 2002
Χαμηλή FT η υψηλή FE2 σχετίζεται με ABI.	2784	Tivesten και συν 2007
Υψηλά επίπεδα FT συσχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο διαλείπουσας χωλότητας Όπου ABI (ankle branchial index)	2703	Year και συν 2013

### 1.6 Τα στεροειδή του φύλου και καρδιαγγειακά συμβάματα

Ο Aronson και συν (2006) ανέλυσε 2084 άνδρες χωρίς προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο που προήλθαν από τη μελέτη Framingham (2011) με περίοδο παρακολούθησης 10 χρόνια.

Οι άνδρες με ολική E2 στο υψηλότερο τεταρτημόριο είχαν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακού συμβάματος σε σχέση με τους άνδρες στο κατώτερο τεταρτημόριο. Παρολ' αυτά ο Abbott (2007) στη μελέτη με 2187 άνδρες, οι άνδρες που είχαν υψηλότερα επίπεδα

ολικής E2 είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση εγκεφαλικού επεισοδίου ενώ ο Vikan (2009) δεν έδειξε καμία σχέση.

Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι χαμηλότερα επίπεδα T αυξάνουν το κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Ο Year και οι συν (2013) μελέτησε 3443 άνδρες ηλικίας >70 για διάστημα μεγαλύτερο από 3.5 χρόνια. Μετά από προσαρμογή για συμμεταβλητές όπως η ηλικία, η περίμετρος μέσης, το κάπνισμα, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και συνοδά νοσήματα, διαπιστώθηκε ότι οι άνδρες με ολική T στο κατώτερο τεταρτημόριο είχαν μεγαλύτερη επίπτωση εγκεφαλικού και παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου. Οι μελέτες που ανέλυσαν της συσχέτιση με τα οιστρογόνα ήταν πολύ λίγες και αντιφατικές.

### 1.7 Τεστοστερόνη και θνησιμότητα

Ο Tivesten και συν.(2007) μελέτησαν 3014 άνδρες ηλικίας 69-80 ετών για 4.5 χρόνια. Η ολική T και E2 μετρήθηκε σε 2639 άνδρες και οι ασθενείς που είχαν μετρήσεις και των δυο ορμονών στο κατώτερο τεταρτημόριο είχαν μεγαλύτερη θνησιμότητα. Ενδιαφέρον είναι ότι οι θάνατοι ήταν μη καρδιαγγειακοί. Υψηλότερα επίπεδα E2 σχετίστηκαν με μεγαλύτερη θνησιμότητα. Οι πιο πρόσφατες μελέτες ερεύνησαν της σχέση ολικής T με την θνησιμότητα από καρδιαγγειακά και τη θνησιμότητα από άλλα αίτια. Ο Menke και συν μελέτησε 1114 άνδρες από τη NHANES III ηλικίας > 20 που παρακολούθηθηκαν για 18 χρόνια. Βρέθηκε ότι μια μείωση στη ολική T ισοδυναμεί με τη διαφορά ανάμεσα στην 90<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, και σχετίστηκε με μεγαλύτερη θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα και από όλες τις αιτίες στα πρώτα 9 χρόνια της παρακολούθησης (αναλογία κινδύνου 1.53 και 1.43 αντίστοιχα). Για θανάτους που συνέβησαν μεταξύ 9 και 18 έτη της παρακολούθησης, οι άνδρες που είχαν ολική T στο δεύτερο τεταρτημόριο είχαν μικρότερη θνησιμότητα από όλα τα αίτια.

Ο Shores και συν. (2006) αναφέρει σε μελέτη παρατήρησης που βασίστηκε στη κλινική βάση δεδομένων των Veterans Affairs που χρησιμοποίησε μια πρωτοποριακή στρατηγική για να συγκρίνει άνδρες που ελάμβαναν θεραπεία με T και αυτούς που δεν ελάμβαναν. Υπήρξαν 1031 άνδρες με μέση ηλικία 62.1 έτη με χαμηλά επίπεδα T (<8.7 nmol/l) και χωρίς ιστορικό καρκίνου του προστάτη. Από αυτούς οι 398 έλαβαν θεραπεία με μέση διάρκεια 20 μήνες. Οι άνδρες που είχαν λάβει θεραπεία είχαν μικρότερη θνησιμότητα με τους 633 που δεν έλαβαν θεραπεία με μέσο χρόνο παρακολούθησης 40.5 μήνες. (10.3% vs 20.7%, p<0.001).

Μετά από προσαρμογή για συγχρητικούς παράγοντες οι άνδρες που έλαβαν T είχαν χαμηλότερη θνησιμότητα (HR, Hazard Ratio 0.61, 95%, CI, Confidence Interval 0.42-0.88)

το οποίο ήταν ιδιαίτερα αξιοσημείωτο στους άνδρες με προϋπάρχοντα διαβήτη (HR 0.44, 95% CI 0.23-0.84). Αυτή η μελέτη είχε κάποιους περιορισμούς, δεν ήταν τυχαιοποιημένη, οι άνδρες που τους χορηγήθηκε θεραπεία ήταν υγιείς και οι γιατροί θα μπορούσαν να έχουν επιλέξει υγιείς άνδρες για την χορήγηση της T και να μην συμπεριελάμβαναν αυτούς με περισσότερα προβλήματα. Άλλοι περιορισμοί της μελέτης ήταν ότι τα κλινικά δεδομένα ήταν περιορισμένα η διάρκεια της θεραπείας ήταν σχετικά μικρή και η αιτία θανάτου δεν προσδιορίστηκε.

Μεγάλες μελέτες με την χορήγηση placebo και τη θεραπεία T που μελετούν τη συσχέτιση με καρδιαγγειακά συμβάματα απουσιάζει.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ

### 2.1 Οι πυρηνικοί υποδοχείς

Οι ορμόνες διαιρούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το που δρουν στο κύτταρο στόχο: η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ορμόνες που δεν εισέρχονται στα κύτταρα, μεταφέροντας το ορμονικό σήμα μέσω δευτερευόντων αγγελιοφόρων που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με την κυτταρική επιφάνεια, όπως όλες οι πολυπεπτιδικές ορμόνες, οι μονοαμίνες και οι προσταγλανδίνες.

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις ορμόνες που εισέρχονται στα κύτταρα, ενώνονται με ενδοκυττάριους υποδοχείς που δρουν στον πυρήνα του κυττάρου στόχος και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Οι κλασσικές ορμόνες που χρησιμοποιούν ενδοκυττάριους υποδοχείς είναι οι θυρεοειδικές και οι στεροειδικές ορμόνες.

Τα μόρια πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχέων δεν κωδικοποιούνται απευθείας από το γονιδίωμα, έχουν μικρό μοριακό βάρος <1000 daltons και είναι λιπόφιλα ώστε να εισέρχονται στο κύτταρο.

Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται τα μόρια πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχέων και οι υποδοχείς τους φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.

---

#### ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

---

##### ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Θυρεοειδική ορμόνη :θυρεοειδικός υποδοχέας (thyroid hormone receptor, TR) α και β

Οιστρογόνα :οιστρογονικός υποδοχέας (estrogen receptor, ER) α και β

Τεστοστερόνη: ανδρογονικός υποδοχέας (androgen receptor, AR)

Προγεστερόνη: προγεστερονικός υποδοχέας (progesterone receptor, PR)

Αλδοστερόνη :υποδοχέας αλατοκορτικοειδών (mineralcorticoid receptor, MR)

Κορτιζόλη: υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR)

##### ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

1,25-(OH)<sub>2</sub> –βιταμίνη D<sub>3</sub>: υποδοχέας βιταμίνης D(VDR)

Όλα τα trans-ρετινοικά οξέα:υποδοχέας ρετινοικών οξέων, υπότυποι α, β, γ

9-cis ρετινοικά οξέα :υποδοχέας X των ρετινοιδών (RXR), υπότυποι α, β, γ

##### ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Οξυστερόλες :υποδοχέας ήπατος X(LXR), υπότυποι α, β,

Χολικά οξέα :υποδοχέας χολικών οξέων (BAR)

Λιπαρά οξέα : PPAR, υπότυποι α, β, γ

## ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΑ (XENOBIOTICS)

### Υποδοχέας πρεγνάνης (PXR)

---

#### 2.2 Οιστρογονικοί υποδοχείς

Ο Jensen και ο Jacobsen ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν ότι η βιολογική δράση των οιστρογόνων επιτελείται μέσω μιας πρωτεΐνης –υποδοχέα. Η κλωνοποίηση του πρώτου ER, που σήμερα ονομάζεται ER $\alpha$ , έγινε το 1986. Για αρκετά χρόνια οι επιστήμονες πίστευαν ότι υπήρχε μόνο ένας ER, όμως το 1995 ένας δεύτερος ER, ο ER $\beta$ , κλωνοποιήθηκε από μια cDNA βιβλιοθήκη από τον Gustafsson και τους συνεργάτες του. Οι δυο υποδοχείς δεν είναι ισόμορφα αλλά διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια που ανήκουν σε διαφορετικά χρωμοσώματα.

Το γονίδιο του ανθρώπινου ER $\alpha$  (hER $\alpha$ ) βρίσκεται στο μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 6. Το γονίδιο του ανθρώπινου ER $\beta$  (hER $\beta$ ) βρίσκεται στο μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 14 στην περιοχή 22-24. Το γεγονός ότι τα δυο γονίδια βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα αποκλείει την πιθανότητα οι ER να προέρχονται από διαφορετικά splicing του ίδιου μορίου.

Έχει καθοριστεί η οργάνωση εξονίων /ιντρονίων των γονιδίων των ER του ποντικού και του ανθρώπου. Τα όρια μεταξύ εξονίων/ιντρονίων είναι γενετικά διατηρημένα στο γονίδιο του hER $\beta$  σε σχέση με το γονίδιο του hER $\alpha$ .

Τα μεταφρασμένα εξόνια του γονιδίου ER $\beta$  του ποντικού έχουν εύρος περίπου 40 kb. Η ανάλυση του γονιδίου του hER $\alpha$  έδειξε ότι πρόκειται για πολύ μεγάλο γονίδιο του οποίου τα μεταφρασμένα εξόνια έχουν μήκος περισσότερο από 140 kb (Ponglitmongkol και συν. 1988). Τα δεδομένα εργασιών του [Enmark και των συν.](#) έδειξαν ότι το γονίδιο του hER $\beta$  έχει μήκος παρόμοιο με αυτού των ψαριών δηλ. μεταξύ 30 –40 kb. Για τα υπόλοιπα «παράλογα» γονίδια της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων το μέγεθος του γονιδίου ποικίλλει τουλάχιστον στο ίδιο εύρος με τα δυο είδη του ER. Ο PPAR (peroxisome proliferator – activated receptor) στο ποντίκι έχει μέγεθος που ποικίλει μεταξύ 30-105kb. Εικάζεται ότι το μέγεθος των ιντρονίων μπορεί να επηρεάζει την μεταγραφική δράση του γονιδίου, κυρίως σε περιπτώσεις ταχέως διαιρούμενων κύτταρων (O'Farrell 1992), μια αντίληψη που μπορεί να αληθεύει στα προκαρυωτικά και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, οργανισμούς με μικρή διάρκεια ζωής. Η σχέση αυτού του φαινομένου με τα γονίδια των θηλαστικών δεν έχει επαληθευτεί.

### 2.2.1 Τα γονίδια του οιστρογονικού υποδοχέα α και β (ERα και ERβ)

Η ανάλυση του οιστρογονικού υποδοχέα όπως και άλλων στεροειδικών ορμονών έδειξε ότι μπορούν να χωριστούν στις ακόλουθες λειτουργικές περιοχές με συγκεκριμένη αρμοδιότητα (Beato M, Cell 1995): 1. μια γενετικά διατηρούμενη περιοχή που συνδέεται με το DNA (DNA binding domain), που περιέχει δυο δακτυλίους ψευδαργύρου (zinc fingers) που συμμετέχουν στην πρόσδεση στο DNA και στο διμερισμό του υποδοχέα, 2. μια λιγότερο γενετικά διατηρούμενη περιοχή στην οποία προσδένεται η ορμόνη και που περιέχει περιοχές για την πρόσδεση της ορμόνης, το διμερισμό του υποδοχέα, την τοποθέτηση στον πυρήνα και τις αλληλεπιδράσεις με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς. 3. N-τελική A/B περιοχή που η αλληλουχία της κυμαίνεται σε μήκος και σε δομή και συνήθως περιέχει μια ενεργοποιητική περιοχή που ενεργοποιεί γονίδια-στόχους με απευθείας δράση σε μεταγραφικά στοιχεία του πυρήνα ή με συνενεργοποιητές που διαμεσολαβούν στη μετάδοση του σήματος σε άλλες πρωτεΐνες. 4. η περιοχή του αρμού (hinge domain) συμβάλλει στην ευελιξία της περιοχής πρόσδεσης στο DNA και της περιοχής πρόσδεσης του οιστρογόνου και σε μερικές περιπτώσεις λειτουργεί ως άγκυρα για κάποιες συνκατασταλτικές πρωτεΐνες. Τέλος, 5. η τελική περιοχή έχει φανεί ότι συμβάλλει στην διενεργοποιητική δυνατότητα του υποδοχέα (transactivation capacity of the receptor) αλλά οι άλλες πιθανές λειτουργίες είναι άγνωστες.

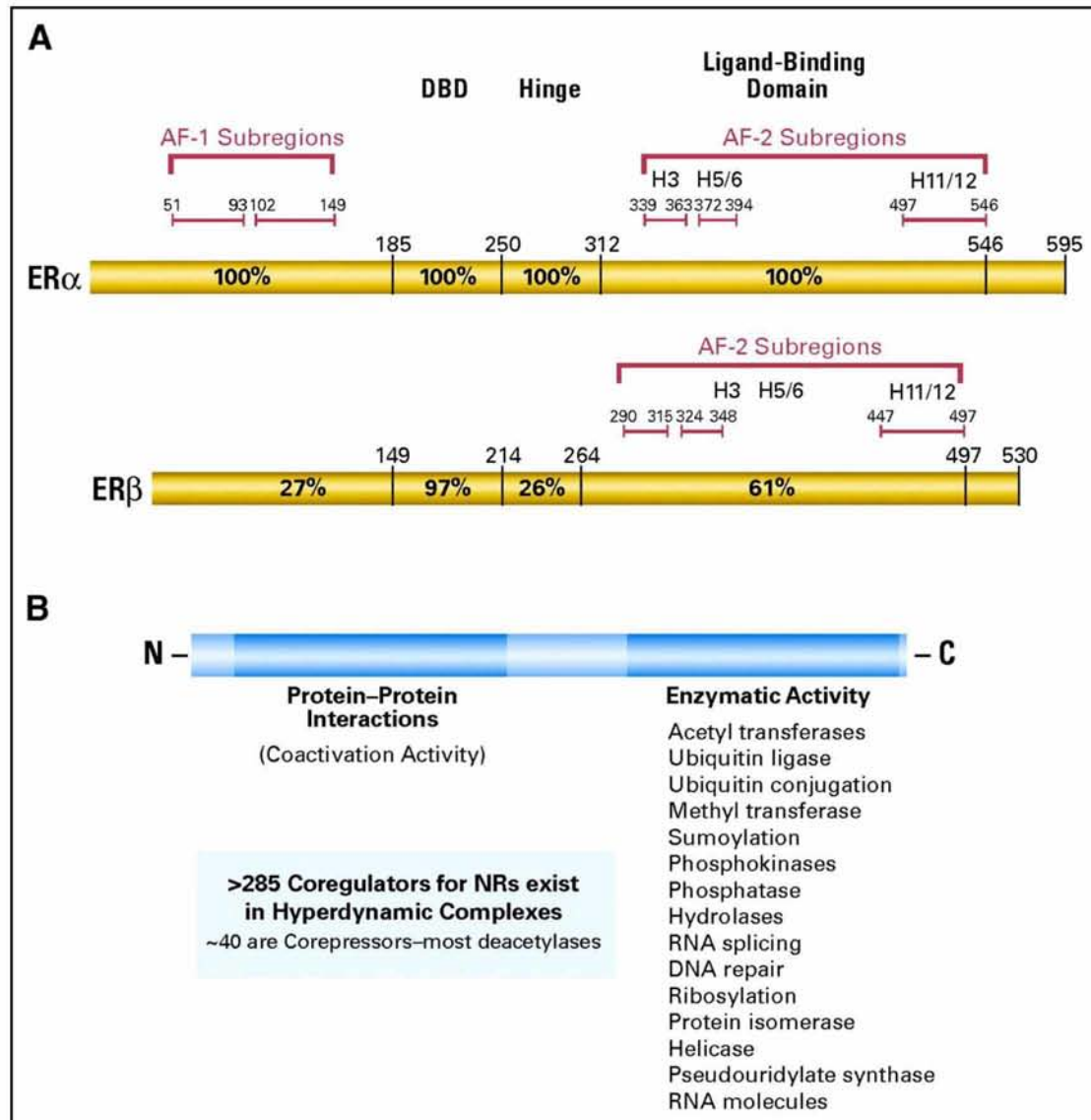
Ο κλασικός οιστρογονικός υποδοχέας (ERα) ανακαλύφθηκε από τον Elwood Jensen το 1958 και κλωνοποιήθηκε το 1986 από την μήτρα ποντικών και για πολλά χρόνια παρέμεινε ως δόγμα ότι υπήρχε μόνο ένας υποδοχέας. Υπήρχε η αντίληψη ότι η παρουσία του ERα ήταν απαραίτητη για την ύπαρξη ζωής, εφόσον δεν υπήρχε η ένδειξη ότι άνθρωπος ή ζώο, με αδρανοποιημένο ή απαλλειμένο υποδοχέα λόγω φυσικών μεταλλάξεων, ζούσε.

Το 1994 δημοσιεύθηκε από το Smith και τους συν. η περίπτωση ενός ασθενούς που είχε μη λειτουργικό ERα. Αυτός ο άνδρας είχε βαριά οστεοπόρωση και υπογονιμότητα. Έτσι αναιρέθηκε η άποψη ότι απαλοιφή του υποδοχέα ήταν ασυμβίβαστη με τη ζωή. Το 1996 πολλαπλά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο σχεδόν ταυτόχρονα ανέφεραν την ανακάλυψη ενός δεύτερου τύπου ER, τον ERβ. Ο hERβ εμφανίζει υψηλή ομολογία με τον hERα, ειδικότερα στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (95% αντιστοιχία αμινοξέων) και στην περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης (55% αντιστοιχία αμινοξέων).

Στην πραγματικότητα οι ER είναι τόσο όμοιοι μεταξύ τους όσο δύο υποδοχείς που έχουν διαφορετικό μόριο πρόσδεσης π.χ. ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και ο υποδοχέας της προγεστερόνης.



## ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ



Πηγή: *Journal of Clinical Oncology* (<http://jco.ascopubs.org/content/25/36/5815/F1.large.jpg>)

Πειράματα πρόσδεσης του μορίου της οιστραδιόλης έδειξαν υψηλή συνάφεια, ειδικότητα και χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης και των δυο ER (O'Lone και συν, 2007).

Οι δύο υποδοχείς ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων στόχων με παρόμοιο τρόπο αλλά σε μερικά κύτταρα ο βαθμός της ενεργοποίησης από τον ERβ είναι χαμηλότερος αυτού του ERα. In vitro μελέτες δείχνουν ότι οι δυο υποδοχείς μπορεί να έχουν ένα πλεονάζοντα ρόλο στην μετάδοση του ορμονικού σήματος, εντούτοις μελέτες ιστικού εντοπισμού αποκάλυψαν ότι υπάρχουν διακριτά πρότυπα έκφρασης για τον καθένα από τους υποδοχείς, δείχνοντας το αντίθετο (Otsuki και συν, 2003). Ο ERα είναι ο κυρίαρχος τύπος υποδοχέα στο μαστό, στη μήτρα στον τράχηλο, στον κόλπο, και σε άλλα όργανα στόχους, ενώ ο ERβ

εμφανίζει ένα πιο περιορισμένο πρότυπο έκφρασης και βρίσκεται κυρίως στις ωοθήκες, στον προστάτη, στους όρχεις στο σπλήνα, στους πνεύμονες, στον υποθάλαμο και στο θύμο. Έχουν βρεθεί διαφορές στην έκφραση των δυο ER ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου στην οποία βρίσκονται.

### 2.2.2 ERKO (ER knockout) ποντίκια

Περισσότερες αποδείξεις για τις βιολογικές δράσεις των ERs έχουν βρεθεί χάρη στη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών (transgenic mice) στα οποία ένας ή και οι δυο ER έχουν απαλειφεί (ERKO, ER knockout). Ένα άλλο ενδιαφέρον είδος ποντικών είναι αυτό στο οποίο έχει απαλειφεί η οιστραδιόλη με αδρανοποίηση του ένζυμου της αρωματάσης (cyp 19) που μετατρέπει την τεστοστερόνη σε οιστραδιόλη (Park και συν, 2011).

Τα αρωματάση knock out ποντίκια, ArKO, χαρακτηρίζονται από στείρα θηλυκά αλλά όχι στείρα αρσενικά (Pitrou και συν, 2009). Αυτό συμβαίνει λόγω μιας ατέλειας κατά την ωογένεση και συνοδεύεται από υποπλαστικά εξωτερικά γεννητικά όργανα, μήτρα και μαζικούς αδένες. Έλεγχος στα επίπεδα των ορμονών δείχνουν, όπως αναμενόταν, επίπεδα οιστραδιόλης μη ανιχνεύσιμα, ενώ τα επίπεδα της τεστοστερόνης είναι αξιοσημείωτα υψηλά. Τα ArKO ποντίκια χαρακτηρίζονται από μουντή γούνα και αυξημένη ποσότητα λίπους στους μαστούς και στις γονάδες.

Στους ανθρώπους έχουν δημοσιευθεί πέντε περιπτώσεις ατόμων, ανδρών και γυναικών, με έλλειψη αρωματάσης και κατά επέκταση ανεπάρκεια στη σύνθεση οιστρογόνων. Συμπεραίνουμε ότι η ύπαρξη ανθρώπων που εμφανίζουν ανεπαρκή οιστρογονική δράση λόγω είτε έλλειψης λειτουργικού ER είτε έλλειψης ορμόνης, παράλληλα με την επιτυχή παραγωγή των ERKO ποντικών, φαίνεται ότι τα οιστρογόνα δεν είναι απαραίτητα για την εμβρυονική και εμβρυϊκή (embryonic and fetal) ανάπτυξη των θηλαστικών. Όπως και με τα ERKO ποντίκια, υπάρχουν χαρακτηριστικοί φαινότυποι και στα δυο φύλα στους ανθρώπους με έλλειψη οιστραδιόλης ή ER (Razandi και συν, 2003).

Οι τρεις αναφορές για γυναίκες ομόζυγες για την μετάλλαξη, που αδρανοποιεί το P450arom γονίδιο, τις περιγράφουν ως ψευδοερμαφρόδιτες π.χ. ο γονότυπος 46XX έχει αναπαραγωγικές δομές θήλεος αλλά διαφορούμενα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται λόγω έλλειψης δραστηριότητας της αρωματάσης στο έμβρυο και στον πλακούντα κατά την κύηση, που οδηγεί στη συσσώρευση ανδρογόνων με αρρενοποιητικές επιδράσεις στο έμβρυο. Ένας παρόμοιος φαινότυπος έχει περιγραφεί σε βρέφος που είχε έλλειψη της πλακουντιακής αρωματάσης. Στις δυο περιπτώσεις με παντελή έλλειψη αρωματάσης η μητέρα εμφάνισε αρρενοποίηση κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης

ενώ ανιχνεύσιμα επίπεδα πλακουντιακής αρωματάσης ανέστειλαν αυτό το φαινόμενο, στην περίπτωση του (Ribas και συν, 2011). Στις τρεις περιπτώσεις η ανάπτυξη εσωτερικών δομών του αναπαραγωγικού συστήματος δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την έλλειψη οιστρογονικής δράσης, παρότι δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τον αντιρροπιστικό ρόλο των μητρικών οιστρογόνων. Τα επίπεδα στον ορό των ανδρογόνων, τον πρόδρομων των ανδρογόνων, της FSH και της LH ήταν υψηλά στους ασθενείς με έλλειψη της αρωματάσης νωρίς στη βρεφική ηλικία και συνέχιζαν να είναι υψηλά καθώς οι ασθενείς πλησίαζαν στην εφηβεία. Στην ηλικία των 12-14 χρόνων η δευτερογενής ανάπτυξη των μαστών, η εφηβική ανάπτυξη και η εμμηναρχή απουσίαζαν αλλά υπήρχαν αναφορές για αρρενοποίηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων. Και στις τρεις περιπτώσεις υπήρχε υπερδιέγερση της ωοθήκης με ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακικών κύστεων ακόμη από την ηλικία των δυο χρόνων. Η παθολογία των ωοθηκών έμοιαζε με αυτή των ERKOα ποντικών και ήταν συμβατή με τη διάγνωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Για αυτό το λόγο η δράση των οιστρογόνων στην ωοθήκη δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των πολυκυστικών ωοθηκών στους ανθρώπους. Η οιστρογονική και προγεστερονική θεραπεία υποκατάστασης «ανακουφίζουν» τους προαναφερθέντες φαινότυπους, έχοντας σαν αποτέλεσμα κανονικά επίπεδα γοναδοτροφινών και ανδρογόνων, υποστρόφι των ωοθηκικών κύστεων και σε δυο ασθενείς στην εφηβεία την ανάπτυξη των μαστών, ύψους και εμμηναρχής.

Τα κλινικά σύνδρομα που εμφανίζονται στις δυο περιπτώσεις αρρένων με ανεπάρκεια αρωματάσης και η μοναδική περίπτωση αδρανοποιητικής μετάλλαξης του ERα γονιδίου είναι εντυπωσιακά όμοιες. Οι τρεις αυτοί ασθενείς εμφανίζουν φυσιολογική έναρξη της εφηβείας και μη ειδικές διαταραχές του φύλου (no gender-identity disorders) καθώς και φυσιολογικά εξωτερικά γεννητικά όργανα και φυσιολογικό μέγεθος προστάτη. Ο ασθενής με έλλειψη λειτουργικού ERα παρουσιάζει όγκο όρχεων και πυκνότητα σπέρματος μέσα στα φυσιολογικά όρια για τους άνδρες αντίστοιχης ηλικίας. Φυσιολογικός όγκος όρχεων έχει αναφερθεί στον ασθενή με έλλειψη P450 αρωματάσης. Εντούτοις ο Dupont (2000) ανέφερε μικρούς όρχεις, σοβαρή ολιγοσπερμία και στειρότητα σε ένα άλλο ασθενή με έλλειψη P450 αρωματάσης, ενώ ο αδερφός αυτού του ασθενούς, με φυσιολογικό το γονίδιο της P450 αρωματάσης, είχε παρόμοια ευρήματα γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να ενέχονται οικογενείς παράγοντες σε αυτή την περίπτωση. Τα επίπεδα ορού των ανδρογόνων, FSH και LH ήταν σταθερά υψηλά στους άρρενες με έλλειψη P450 αρωματάσης όπως και τα επίπεδα οιστρονής και οιστραδιόλης στον άρρενα με έλλειψη ERα. Θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα είχε ως αποτέλεσμα την επάνοδο στα φυσιολογικά επίπεδα των ανδρογόνων και των γοναδοτροπινών στους άρρενες με έλλειψη P450. Η οιστρογονική θεραπεία

υποκατάστασης στο άρρενα με έλλειψη ERα είχε ως αποτέλεσμα τα κυκλοφορούμενα στεροειδή να πενταπλασιαστούν χωρίς να βελτιωθούν τα παθολογικά συμπτώματα του άρρενα όπως η ακράτεια και η γυναικομαστία. Στον ίδιο άρρενα, έχουν αναφερθεί, μεταβολές στο καρδιαγγειακό του σύστημα όπως δυσλειτουργίες στην αγγειοδιαστολή και πρόωρη στεφανιαία νόσο.

Ο περισσότερο εμφανής φαινότυπος στους ασθενείς με έλλειψη οιστρογονικής δράσης αφορά το σκελετικό σύστημα. Θηλυκά άτομα ομόζυγα στη μετάλλαξη του γονιδίου P450 εμφανίζουν καθυστέρηση στην οστική ηλικία με σημαντική μείωση στην οστική πυκνότητα της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης και με απώλεια ανάπτυξης στην εφηβεία. Οι δυο άρρενες με έλλειψη αρωματάσης και ο άρρενας με έλλειψη ERα μελετήθηκαν ως ενήλικες και αποδείχθηκε ότι εμφάνισαν εξαιρετικά όμοιους σκελετικούς φαινότυπους: μεγάλο ύψος (>95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση) με συνεχή μικρή γραμμική αύξηση, χαμηλό λόγο άνω/κάτω τμήματος του σώματος (<0.88 έναντι της τιμής 0.96 που αντιστοιχεί στο μέσο όρο των ανδρών), μη σύγκλιση επιφύσεων, οστική ηλικία 14-15 χρόνων και μειωμένη οστική πυκνότητα.

Μετά την οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης παρατηρήθηκε σύγκλιση επιφύσεων και αύξηση οστικής πυκνότητας στους ασθενείς. Στο φαινότυπο του άνδρα με έλλειψη του ERα η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων δεν μεταβάλλει την φυσιολογία των οστών. Όσον αφορά τα οιστρογόνα, υπήρχε μέχρι πρότινος η θεωρία, ότι είναι οι κύριες ορμόνες που επηρεάζουν τη φυσιολογία των οστών στις γυναίκες και τα ανδρογόνα έχουν τον αντίστοιχο ρόλο στους άνδρες. Τα φαινόμενα όμως που περιγράφηκαν παραπάνω υποδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα είναι εξίσου σημαντικά στους άνδρες και τις γυναίκες για την ανάπτυξη της εφηβείας, επιμετάλλωση των οστών και την ωρίμανση των επιφύσεων. Όλες οι επιστημονικές έρευνες ξεκινούν με σαφείς αντικειμενικούς σκοπούς:

Πρώτα υπάρχει η υπόθεση την οποία οι μελέτες αναλαμβάνουν να ανασκευάσουν και κατά δεύτερο λόγο υπάρχει ο στόχος να αποκτήσουν περισσότερες πληροφορίες πάνω στις οποίες μπορούν να σχεδιαστούν μελλοντικές και πιο ακριβείς υποθέσεις.

Οι μελέτες που εστιάζουν στις γενεές και χρησιμοποιούν μοντέλα ζώων που είναι σχεδιασμένα γενετικά έχουν τους ίδιους στόχους και κατηγοριοποιούνται σε φάσεις κατά την πρόοδο του μοντέλου. Αρχικές μελέτες στα knockout ποντίκια εστιάζουν στην αληθοφάνεια του μοντέλου βασισμένη σε προηγούμενες γνώσεις και αν η γενεά με έλλειψη του υπό μελέτη γονιδίου θα αποδειχθεί ή όχι θανατηφόρα.

Η επιτυχημένη παραγωγή των knockout ποντικών έχει σαν αποτέλεσμα την πραγματοποίηση μελετών που στόχο έχουν να ενισχύσουν την υπόθεση λειτουργίας του προϊόντος του διακεκομμένου γονιδίου. Καθώς οι μελέτες συνεχίζονται δεν παρατηρούνται

οι αναμενόμενοι φαινότυποι βασισμένοι σε προηγούμενα μοντέλα. Συχνά οι εντυπωσιακοί φαινότυποι οφείλονται σε απώλεια του προϊόντος του γονιδίου ενώ η έλλειψη των αναμενόμενων φαινοτύπων οφείλεται στην ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών που δρουν αντιρροπιστικά. Καθώς οι περιγραφικές μελέτες των knockout ποντικών συνεχίζονται η χρήση του μοντέλου αποκτά το ρόλο του μοναδικού ερευνητικού εργαλείου για τις ακόλουθες μελέτες: 1. σε αυτές που δεν ήταν μέχρι πρότινος δυνατές με τη χρήση του μοντέλου του άγριου τύπου (wild-type model) 2. σε μελέτες που στοχεύουν στην ανακάλυψη πρωτεϊνών ή μηχανισμών που προηγουμένως ήταν συγκαλυμμένες ή και 3. τα επακόλουθα αποτελέσματα της διακοπής του γονιδίου στη σχετιζόμενη φυσιολογία και τους βιοχημικούς μηχανισμούς.

Στον πίνακα 5, που ακολουθεί συνοψίζονται οι φαινότυποι των knockout ποντικών. Τα ERK0α ποντικά, εξαιτίας της μη ευαισθησίας στα οιστρογόνα, εμφανίζουν τους ακόλουθους ρόλους, που μέχρι πρότινος υπήρχε η αντίληψη ότι βασιζόταν στο ERα, και περιλαμβάνουν: 1. τις πολλαπλασιαστικές και διαφοροποιητικές δράσεις που είναι βασικές για το αναπαραγωγικό σύστημα του ενήλικου και το μαζικό αδένα, 2. σαν υποχρεωτικό συστατικό στο μηχανισμό μεταβίβασης του σήματος των αυξητικών παραγόντων στη μήτρα και στο μαζικό αδένα, 3. ως κύριο στεροειδές στην αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της γοναδοτροπίνης και των επιπέδων της LH στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση, 4. ως θετικός ρυθμιστής έκφρασης της προλακτίνης σε διάφορους ιστούς, 5. στη θετική ρύθμιση της σύνθεσης και έκκρισης της προλακτίνης από την υπόφυση, 6. παίζοντας ρόλο «υποκινητή» σε νεοπλασίες του μαστού επαγόμενες από ογκογονίδια και 7. σαν κρίσιμο συστατικό στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση συμπεριφορών σε αρσενικά και θηλυκά (Eddy και συν, 1996).

Η λίστα των μη αναμενόμενων φαινοτύπων στα ERK0α ξεκινάει με την παρατήρηση ότι η παραγωγή ζώου με έλλειψη λειτουργικού υποδοχέα ήταν επιτυχής και παρήγαγαν ζώα και των δυο φύλων που είχαν διάρκεια ζωής συγκρίσιμη με αυτή του άγριου τύπου (Evans και συν, 1997). Η επιτυχής παραγωγή των ERK0β ποντικών δείχνει ότι ούτε αυτός ο υποδοχέας είναι απαραίτητος για την επιβίωση και δεν αποτελεί πιθανότατα ένα αντιρροπιστικό παράγοντα στην επιβίωση των ERK0α. Η παραγωγή των διπλά knockout ποντικών δηλ. τα ERK0αβ επιβεβαιώνει τις προηγούμενες διαπιστώσεις. Τα ακριβή ελαττώματα σε συγκεκριμένα τμήματα του αναπαραγωγικού συστήματος, που περιλαμβάνουν την παραγωγή μη φυσιολογικού σπέρματος και την απώλεια της ικανότητας διείσδυσης και εκσπερμάτισης που παρατηρήθηκαν στα ERK0α ήταν εντυπωσιακά (Glass και συν, 1994, Glidewell-Kenney, 2007). Αντιθέτως ορισμένοι μηχανισμοί δράσης των οιστρογόνων εμφανιζόταν ακέραιοι ή ανεπηρέαστοι, όπως η ικανότητα της μήτρας να



εμφανίζει την επαγόμενη από προγεστερόνη φθαρτοειδή μετατροπή, καθώς και την πιθανή διατήρηση του συστήματος της αιχμής της LH (LH surge system) στον υποθάλαμο.

Επιπρόσθετα είναι εμφανές ότι αρκετοί φαινότυποι των ERKΟα μπορεί να ενισχύονται από την κατάντη εξασθένηση (downstream attenuation) της προγεστερόνης και τη δράση της προλακτίνης (PRL) ή και να ενισχύονται από αυξημένη ευαισθησία στα ανδρογόνα (Jakacka και συν, 2002). Αυτοί οι φαινότυποι περιλαμβάνουν αλλαγές που παρατηρούνται στον μαζικό αδένα, στις γονάδες, στα οστά και στη συμπεριφορά. Ακόμη η διακοπή του ERα γονιδίου αποκάλυψε συστήματα μετάδοσης του οιστρογονικού σήματος που δεν ήταν εύκολα ανιχνεύσιμα στον άγριο τύπο, όπως 1) οι φανερές δράσεις της 4-OH-οιστραδιόλης στη μήτρα των ERKΟα που είναι ανεξάρτητες από τους ERα και ERβ, 2) η ικανότητα των οιστρογόνων να επάγουν αυξημένα επίπεδα της υποθαλαμικής PR στα θηλυκά ERKΟα ποντίκια 3) επαγόμενη από την οιστραδιόλη ενδυνάμωση επιλεγμένων νευρώνων του ιππόκαμπου και 4) τις προστατευτικές δράσεις των οιστρογόνων στο καρωτιδικό αγγειακό μοντέλο βλάβης (carotid vascular injury model). Τελικά οι παράλληλες περιγραφές των ανθρώπινων μεταλλάξεων, με έλλειψη δράσης των οιστρογόνων και που οφείλονται είτε στην απώλεια των οιστρογόνων είτε στην έλλειψη λειτουργικού υποδοχέα, έχουν καταστήσει ERKΟ ποντίκια ως πρότυπο μοντέλου για την περαιτέρω κατανόηση της υπάρχουσας παθολογίας (Kudwa και συν, 2003).

Τα ποντίκια ERKΟ εκδηλώνουν φαινότυπους που καθρεπτίζουν την έκφραση καθενός υποδοχέα. Ο φαινότυπος των θηλυκών ERKΟα ποντικών περιλαμβάνει την μη απάντηση του αναπαραγωγικού συστήματος στην οιστραδιόλη (estrogen insensitivity), που οδηγεί στην υποπλασία του αναπαραγωγικού συστήματος, υπεργοναδοτροφικό υπεργοναδισμό, αποτυχία ανάπτυξης μαστών κατά την εφηβεία και περίσσεια λιπώδους ιστού. Τα αρσενικά ποντίκια ERKΟα εμφανίζουν κυρίως εκφύλιση των όρχεων και δυσλειτουργικά της επιδιδυμίδας. Αυτοί οι φαινότυποι συνδυάζονται με σοβαρά ελλείμματα στην σεξουαλική συμπεριφορά με αποτέλεσμα πλήρη στειρότητα και στα δυο φύλα των ERKΟα ποντικών (Cross 1999, Delbes 2005).

Αντίθετα τα ERKΟβ αρσενικά ποντίκια είναι γόνιμα και χωρίς ιδιαίτερο χαρακτηριστικό φαινότυπο, τα θηλυκά ERKΟβ ποντίκια έχουν ωθητική δυσλειτουργία και υπογονιμότητα (Couse 1999, O'Lone 2004).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα σύνθετα ERKΟαβ που παρουσιάζουν φαινότυπους που ομοιάζουν κυρίως στο φαινότυπο των ERKΟα ποντικών με εξαίρεση τις ωθήκες που χαρακτηρίζονται από προοδευτική απώλεια των σπερματικών κύτταρων που συνοδεύεται από επαναδιαφοροποίηση (redifferentiation) των σωματικών κυττάρων που τα περιβάλλουν. Αυτό δείχνει τον αναγκαίο ρόλο και των δυο ER σε αυτούς τους ιστούς.

Πίνακας 6. Σύνοψη των αναφερομένων φαινοτύπων για τα ERKΟα και ERKΟβ ποντίκια

ΜΟΝΤΕΛΟ ERKΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ
Θνησιμότητα της μετάλλαξης ERα	Όχι
ERβ	Όχι
Γονιμότητα α ERKΟ	Στειρότητα σε αρσενικά και θηλυκά
β ERKΟ	Τα θηλυκά είναι υπογόνιμα, τα αρσενικά είναι γόνιμα
Γενικά α ERKΟ	Το γονίδιο ERβ εκφράζεται φυσιολογικά
Θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα α ERKΟ	Το θηλ.αν.σύστημα έχει φυσιολογική προ- και νεογνική ανάπτυξη αλλά δεν είναι ευαίσθητο στη δράση της οιστραδιόλης κατά την ενήλικη ζωή. Παρουσία δράσης της 4-OH-οιστραδιόλης μέσω του ERβ. Ανταποκρίνεται στη μιτογόνο δράση των ανδρογόνων. Οι ωθήκες έχουν φυσιολογική προ- και νεογνική ανάπτυξη αλλά δεν είναι ικανές για ωορρηξία κατά την ενηλικίωση και εμφανίζουν πολλαπλές αιμορραγικές κύστες χωρίς ωχρά σωματίδια.
β ERKΟ	Το θηλ.αν.σύστημα έχει φυσιολογική προ και νεογνική ανάπτυξη και είναι ευαίσθητο στη δράση των οιστρογόνων κατά την ενηλικίωση. Οι ωθήκες δεν έχουν φυσιολογική συχνότητα ωορρηξιών και εκδηλώνουν ασθενή απόκριση σε πρόκληση ωορρηξίας.
Μαστός α ERKΟ	Φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά κατά την ενηλικίωση, λόγω μη ευαισθησίας στα οιστρογόνα, δεν εμφανίζει φυσιολογική ανάπτυξη. Ο μαστός καθίσταται ευαίσθητος, εξαιτίας του πρωτογονιδίου Wnt-1,στην υπερπλασία των πόρων και στο λοβώδες αδενοκαρκίνωμα.
β ERKΟ	Φυσιολογική εμβρυϊκή και εφηβική ανάπτυξη μαστού , που ομοιάζει με το μαστό της αντίστοιχης ηλικίας ποντικών άγριου τύπου. Υφίσταται φυσιολογική διαφοροποίηση κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία.
Αναπαραγωγικό σύστημα στα άρρενα α ERKΟ	Παρουσιάζει φυσιολογική προ και νεογνική ανάπτυξη. Λόγω ανεπαρκούς απορρόφησης του υγρού στα προσαγωγά αγγεία υπάρχει διάταση του ορχικού δικτύου, ατροφία του σπερματοφόρου επιθηλίου και μείωση της ποσότητας του σπέρματος, με την αύξηση της ηλικίας. Ανικανότητα προς γονιμοποίηση εξαιτίας βλάβης στη λειτουργία του σπέρματος.
β ERKΟ	Κανονική προ και νεογνική ανάπτυξη χωρίς εμφανείς ελλείψεις στη σπερματογένεση που να εμποδίζουν τη γονιμότητα

Νευροενδοκρινικό σύστημα  
στα θηλυκά  
α ERKO

Το πρόσθιο τμήμα της υπόφυσης περιέχει όλους τους αναμενόμενους τύπους κυττάρων αλλά έχει αυξημένο αριθμό μεταγραφημάτων των υπομοναδων των γοναδοτροφινών (α-υπομονάδα γοναδοτροφίνης, LH-β, FSH-β).

Αυξημένα επίπεδα, στον ορό, οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και LH ενώ τα επίπεδα της προγεστερόνης και της FSH είναι φυσιολογικά.

Παρατηρείται φυσιολογική διαφοροποίηση και αριθμός των λακτοτρόφων κυττάρων αλλά εμφανίζονται σημαντικές ελλείψεις στη μεταγραφή του γονιδίου της προλακτίνης και των επιπέδων της προλακτίνης στον ορό.

Οι ταχείες δράσεις της οιστραδιόλης στους νευρώνες του υπόκαμπτου διατηρούνται.

Φυσιολογικά επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό.

β ERKO  
Νευροενδοκρινικό σύστημα  
στα αρσενικά  
α ERKO

Η πρόσθια υπόφυση κατέχει όλα τα αναμενόμενα κύτταρα αλλά εμφανίζει αυξημένα επίπεδα μεταγραφημάτων LH-β.

Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης, τεστοστερόνης και LH αλλά φυσιολογικά επίπεδα προγεστερόνης και FSH.

Συμπεριφορά θηλυκών  
α ERKO

Εμφανίζουν έλλειψη, της επαγομένης από την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη, σεξουαλικής συμπεριφοράς, αυξημένη επιθετικότητα και γενοκτονία.

β ERKO

Δεν εμφανίζουν κανένα πρόβλημα σεξουαλικής συμπεριφοράς που να παρεμποδίζει τη γονιμότητα.

Συμπεριφορά αρσενικών

α ERKO

Εμφανίζουν φυσιολογική έλξη προς τα θηλυκά άγριου τύπου αλλά παντελή ικανότητα διείσδυσης και εκσπερμάτωσης καθώς και μειωμένη επιθετικότητα.

β ERKO

Δεν παρουσιάζουν κανένα πρόβλημα σεξουαλικής συμπεριφοράς που να επηρεάζει τη γονιμότητα.

Καρδιαγγειακό

α ERKO

Εμφανίζουν μειωμένη αγγειογένεση, επαγόμενη από την οιστραδιόλη, και μειωμένα επίπεδα ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου.

Εμφανίζουν απόκριση όμοια με του άγριου τύπου, στο μοντέλο βλάβης της καρωτίδας

Εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των καναλιών ασβεστίου του L-τύπου.

Εμφανίζουν μειωμένη απόκριση στην επαγόμενη από τα οιστρογόνα, αύξηση της απολιποπρωτεΐνης Ε.

Λοιπά

α ERKO

Αμφότερα τα φύλα παρουσιάζουν επιβράδυνση στην αύξηση των μακρών οστών

Μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη.

Δεν παρουσιάζουν εμφανές έλλειμμα στη Β λεμφοποίηση.

---

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Η 17β- οιστραδιόλη (E2) θεωρείται το κλειδί στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και λειτουργίας σε μια πλειάδα ιστών –στόχων, που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το ανδρικό και γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, το μαζικό αδέν, το σκελετικό σύστημα και το καρδιαγγειακό σύστημα. Οι κύριες βιολογικές δράσεις της οιστραδιόλης επιτυγχάνονται μέσω δυο ενδοπυρηνικών υποδοχέων, του ERα και ERβ, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια αλλά έχουν τη χαρακτηριστικές λειτουργικές δομές της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων.

Ακολούθως περιγράφονται οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των οιστρογόνων

1. Ο κλασσικός τρόπος δράσης μέσω του μορίου σύνδεσης (ligand- dependent)
2. Τρόπος δράσης ανεξάρτητος του μορίου σύνδεσης (ligand- independent)
3. Τρόπος δράσης ανεξάρτητος της πρόσδεσης στο DNA (DNA binding-independent)
4. Μετάδοση του σήματος μέσω της κυτταρικής επιφάνειας (cell surface-non genomic signaling)

#### 3.1 Ο κλασσικός τρόπος δράσης μέσω του μορίου σύνδεσης (ligand- dependent)

Ο τρόπος δράσης του ER μέσω του μορίου σύνδεσης είναι ο χαρακτηριστικός τρόπος δράσης της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων των στεροειδών/θυρεοειδικών ορμονών. Το προτεινόμενο μοντέλο υποδηλώνει ότι απουσία της ορμόνης, ο υποδοχέας βρίσκεται απομονωμένος μέσα σε ένα πολυπρωτεϊνικό ανασταλτικό σύμπλεγμα μέσα στον πυρήνα των κυττάρων στόχων. Η πρόσδεση της ορμόνης προκαλεί ενεργοποιητικές διαμορφώσεις στον υποδοχέα των οιστρογόνων και προσάγει τον διμερισμό και την πρόσδεση υψηλής συνάφειας σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Estrogen Responsive Elements –EREs) που είναι cis-acting ενισχυτές και βρίσκονται μέσα στις ρυθμιστικές περιοχές των κυττάρων στόχων. Οι υποδοχείς που είναι προσδεμένοι στο DNA επικοινωνούν με τη γενική μεταγραφική συσκευή είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω συνπαραγόντων (co-factors) πρωτεϊνών όπως SRC-1, GRIP1, AIB1, CBP/p300, TRAP220, PGC-1, p68 RNA ελικάση και SRA. Είναι γενικά αποδεκτό ότι δράσεις των συνεργοποιητών των οιστρογονικών υποδοχέων σταθεροποιούν το σχηματισμό του μεταγραφικού προεναρκτηριού συμπλέγματος και διευκολύνουν την απαιτούμενη διακοπή της χρωματίνης όπου βρίσκονται τα EREs. Ο υποδοχέας που είναι προσδεμένος στο DNA, ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τον προαγωγό που έχει αυτό, εμφανίζει είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου στόχου (Katzenellenbogen και συν, 2000).

Η μεταγραφική δράση (ligand- dependent) του ERα υποβοηθείται από δυο μη όξινες λειτουργικές μονάδες, την ενεργοποιητική λειτουργική μονάδα (activation function-1,AF-1)που βρίσκεται στην N τελική(A/B μονάδα)και μια ορμονοεξαρτώμενη μονάδα (activation function-2,AF-2),που βρίσκεται στην ligand- binding μονάδα.Η AF-2 μονάδα περιέχει μια γενετικά διατηρούμενη αμφιπαθική α-έλικα(H12)που είναι βασική για τη μεταγραφική λειτουργία και αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας των συνενεργοποιητών SRC. Η δράση της AF-1 μονάδας εξαρτάται από την στρατολόγηση των co-activators τόσο όμοιων όσο και διαφορετικών από αυτούς της AF-2.

Οι AF μονάδες δρουν συνεργιστικά στους περισσότερους (ligand- dependent) μηχανισμούς αλλά δρουν και ανεξάρτητα σε ορισμένα κύτταρα και προαγωγούς. Ενώ οι ενεργοποιητικές μονάδες του ERα είναι καλά καθορισμένες, οι ομόλογες περιοχές του ERβ δεν είναι διευκρινισμένο πως συμβάλλουν στη μεταγραφική δράση του υποδοχέα. In vitro μελέτες και μελέτες των ομόλογων αλληλουχιών έχουν δείξει ότι και ο ERβ περιέχει μια AF-2 μονάδα στην Cτελική περιοχή, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η AF-2 δρα ανεξάρτητα μέσα στον ERβ, συμπεραίνουμε ότι οι μονάδες AF-2 των δυο υποδοχέων έχουν διαφορετικούς ρόλους. Επιπρόσθετα ο υψηλός βαθμός απόκλισης στην αλληλουχία των αμινοξέων της N τελικής καθώς και η έλλειψη λειτουργικής AF-1 μονάδας στον ανθρώπινο ERβ(h ERβ)συνηγούν υπέρ της προαναφερθείσας άποψης.

Τα ERKO ποντίκια (ERknockout) ,τα αERKO και τα βERKO,που εμφανίζουν φαινότυπους που αντικατοπτρίζουν τη έκφραση του αντίστοιχου υποδοχέα έχουν συμβάλει στον καθορισμό του ligand- dependent μηχανισμό μέσω των ERE.

Το καλύτερο παράδειγμα του κλασσικού μηχανισμού επαγωγής γονιδίου, οιστραδιόλη- ER- ERE,είναι αυτό που παρατηρείται στα γονίδια που κωδικοποιούν τον προγεστερονικό υποδοχέα(PR),μέλος της οικογένειας των στεροειδικών υποδοχέων, και της λακτοφερρίνης, μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Ο εγγύς προαγωγός στο γονίδιο του PR πολλών ειδών έχει μια λειτουργική αλληλουχία ομοιάζουσα με ERE που είναι μπορεί να προσδεθεί στον ERκαι να παρέχει οιστρογονική απάντηση όταν συνδέεται σε διάφορες δομές (reporter constructs) .

Παρομοίως ο προαγωγός του γονιδίου λακτοφερρίνης του ποντικού έχει μια μοναδική παλίνδρομη αλληλουχία που βρίσκεται λιγότερο από 350 ζευγάρια βάσεων πάνω από το σημείο της έναρξης της μεταγραφής και που έχει την δυνατότητα να περεχει οιστρογονική απάντηση όταν συνδέεται με ποικίλες δομές. Πριν από αυτές τις μελέτες υπήρχαν πολυάριθμες αναφορές που παρουσίαζαν αύξηση στην έκφραση των γονιδίων του PR και της λακτοφερρίνης στην μήτρα μετά από έκθεση στην οιστραδιόλη.Ο πρωταρχικός ρόλος του ERα σε αυτόν το μηχανισμό φαίνεται από την πλήρη αλουσία επαγωγής από την

οιστραδιόλη των γονιδίων του PR και της λακτοφερρίνης στη μήτρα θηλυκών ERKOα ποντικών. Λόγω ότι η αύξηση στον PR,επαγόμενη από τα οιστρογόνα, εντοπίζεται στο στρώμα και στο μυομήτριο ενώ αύξηση της λακτοφερρίνης εντοπίζεται στο αυλικό(luminal)και στο αδενικό επιθήλιο, μπορούμε να πούμε ότι διακοπή του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την μη απάντηση στα οιστρογόνα (estrogen insensitivity) σε διάφορα τμήματα της μήτρας. Παρολ' αυτά, η διατήρηση σε σημαντικό επίπεδο του PR και της λακτοφερρίνης στα ERKOα ποντίκια υποδηλώνει την ύπαρξη ανεξάρτητων από τον ERα μηχανισμό και πιθανότατα μέσω του ERβ.

Δεδομένου του υψηλού βαθμού ομολογίας, στις δομές που συνδέονται με το DNA, των δυο ER δεν ήταν αρχικά ξεκάθαρο αν οERβ αντιπροσώπευε πλεονασμό στη μετάδοση του οιστρογονικού σήματος ή οERβ ήταν απαραίτητος εκφράζοντας μοναδική βιολογική δράση. Οι δυο ER είναι θετικοί ρυθμιστές των ERE δομών σε μελέτες που έχουν γίνει σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών και ο ERα έχει υψηλότερη ενεργοποίηση. Η διατήρηση του μηχανισμού δράσης της οιστραδιόλης μέσω του ERα στα ERKOα ποντίκια, όπως η επαγωγή της εκφράσεις του PR στον προοπτικό πυρήνα στο εγκέφαλο και χαρακτηριστικές ανδρικές συμπεριφορές, υποδηλώνουν τη δυνατότητα του ERβ να αντιρροπεί την απώλεια του ERα σε κάποιους μηχανισμούς.

Είναι ενδιαφέρον ότι σε *in vitro* μελέτες όπου συνέκφραζονται και οι δυο ER σχηματίζουν ως επί το πλείστον ετεροδιμερή, γεγονός που δείχνει ότι είναι δυνατόν να υπάρχει σύγκληση στους μηχανισμούς ERα/ERβ. Επιπρόσθετα ο ERβ έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά κατά ένα τρόπο π.χ. ανεξάρτητο του μορίου πρόσδεσης (ligand- independent) με τα ERE προαγωγών και επιτυγχάνει (attenuate) την ενεργοποίηση του μηχανισμού, μέσω ligand, της μεταγραφής του ERα. Για αυτό το λόγο έχει προταθεί ότι στα κύτταρα που εκφράζονται και οι δυο υποδοχείς η συνολική απάντηση στα οιστρογόνα καθορίζεται από την αναλογία ERα/ERβ.

Η πρόσφατη ανακάλυψη δυο ισομορφών ERβ, του ERβ $\alpha$  και του ERβ $\beta$ , που κατά προτίμηση ετεροδιμερίζονται και αναστέλλουν την δράση του ERα δείχνει ένα ρυθμιστικό ρόλο του ERβ. Μια πρόσφατη αναφορά από τον Gustafsson και τους συνεργάτες του, περιγράφουν μια ενισχυμένη απάντηση της οιστραδιόλης στη μήτρα των ERKOβ ποντικών και συνηγορούν υπέρ της του ρυθμιστικού ρόλου του ERβ στη μεταγραφική δράση του ERα.

### 3.2 Ενεργοποίηση του ER ανεξάρτητα από το μόριο πρόσδεσης: Επίδραση πεπτιδικών παραγόντων αύξησης (ligand independent activation of ER:Cross-talk with peptide growth factors)

Επιπρόσθετα στο μηχανισμό ενεργοποίησης μέσω της πρόσδεσης των οιστρογόνων υπάρχει ένας μηχανισμός που ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα απουσία οιστραδιόλης. Τα ευρήματα αυτά εστιάζονται στην ικανότητα των πολυπεπτιδικών παραγόντων αύξησης όπως ο επιδερμοειδής παράγοντας αύξησης (epidermal growth factor, EGF) και ο ινσουλινοειδής παράγοντας αύξησης-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) όπως και το ενδοκυττάριο επιδρών ανάλογο 8-βρωμο-μονοφωσφορική-κυκλική αδενοσίνη που ενεργοποιούν τον ER και αυξάνουν την έκφραση των κυττάρων στόχων του ER. Πολλά από αυτά τα ευρήματα επικυρώθηκαν από μελέτες *in vivo* όπως η ικανότητα του EGF να μιμείται την επίδραση της οιστραδιόλης στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που μετέχουν στην ενεργοποίηση του ER ανεξάρτητα από το μόριο πρόσδεσης έχουν χαρακτηριστεί, ο βιολογικός ρόλος των διαδικασιών δεν έχει διευκρινιστεί. Είναι δυνατόν ότι ορμονο-ανεξάρτητοι μηχανισμοί επιτρέπουν την ενεργοποίηση του ER παρουσία χαμηλών επιπέδων οιστραδιόλης όπως στους άνδρες. Εναλλακτικά το φαινόμενο αυτό μπορεί να λειτουργεί ως μηχανισμός μέσω του οποίου πολλαπλασιάζεται η δράση των αυξητικών παραγόντων και επομένως προάγει την μιτογένεση σε ιστούς που έχουν ER.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου συγκλίνουν οι δράσεις των ER και των αυξητικών παραγόντων δεν έχει διευκρινιστεί τελείως. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το κάθε «μονοπάτι» μπορεί να βασίζεται στο άλλο για την πλήρη έκφραση της αντίστοιχης απάντησης κάθε μορίου πρόσδεσης. Στη μήτρα ποντικών χορήγηση αντί-EGF αντισωμάτων προκάλεσε ενίσχυση της απάντησης της μήτρας στην οιστραδιόλη αντίστροφα χορήγηση του ανταγωνιστή του ER, ICI 164.384, μείωσε την απάντηση της μήτρας στον EGF. Αυτές οι μελέτες καθώς και παρόμοιες παρατηρήσεις στον μαστό οδήγησαν τους ερευνητές στο προτεινόμενο μοντέλο ότι η μιτογόνος δράση της οιστραδιόλης σε αυτούς τους ιστούς υποβοηθείται μερικά από τον EGF αντιστρόφως η μιτογόνος δράση του EGF απαιτεί την παρουσία του ERα.

Περισσότερες καθοριστικές ενδείξεις προέρχονται από μελέτες στη μήτρα ERKO α ποντικών, που παρότι εκφράζουν τον άγριο τύπο λειτουργικού EGF και του υποδοχέα του EGF και υπάρχει ένδειξη της μετάδοσης του σήματος μέσω του EGF, δεν απαντούν στη μιτογόνο δράση του EGF.

Συγκεκριμένες περιοχές του ER είναι καθοριστικές για την ανεξάρτητη δράση από τα οιστρογόνα. Ειδικότερα η επίδραση του αυξημένου ενδοκυττάριου cAMP επιτυγχάνεται



με μεσολάβηση της AF-2, ενώ η ενεργοποίηση του ER από τους αυξητικούς παράγοντες απαιτεί την N-τελική AF-1 περιοχή του υποδοχέα. Η πλειοψηφία των αποδείξεων δείχνει ότι η τροποποίηση της φωσφοριλιωμένης κατάστασης του ER από κυτταρικές κινάσες μπορεί να εξυπηρετεί το σημαντικό μηχανισμό της ενεργοποίησης χωρίς μόριο πρόσδεσης (ligand-independent activation). Η αλληλουχία της σερίνης 118 του ανθρώπινου ERα AF-1 φωσφοριλιώνεται μέσω μιτοενεργοποιούμενης πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen-activated protein kinase, MAPK) μετά από χορήγηση EGF ή IGF, έτσι ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή του ERα, την p68RNA ελικάση και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Ακόμη το «μονοπάτι» της MAPK ενισχύει την δράση του ERβ της φάλαινας μέσω διέγερσης για τη συλλογή της SRC-1 στη N-τελική μονάδα (Castoria και συν, 2001). Πρόσφατες ενδείξεις έχουν αναδείξει ότι οι συνενεργοποιητές μπορεί να δρουν ως σημεία διασταύρωσης μεταξύ των «μονοπατιών» του ER και του αυξητικού παράγοντα, καθώς φάνηκε ότι η φωσφοριλίωση από την MAPK των SRC-1 και AIB1, ως ένα φαινόμενο για να ενισχύσουν τις μεταγραφικές τους δραστηριότητες.

### **3.3 Γενομικές δράσεις του ER ανεξάρτητες από ERE (ERE-independent genomic actions of ER)**

Οι μέχρι στιγμής μηχανισμοί που αναφέρθηκαν δίνουν μια εξήγηση για τη ρύθμιση γονιδίων που έχουν μια λειτουργική αλληλουχία ομοιάζουσα με ERE(ERE-like) μέσα στον υποκινητή. Σε τρέχουσες μελέτες αναφέρεται μέσω του συμπλέγματος οιστραδιόλης-ER επαγωγή γονιδίων που δεν είχαν ERE-like αλληλουχία και βρέθηκε τελικά ότι ER που συνδέονται με αγωνιστές, μπορούν να ρυθμίσουν γονίδια σε απουσία άμεσης πρόσδεσης στο DNA. Αξιοσημείωτη είναι η ενεργοποίηση ERα από IGF-1 και η έκφραση της κολλαγενάσης υποβοηθείται μέσω αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με Fos και Jun στις AP-1 θέσεις πρόσδεσης, ενώ αρκετά γονίδια που περιέχουν αλληλουχίες υποκινητών πλούσιες σε GC ενεργοποιούνται μέσω του συμπλέγματος ERα-Sp1. Ο μοριακός μηχανισμός της δράσης του ER σε αυτές τις εναλλακτικές θέσεις αρχίζει να διαγράφεται πιο καθαρά. Μελέτες δείχνουν ότι ενεργοποίηση του συμπλέγματος οιστραδιόλης-ERα από τις AP-1 ορμονοανταποκρινόμενες αλληλουχίες του DNA (AP-1 responsive elements) απαιτούν και τις δυο περιοχές AF-1 και AF-2 του υποδοχέα, που προσδέονται και ενισχύουν την δραστηριότητα των συστατικών του p160 (SRC-1, GRIP1) του συνεργοποιητικού συμπλέγματος που στρατολογείται στη θέση από το Fos/Jun (Chambliss και συν, 2002).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο ανθρώπινος ERβ, στον οποίο απουσιάζει η λειτουργική AF-1, είναι ανίκανος να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των ρυθμιστικών γονιδίων

του AP-1 όταν συνδέεται με αγωνιστές του ER, δείχνοντας την πιθανότητα ξεχωριστών φυσιολογικών δράσεων των δυο ER μέσω ρυθμίσεων συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων. Παρότι η επίδειξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ER και AP-1 «μονοπατιών» in vivo είναι πιο δύσκολοι, τα ERKO μοντέλα θα είναι χρήσιμα εργαλεία στην εξερεύνηση της μετάδοσης του σήματος από τα οιστρογόνα.

### 3.4 Μη γενομικές δράσεις των οιστρογόνων

Τα παρατηρούμενα γρήγορα βιολογικά αποτελέσματα της οιστραδιόλης στα οστά, στο μαστό, στο αγγειακό και στο νευρικό σύστημα υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα εκδηλώνουν μη γενομικές δράσεις μέσω μορφών ER που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και που συνδέονται μέσω ενδοκυττάρων μεταβιβαστικών του σήματος πρωτεϊνών.

Είναι φανερό ότι ER και μηχανισμοί τυροσινικών κινασών της κυτταρικής μεμβράνης είναι αναπόσπαστα συνδεδεμένοι, καθώς έχει δείχθει ότι η οιστραδιόλη ενεργοποιεί το «μονοπάτι» των MAPK σε ποικίλα κύτταρα. Είναι σημαντικό ότι αυξάνει ο αριθμός των μελετών που αποδεικνύουν ότι κάποιες από τις προστατευτικές δράσεις των οιστρογόνων στα αγγεία μέσω του ERα επιτυγχάνονται μέσω μη γενομικών μηχανισμών, που περιλαμβάνουν μια διφασική ενεργοποίηση της ενθροθλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (NO) μέσω των μηχανισμών των MAPK και της φωσφατιδυλινοσιτολικής-3-κινάσης/ Akt. Στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες, η MAPK ενεργοποιείται ταχέως από την οιστραδιόλη, γεγονός που παίζει ρόλο στις παραγωγικές και αντιαποπτωτικές δράσεις της ορμόνης, δίνοντας έτσι ένα μηχανισμό μέσω του οποίου τα οιστρογόνα προστατεύουν τα οστά.

Είναι αμφιλεγόμενο αν ο θεωρούμενος μεμβρανικός ER είναι όμοιος μιας των δυο ενδοκυττάρων μορφών. Τα δεδομένα που συγκεντρώνονται για τις δομές των δυο γνωστών ER δείχνουν ότι κανένας τους δεν είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Παρόλ' αυτά οι Rasandí και οι συν. αναφέρουν ότι ανίχνευσαν μεμβρανικούς ERα και ERβ σε κύτταρα ωθήκης κινέζικου χάμστερ επιμολυσμένα με ένα φορέα έκφρασης του αντιστοίχου cDNA του υποδοχέα, δείχνοντας ότι οι μεμβρανικές και πυρηνικές μορφές κάθε ER προέρχονται από το ίδιο μεταγράφημα και έχουν ίδια συνάφεια με την οιστραδιόλη. Οι ίδιες μελέτες δείχνουν ότι οι μεμβρανικοί ER είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες και είναι δυνατόν να εκλύσουν ποικιλία αντιδράσεων μεταβίβασης του σήματος, περιλαμβανομένου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Σε αντίθεση με αυτά η διατήρηση των γρήγορων δράσεων της οιστραδιόλης σε on kainate –induced neuronal currents στον ιππόκαμπο ERKO α ποντικών ή άγριου τύπου

ποντίκια που τους χορηγήθηκε ICI 182.780 δείχνουν την ύπαρξη λειτουργικού μεμβρανικού ER διαφορετικού από τις ενδοκυττάρειες πυρηνικές μορφές. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι ενεργοποίηση της MAPK από μεταγραφικά ανενεργή στεροεισομερή 17-α οιστραδιόλη στον εγκεφαλικό φλοιό των ERKOα, μια δράση που δεν διακόπτεται από το ICI 182.780. Ακόμη αναφέρεται ανεξάρτητη της μεταγραφής μετάδοση του σήματος (transcription-independent estrogen signaling) σε μακροφάγα ποντικού που επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση μιας G μεμβρανικής πρωτεΐνης με τον ER.

Είναι σημαντικό να καθορίσουμε την ακριβή φύση της (των) πρωτεΐνης (νων) που συνδέονται με τα οιστρογόνα και συμμετέχουν σε τόσους μηχανισμούς έτσι ώστε να παράγουμε φάρμακα που να έχουν ως στόχο και τις μη γενομικές και τις πυρηνικές δράσεις των οιστρογόνων. Τα ERKO ποντίκια μας παρέχουν το κατάλληλο μοντέλο *in vivo* για τη μελέτη των πυρηνικών ER και για περαιτέρω διερεύνηση των στεροειδικών δράσεων που μπορεί να είναι ανεξάρτητες του υποδοχέα.

### **3.5 Ιστική εξειδίκευση στην ενεργοποίηση των ER εκλεκτικοί ρυθμιστές των ER (Tissue specific activation of ER selective estrogen modulators)**

Οι ενεργοποιημένοι ERα και ERβ συμμετέχουν σε διαφορετικούς κυτταρικούς δρόμους. Η ανακάλυψη συνθετικών αναλόγων που έχουν μεικτή δράση αγωνιστή /ανταγωνιστή του ER περιέπλεξε τον τρόπο που γίνεται η μεταβίβαση του σήματος από τους ER. Μείζονα πρόκληση για τις φαρμακοβιομηχανίες αποτελεί η ανάπτυξη μορίου πρόσδεσης στους ER που να διατηρούν τις ευεργετικές δράσεις των οιστρογόνων σε ιστούς στόχους π.χ. Οστά, εγκέφαλος, καρδιαγγειακό, χωρίς τις μιτογόνες και πιθανόν καρκινικές δράσεις στο μαστό και τη μήτρα. Η κλασική θεωρία του υποδοχέα ότι οι αγωνιστές λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες μετατρέποντας τον ER από μια ανενεργή σε μια ενεργή μορφή, ενώ τα αντιοιστρογόνα συναγωνιστικά αναστέλλουν την πρόσδεση αγωνιστών και «κλειδώνουν» τον υποδοχέα σε μια λανθάνουσα κατάσταση, δεν εξηγεί το μηχανισμό δράσης των SERM. Η πρώτη απόδειξη ότι οι δράσεις των συνθετικών μορίων πρόσδεσης εξαρτώνταν από τον ιστό-στόχο προήλθε από κλινικές μελέτες που οι ασθενείς ελάμβαναν ταμοξιφαίνη, σαν επιπρόσθετη θεραπεία για οιστογονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού, παρουσίαζαν θετικές δράσεις των οιστρογόνων στα οστά.

Εργαστηριακές ενδείξεις ότι τα αντιοιστρογόνα παίζουν ενεργό ρόλο στην τροποποίηση της δομής του ER, προήλθε από ανάλυση, μετά από πέψη προτεασών, του ανθρώπινου ERα. Έτσι φάνηκε ότι οι ανταγωνιστές επάγουν δομικές αλλαγές μέσα στον

υποδοχέα που διέφεραν από αυτές που προκαλούσε η οιστραδιόλη. Πρόσφατες μελέτες της κρυσταλλικής δομής των περιοχών πρόσδεσης μορίου των ERα και ERβ, όταν είχαν διαφορετικά μόρια πρόσδεσης πάνω τους, επιβεβαίωσε ότι οι αγωνιστές και ανταγωνιστές επάγουν διαφορετικές μεταβολές στη δομή του ER. Συνοψίζοντας, τα δεδομένα δείχνουν ότι τα αντιοιστρογόνα με διαφορετικό τρόπο τροποποιούν τη δομή του ER και για αυτό προκαλούν ξεχωριστές αλλαγές στη λειτουργία του υποδοχέα.

Τουλάχιστον τρεις τάξεις αντιοιστρογόνων έχουν αναγνωριστεί με βάση δομικά δεδομένα και βιολογικές δράσεις. Τα τύπου I αντιοιστρογόνα, που αντιπροσωπεύονται από το ICI 182.780, λειτουργούν αμιγώς ως ER ανταγωνιστές και αντιτίθενται στην δράση των οιστρογόνων και *in vivo* και *in vitro*. Τα τύπου II και III αντιοιστρογόνα, που αντιπροσωπεύονται από την-προερχόμενη από την βενζοθιοφαινόνη-ραλοξιφαίνη και την τριφαινυλαιθυλενική ταμοξιφαίνη, αντίστοιχα χαρακτηρίζονται ως SERMs. Αυτές οι ουσίες διαφέρουν από καθαρά αντιοιστρογόνα στο γεγονός ότι μιμούνται την δράση των οιστρογόνων σε συγκεκριμένους ιστούς και αντιτίθενται τη δράση των οιστρογόνων σε άλλους. Πολλές από αυτές τις ουσίες χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, όπως η ραλοξιφαίνη κατά της οστεοπόρωσης. Επιπρόσθετα οι αξιολογούμενες δράσεις ανταγωνιστή της ταμοξιφαίνης στο μαστό την καθιστούν πρώτης εκλογής φάρμακο για τη θεραπεία του προχωρημένου (στάδιο IV) καρκίνου του μαστού, προ-και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με θετικούς ER. Δυστυχώς στην οιστρογονική δράση της ταμοξιφαίνης οφείλεται η αυξητική της δράση στη μήτρα και ίσως συμβάλλει στο φαινόμενο ότι αρκετοί τύποι καρκίνου του μαστού αλλάζουν τη βιολογία τους και αναγνωρίζουν αυτή την ουσία σαν αγωνιστή για ανάπτυξη.

Σε πρόσφατες όμως παρατηρήσεις ότι ξενογραφήματα μαστού ανθεκτικά στην ταμοξιφαίνη δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίσταση με το GW5638 (που είναι παράγωγο της ταμοξιφαίνης) καταδεικνύουν τις ανεξερεύνητες δυνατότητες για την ανάπτυξη, ειδικών για συγκεκριμένο ιστό, SERM. Η δράση των SERMs οδήγησε τους ερευνητές σε επανέλεγχο της φαρμακολογίας των μορίων πρόσδεσης στους ER και ειδικότερα στο ρόλο των περιοχών AF στη δράση των ER μέσω του ERE μηχανισμού. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω αμιγείς αγωνιστές όπως η οιστραδιόλη δρουν σε όλα τα κύτταρα και με όλους τους υποκινητές ανεξάρτητα από ποια AF λειτουργία επικρατεί. Αντίθετα το αμιγές αντιοιστρογόνο ICI 182.780 αναστέλλει τελείως τη δράση και των δυο AF-1 και AF-2 και επομένως σταματά την ενεργοποίηση του κλασσικού μηχανισμού του ERα και ERβ. Η μεικτή δράση αγωνιστή /ανταγωνιστή των SERM, εξ'ορισμού, υπαγορεύεται από τα κύτταρα και τους υποκινητές, αντικατοπτρίζοντας το τύπο και διαθεσιμότητα συγκεκριμένων

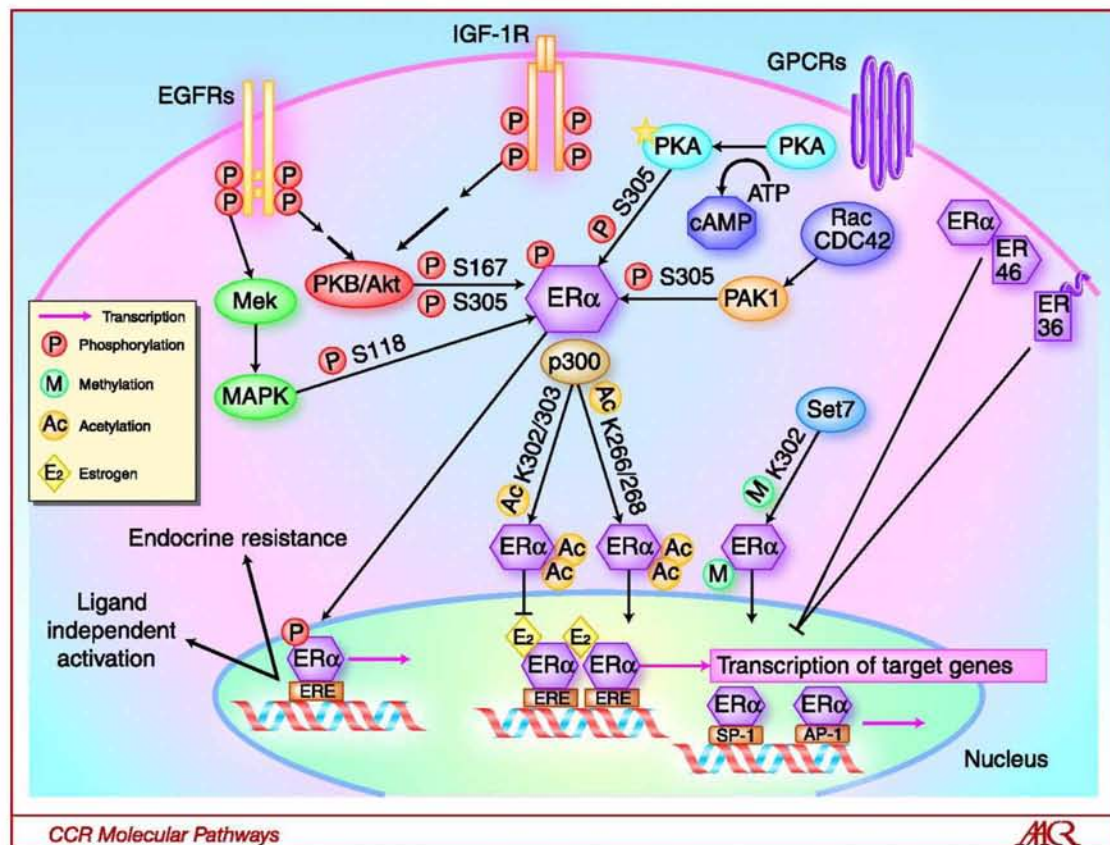
κυτταρικών παραγόντων. Αυτό φαίνεται στη ταμοξιφαίνη που αναστέλλει την δράση AF-2 και συνεπώς δρα σαν ανταγωνιστής σε περιβάλλον που απαιτείται η AF-2. Όμως σε περιπτώσεις που η AF-1 του ERα είναι ο κυρίαρχος ενεργοποιητής, η ταμοξιφαίνη έχει μερική αγωνιστική δράση. Για αυτό το λόγο, οι αγωνιστικές δράσεις της οιστραδιόλης και της ταμοξιφαίνης εκδηλώνονται μέσω διαφορετικών μηχανισμών που αντικατοπτρίζουν τη διαφορετική στρατολόγηση συνπαραγόντων AF-1 από την οιστραδιόλη και του συνδεδεμένου με την ταμοξιφαίνη ERα (differential cofactor recruitment by E2 and tamoxifen-liganded ERα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η ταυτόχρονη έκφραση συνενεργοποιητών ή συνκατασταλτών με τον ERα αλλάζει την αγωνιστική /ανταγωνιστική δράση της ταμοξιφαίνης. Για αυτό το λόγο θα μπορούσαμε να πούμε ότι αντίσταση στην ταμοξιφαίνη, θετικών στους ER, όγκων συμβαίνει σαν αποτέλεσμα της αλλαγής στα επίπεδα των κυτταρικών συνπαραγόντων. Αυτή η υπόθεση ερευνάται σε πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο.

Η ανακάλυψη ότι η ραλοξιφαίνη και το GW5638 δρουν ως οιστρογονικοί αγωνιστές στα οστά και στο καρδιαγγειακό σύστημα αλλά χωρίς να λειτουργούν μέσω AF-1 ή AF-2 αγωνιστές σε υποκινητές που περιέχουν ERE (as either AF-1 or AF-2 agonists on ERE-containing promoters) δείχνει ότι όλες οι βιολογικές δράσεις των SERMs δεν πραγματοποιούνται μέσω του κλασσικού ERα «μονοπατιού». Η αναγνώριση ότι ERβ εκφράζεται σε ολόκληρο το καρδιαγγειακό και το σκελετικό σύστημα είναι μια πιθανή εξήγηση για τις εκλεκτικές ιστικές αγωνιστικές δράσεις των SERMs. Παρότι αρχικές έρευνες έδειξαν ότι πολλά από τα γνωστά αντιοιστρογόνα δρουν ως ανταγωνιστές της μεταγραφικής δράσης του ERβ σε υποκινητές που περιέχουν ERE, in vitro έρευνες έδειξαν ότι οι SERMs δρουν ως εν δυνάμει ERβ αγωνιστές μέσω μη κλασσικών «μονοπατιών» σε AP-1 ανταποκρινόμενες αλληλουχίες. Μια τρέχουσα υπόθεση είναι ότι η δράση αυτή περιλαμβάνει τιτλοποίηση των κατασταλτικών πρωτεϊνών από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ERβ από το σύμπλεγμα Fos/Jun. Παρολ' αυτά μένει να διευκρινιστεί αν στις αγωνιστικές δράσεις των SERMs, που παρατηρούνται in vivo, συμμετέχουν δράσεις ERβ μέσω ανεξάρτητων των ERE «μονοπατιών».

Πρόσφατες αποδείξεις αναδύονται, που δείχνουν ότι οι βιολογικές δράσεις των SERMs μπορεί να επηρεάζονται από επικοινωνία μονοπατιών ERα και τυροσινικών κινασών. Παράδειγμα αποτελεί η παρατήρηση ότι οι αγωνιστικές δράσεις της ταμοξιφαίνης ενισχύονται όταν συγχորηγείται cAMP ή παράγοντες αύξησης, αυτό δείχνει ότι διασταύρωση μεταξύ ER και εξωτερικών σημάτων μπορεί να αυξήσει την αγωνιστική δράση των SERMs και πιθανόν να συμβάλλει στη έναρξη της ορμονικής αντίστασης σε όγκους στο μαστό. Η τελευταία

υπόθεση στηρίζεται στο εύρημα ότι η θεραπεία του καρκινικών κυττάρων του μαστού με αυξητικούς παράγοντες έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ER $\alpha$ , μέσω του μονοπατιού της φωσφατιδυλνινοσιτολικής-3-κινάσης / Akt, και την επακόλουθη αναστολή της απόπτωσης που προκαλεί η ταμοξιφαίνη. Απόδειξη ότι η ταμοξιφαίνη, όπως και τα οιστρογόνα, εκδηλώνουν γρήγορες δράσεις μέσω ενεργοποίησης μεμβρανικών μονοπατιών μετάδοσης του σήματος, δείχνοντας ότι οι ειδικές ιστικές αγωνιστικές δράσεις των SERMs επιτυγχάνονται μέσω μη γενομικών μηχανισμών. Γνωρίζοντας ότι η οιστραδιόλη έχει ταχεία αντιαποπτωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού θα σχεδιαστούν SERMs, μεμβρανικοί ειδικοί των ER $\alpha$  (membrane ER-specific SERMs) που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα. Οι γυναίκες με αυτό τον τρόπο που βρίσκονται σε θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης ή βρίσκονται σε θεραπεία με αντιοιστρογόνα θα διατηρούν τα ευεργετικά αποτελέσματα στα οστά και στο καρδιαγγειακό σύστημα.

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ  $\alpha$



Πηγή: Clinical Cancer Research (<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/16/10/2702/F2.large.jpg>)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ (ERs) ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

### 4.1 ERs και καρκίνος του μαστού

Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι όγκοι του μαστού, τουλάχιστον αρχικά, εξαρτώνται από τις διεγερτικές δράσεις των οιστρογόνων, άμεσα ή έμμεσα, και πιστεύεται ότι τα οιστρογόνα δρουν επάγοντας τη έκφραση παρακρινικών αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους. Αρκετοί όμως όγκοι του μαστού τελικά εξελίσσονται σε ένα οιστρογόνο –ανεξάρτητο φαινότυπο. Η ταμοξιφαίνη και παρόμοια αντιοιστρογόνα βρίσκονται στην πρώτη γραμμή θεραπείας στους ορμόνο-εξαρτώμενους όγκους.

Έχει περιγραφεί ότι πολλαπλά μεταγραφήματα των ERs βρίσκονται σε καρκίνους του μαστού καθώς και πρωτεϊνικά παράγωγα που ανταποκρίνονται σε διάφορους ERs. Splicing πρόδρομου RNA του ER $\alpha$  συχνά οδηγεί σε ποικίλα μεταγραφήματα, που έχουν έλλειψη ενός ή και περισσότερων εξονίων, που έχουν συσχετιστεί με εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Οι πιο συχνές απώλειες, σε αυτά τα μεταγραφήματα, είναι του εξονίου 4 και του εξονίου 7. Το εξόνιο 4 συγκροτεί την περιοχή του αρμού και το N τελικό τμήμα της περιοχής πρόσδεσης της ορμόνης. Το εξόνιο 7 περιέχει τμήμα της περιοχής πρόσδεσης του συνδέτη. Από τα δυο αυτά μεταγραφήματα μόνο η έλλειψη του εξονίου 7 έχει ανιχνευθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Σημειακές απώλειες εξονίων στον ER $\alpha$  βρίσκονται στην πλειοψηφία των φυσιολογικών ιστών του μαστού ενώ σε αυξημένη συχνότητα βρίσκονται σε όγκους. Φυσιολογικοί και καρκινικοί ιστοί επιδεικνύουν ποικιλία διακριτών μορφών (profiles) όσον αφορά τον άγριο τύπο του ER $\alpha$  (wild type, WT), ERs WT, ER $\alpha$  και ER $\beta$  splice variants τόσο στο επίπεδο του mRNA όσο και στο επίπεδο των πρωτεϊνών. Η ετερογένεια στους ισόμορφους ER έχει ως αποτέλεσμα την ποικιλία στη μετάδοση του οιστρογονικού σήματος και μπορεί να επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, την ορμονο-ανταπόκριση και την επιβίωση.

Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το ER $\beta$ 1(ER $\beta$  WT) μεταγράφημα έχει αρνητική ρύθμιση στην καρκινογένεση του μαστού, αλλά αυτό δεν φαίνεται να σταθερό σε όλους τους βαθμούς (grade) του καρκίνου. Ένα υψηλότερο επίπεδο του ER $\beta$ 2(ER $\beta$  CX) συγκρινόμενο με το επίπεδο του ER $\beta$ 1 μεταγραφήματος, έχει αναφερθεί σε σειρές ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων καθώς και σε όγκους του μαστού και σε φυσιολογικό ιστό του μαστού. Ο ER $\beta$  CX είναι μια παραλλαγή του ER $\beta$  WT του οποίου το τελευταίο εξόνιο «ματιάζεται» (is spliced) μακριά και αντικαθίσταται με το CX εξόνιο. Έχει φανεί ότι η μεθυλίωση του ER $\beta$  υποκινητή συσχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση του ER $\beta$  σε

καρκίνους του μαστού και σε κυτταρικές σειρές. Το γεγονός ότι η μεθυλίωση παρατηρείται συχνά στον καρκίνο δείχνει ότι ο ERβ είναι ένα πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Ο ERβ ανευρίσκεται στα σωληνώδη, λοβώδη, επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα του αδένου των θηλαστικών τρωκτικών. Ο ERα βρίσκεται μόνο στα σωληνώδη και λοβώδη επιθηλιακά κύτταρα και καθόλου στο στρώμα. Τα ERKOα ποντίκια εμφανίζουν σοβαρή καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μάζικου αδένου καθώς και υποτυπώδη ανάπτυξη αδένων στην εφηβεία. Μελέτες των ERKOβ ποντικών δείχνουν ότι ο ERβ δεν είναι απαραίτητος για τη σωληνώδη ανάπτυξη του αδένου αλλά φαίνεται να είναι σημαντικός για την οργάνωση και προσκόλληση των επιθηλιακών κυττάρων.

#### 4.2 ERs και καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η πιο συχνά διαγνωσμένη κακοήθεια και η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου στους άνδρες στις Η.Π.Α. Ο καρκίνος του προστάτη εξαρτάται από την ηλικία και η συχνότητα του αυξάνεται μετά την ηλικία των 40 χρόνων. Η αύξηση και η ανάπτυξη του προστάτη βρίσκεται κάτω από ενδοκρινικό έλεγχο και τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα παίζουν σημαντικούς ρόλους. Τα ανδρογόνα είναι σημαντικά για τη διέγερση της φυσιολογικής ανάπτυξης, την αύξηση και τις εκκρινικές δράσεις του προστάτη, ενώ τα οιστρογόνα θεωρούνται γενικά ότι αναστέλλουν την αύξηση. Συνδυασμένη χορήγηση ανδρογόνων και οιστρογόνων έχει φανεί ότι επάγει την προστατική δυσπλασία και αδενοκαρκίνωμα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι κακοήθεις εξαλλαγές στον προστατικό αδένου βασίζονται στα ανδρογονικές και οιστρογονικές δράσεις.

Τα οιστρογόνα έχει φανεί ότι επάγουν τη αύξηση των προστατικών καρκινικών κυττάρων (androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells, LNCaP), γεγονός που αντιστρέφεται από αντιοιστρογόνα. Η σειρά αυτή καρκινικών κυττάρων περιέχει ένα μεταλλαγμένο ανδρογονικό υποδοχέα (androgen receptor, AR), που έχει ως αποτέλεσμα την ανάμιξη στην πρόσδεση της ορμόνης και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, καθιστώντας τη διασαφήνιση των αποτελεσμάτων δύσκολη. Σε ένα περιβάλλον με χαμηλά ανδρογόνα, τα οιστρογόνα μέσω του ERα, προκαλούν καλοήγη υπερπλασία του προστάτη, δυσπλασία και καρκίνο.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιοιστρογόνα και ειδικοί τροποποιητές των ER (SERMs) μπορούν να καθυστερήσουν και να καταστείλουν την καρκινογένεση. Οι δυο τύποι των ER βρίσκονται στον κοιλιακό προστάτη αλλά εδράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Ο ERα βρίσκεται σε στρωματικά κύτταρα ενώ ο ERβ βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα όπου ο ERα απουσιάζει.



Οι οιστρογονικές δράσεις στον προστάτη, για τον προηγούμενο λόγο, ασκούνται μέσω και των δυο ER αλλά σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια εμφανίζουν ενδιαφέροντες φαινότυπους με υπερπλαστικούς προστάτες τόσο στα ERKO β όσο και στα αρωματάση knockout (ARKO) ποντίκια χωρίς όμως να εμφανίζονται στα ERKOα ποντίκια. Σε προστάτες ERKOβ ποντικών, τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το αντιγόνο πολλαπλασιασμού Ki-67 και οι ιστοί περιέχουν αρκετές υπερπλαστικές εστίες. Το προστατικό επιθήλιο των ποντικών άγριου τύπου δεν εμφανίζει υπερπλασία και μόνο λίγα ποντίκια εκδηλώνουν το αντιγόνο Ki-67.

Η υπερπλασία φαίνεται να προκαλείται ευθέως από την έλλειψη του ERβ και της αντί-πολλαπλασιαστικής του δράσης στον προστάτη. Η υπερπλασία των ARKO ποντικών μπορεί να οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και προλακτίνης, που είναι δευτερογενή αποτελέσματα της γενικής ελλείψεως της αρωματάσης, του ενζύμου που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα.

#### **4.3 ERs και καρδιαγγειακό σύστημα**

Οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο με την έναρξη της εμμηνόπαυσης, ένα φαινόμενο που οφείλεται στην απώλεια των ενδογενών οιστρογόνων. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες σε άτομα που λαμβάνουν ορμονική θεραπεία υποκατάστασης παρατηρείται μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Τα οιστρογόνα δρώντας στο καρδιαγγειακό σύστημα μέσω των ERs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου στις γυναίκες.

Τα οιστρογόνα έχουν ευνοϊκές δράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ, στο τόνο των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και στα επίπεδα του ινωδογόνου. Όταν τα οιστρογόνα χορηγούνται μόνα τους αυξάνουν το κίνδυνο για καρκίνο του ενδομητρίου, για αυτό το λόγο χορηγούνται σε συνδυασμό με προγεσταγόνα που έχουν αντι-υπερπλαστική δράση στη μήτρα. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το τμήμα, που χορηγούσαν οιστρογόνα σε συνδυασμό με προγεσταγόνα, της πρώτης προοπτικής μελέτης οιστρογόνων για την πρόληψη της στεφανιαίας νόσου τερματίστηκε πρόωρα λόγω μη αποδεκτού κινδύνου.

Στη μελέτη Women's health initiative (WHI) αναφέρεται ότι η χορήγηση οιστρογόνων σε συνδυασμό με προγεσταγόνα δεν συνεισφέρουν στην προστασία της καρδιάς και μπορεί ακόμα να αυξάνουν τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο στις υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, κυρίως στο πρώτο χρόνο θεραπείας. Επιπρόσθετα υπήρξε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου γενικά σε όλες τις υγιείς

μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες. Το τμήμα της μελέτης που χορηγούνται μόνο οιστρογόνα βρίσκεται σε εξέλιξη.

Τα αποτελέσματα των μελετών των ERKO ποντικών δείχνουν ότι ο ERα έχει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του αγγειακού τοιχώματος. Τα ERKO β ποντίκια εμφανίζουν φαινότυπους με ανωμαλίες στη λειτουργία των ιοντικών καναλιών και συσχετιζόμενη με την ηλικία διαστολική και συστολική αρτηριακή υπέρταση.

#### **4.4 ERs και οστεοπόρωση**

Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των οστών. Η έλλειψη οιστρογόνων που ξεκινά στην εμμηνόπαυση είναι ο κύριος παράγοντας παθογένειας στη δημιουργία της οστεοπόρωσης στις μετεμνηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι ERs εκφράζονται στους περισσότερους τύπους κυττάρων του οστού. Ένας άνδρας με μη λειτουργικό ERα γονίδιο παρουσίασε ανώμαλη μετά την εφηβεία επιμήκυνση των οστών. Τα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου ERα εμφανίζουν μικρές σκελετικές ανωμαλίες με μειωμένη επιμήκυνση και μικρή ελάττωση της οστικής πυκνότητας. Μελέτες στα θηλυκά ERKOβ ποντίκια δείχνουν ότι ο ERβ είναι υπεύθυνος για την καταστολή της αυξητικής δράσης των οιστρογόνων, που γίνεται μέσω του ERα.

#### **4.5 ERs και παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος**

Οι ERs ενέχονται σε μια ποικιλία ασθενειών του εγκεφάλου. Οι υποδοχείς εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπου διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους. Η διαφορετική κατανομή των υποδοχέων υποδηλώνει τις διαφορετικές δράσεις τους. Τα ERKO β ποντίκια εμφανίζουν ενδιαφέροντες φαινότυπους, έχοντας έλλειψη νευρώνων στο φλοιό, αποκαλύπτοντας το σημαντικό ρόλο του ERβ στην μετανάστευση των νευρώνων. Τα ERKO α ποντίκια δεν εμφανίζουν μορφολογικές ανωμαλίες στον εγκέφαλο. Τα οιστρογόνα έχει προταθεί ότι έχουν προστατευτικό ρόλο στους νευρώνες. Αποστέρηση οιστρογόνων, όπως συμβαίνει στην εμμηνόπαυση, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσου Alzheimer και Parkinson. Η οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για άνδρες και γυναίκες.

#### 4.6 ERs και ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικούς ρόλους στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ποντίκια που έχουν υποστεί ωοθηκεκτομή εμφανίζουν σπληνομεγαλία και αυξημένη παραγωγή αιμοποιητικών κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των πολυδύναμων στελεχειαίων κυττάρων του νωτιαίου μυελού επιτυγχάνεται, μέσω αρνητικής ρύθμισης, από τα οιστρογόνα. Τα ERKO β ποντίκια αναπτύσσουν εκσεσημασμένη σπληνομεγαλία στην ηλικία των 1.5 ετών, ένα φαινόμενο που εμφανίζεται σε βαρύτερη μορφή στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το φαινόμενο στο οποίο η απουσία του ERβ έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση μυελοπερπλαστικής νόσου που ομοιάζει την ανθρώπινη χρόνια μυελογενή λευχαιμία με λεμφοειδή βλαστική κρίση. Αυτά τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα υπαινίσσονται ένα ρόλο του ERβ στη ρύθμιση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων και καθιστούν τα ERKO β ποντίκια ως ένα εν δυνάμει πρότυπο για τη λεμφογενή και μυελογενή λευχαιμία.

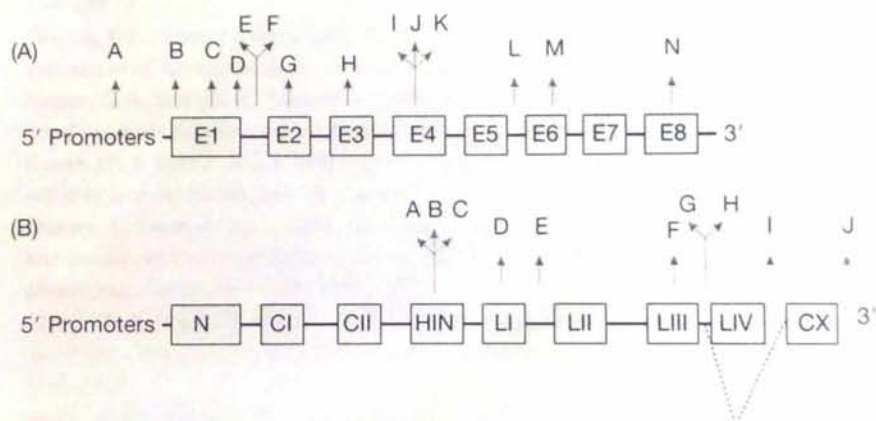
#### 4.7 Πολυμορφισμοί των ERs και μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθένειες

Ελάχιστες μελέτες έχουν δημοσιευθεί στις οποίες τα γονίδια του ERα και ERβ έχουν βρεθεί μεταλλάξεις που αλλάζουν την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες και επομένως τη λειτουργία του υποδοχέα.

Ποικιλία ισομορφών ERα, συμπεριλαμβανόμενων ισομορφών με έλλειψη τμήματος (deletion variants), έχουν βρεθεί σε όγκους του μαστού. Έχει δημοσιευθεί η περίπτωση ενός άρρενα με μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του ERα, που δημιουργεί ένα κωδικόνιο παύσης, καταλήγοντας σε περικομμένη πρωτεΐνη του ERα. Αυτός ο ασθενής έπασχε από οστεοπόρωση και στειρότητα. Σε ένα συστηματικό έλεγχο μεταλλάξεων του ERβ (in probands of different mass extremes), βρέθηκαν πέντε, διαφορετικές γενετικά, παραλλαγές. Σε ασθενείς με ποικιλία συνδρόμων υπογονιμότητας, όπως πολυκυστικών ωοθηκών, πρόωρης έκπτωσης των ωοθηκών και ενδομητρίωσης, στα οποία έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις στα εξόνια του ERβ, που όμως δεν προκαλούν καμία μεταβολή στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Οι μονήρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphism, SNPs) αποτελούν αλλαγές ενός ζευγαριού βάσεων που υπάρχουν φυσικά στον πληθυσμό. Συνήθως οι παραλλαγές που συμβαίνουν στη συχνότητα ενός αλληλίου όταν ξεπεράσουν το 1% αναφέρονται ως SNP's. Οι SNP's αποτελούν σημαντικά ερευνητικά εργαλεία στις ανθρώπινες γενετικές μελέτες. Ένα ζευγάρι πολυμορφισμών καταγράφεται σε περιστατικά

ασθενών και controls, εάν ανιχνευθεί κάποια συσχέτιση π.χ. ένα νουκλεοτίδιο εμφανίζεται πιο συχνά σε μια θέση στο γονίδιο ασθενών από ότι στο γονίδιο των controls, αυτό δείχνει ότι ο πολυμορφισμός ο ίδιος ή κάποιες αλλαγές στο ίδιο ή σε γειτονικά γονίδια, σχετίζονται με την ασθένεια. Ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών έχει βρεθεί στους Ers. Μια σύντομη επισκόπηση από τις πιο συχνές παραλλαγές του ERα και ERβ δίνεται στην εικόνα παρακάτω.



Πηγή: *Oestrogen Receptors* (Jan-Ake Gustafsson, 2004)

SNPs at the human ERα (A) and ERβ (B) gene loci

(A) E1-E8 exons 1-8; A, (TA)*n* repeats (17 alleles); B, codon 10 C/T (*Msp*I RFLP); C, codon 87 G/C (*Bst*UI RFLP); D, codon 100 C/G; E intron I A/G (*Xba*I RFLP); F, intron I C/T (*Pvu*II RFLP); G, codon 160 G/T; H, codon 243 C/T; I, codon 309 C/T; J, codon 311 G/A; K, codon 325 C/G; L, (CA)*n* repeats (9 alleles); M, codon 425 C/T; N, codon 594 A/G. (B) N, N-terminal exon, CI, first part (finger) of the DNA-binding domain; CII, second part (finger) of the DNA-binding domain; HIN, hinge exon; LI-LIV, ligand-binding domain exons; CX, CX exon; A, 661 A/G; B, 809 (del21); C, 846 G/A; D, 1082 G/A; E, (CA)*n* repeat; F, 1421 T/C; G, ERβ LIV – 68 C/T; H, ERβ LIV – 4 A/G; I, 1730 G/A; J, ERβ CX + 56 G/A. The ERβ LIV – 68 and – 4 polymorphisms are located 68 and 4 nucleotides 5' of exon LIV respectively, and the ERβ CX +56 is located 56 nucleotides 3' of exon CX.

Γενικά οι SNP's δεν αλλάζουν την αλληλουχία των αμινοξέων της απορρέουσας πρωτεΐνης και για αυτό το λόγο δεν είναι πιθανό να αλλάζουν τη λειτουργία του υποδοχέα, όμως μπορεί να αλλάζουν το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών του ER. Αρκετές μελέτες, σε ασθενείς και controls, ερευνούν την πιθανή συσχέτιση μεταξύ των SNP's, των ERα και ERβ, και των ασθενειών. Μια μελέτη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο απέτυχε να δείξει κάποια συσχέτιση με τις παραλλαγές B και C του ERα. Αντιφατικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί ανάμεσα στις παραλλαγές E και F του ERα και της οστικής πυκνότητας, πιθανότατα λόγω των διαφορετικών πληθυσμών. Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι η παραλλαγή

Β του ERα μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Έχει δημοσιευθεί μια μελέτη που συσχετίζει τους βουλιμικούς ασθενείς με τους SNP's του ERβ I και J, ενώ μια άλλη μελέτη δείχνει συσχέτιση μεταξύ του D του ERβ και της νευρικής ανορεξίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το γονίδιο του ERβ βρίσκεται σε γενετική σύνδεση με το γονίδιο της βουλιμίας.

Μια μελέτη Γερμανών επιστημόνων δεν απέδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της βουλιμίας και ενός πολυμορφισμού. Πολλές μελέτες ερευνούν τη πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό, του επαναλαμβανόμενου δινουκλεοτιδίου, που εδράζει στην πλευρική περιοχή (flanking region) του ERβ και ποικίλων κλινικών παραμέτρων. Υπάρχει μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ αυτού του πολυμορφισμού και της υπέρτασης στις γιαπωνέζες γυναίκες. Η επανάληψη του δινουκλεοτιδίου έχει προταθεί ότι συσχετίζεται με την οστική πυκνότητα καθώς και με τα επίπεδα ανδρογόνων ενώ δεν εμφανίζει συσχέτιση με αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς. Μελέτες συσχέτισης του ίδιου πολυμορφισμού του ERβ αποκάλυψαν σχέση με την υψηλή οστική πυκνότητα προεμμηνόπαυσιακών κινέζων γυναικών χωρίς να φανεί το ίδιο στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, υποδηλώνοντας ότι το ERβ γονίδιο έχει ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό των οστών στην αρχή της ενηλικίωσης. Έξι διαφορετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο του ERβ έχουν μελετηθεί σε σποραδικές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού χωρίς να βρεθεί διαφορά στην κατανομή των αλληλίων και των πολυμορφισμών ανάμεσα στους όγκους και στα controls Deroo και συν (2006).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΩΣ ΔΡΟΥΝ ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΣΑΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

### **5.1 Απευθείας επίδραση στο ενδοθήλιο των αγγείων**

#### **5.1.1. Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις των οιστρογόνων οδηγούν σε αύξηση της μετανάστευσης και των πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η δράση συμβάλλει στη επιτάχυνση της επιδιόρθωσης του ενδοθηλίου από τα οιστρογόνα. Η αγγειογένεση παίζει όμως σημαντικό ρόλο και στο σχηματισμό όγκων καθώς και στη μετανάστευση αυτών όπως στις μεταστάσεις ([Mueck AO](#) και συν 2004, Ushio-Fukai και συν 2006, Boosani και συν 2011).

#### **5.1.2. Μονοξείδιο του αζώτου**

Τα οιστρογόνα προάγουν τη σύνθεση και δραστικότητα του NO, που είναι ισχυρή αγγειοδιασταλτική και αντισκλυρυντική ουσία. Αυτό οφείλεται σε γενομική δράση. Παρόλ' αυτά η συνθάση του NO μπορεί να ενεργοποιηθεί εντός δέκα λεπτών από τα οιστρογόνα υποδεικνύοντας ένα μη γενομικό μηχανισμό. Η προγεστερόνη αυξάνει την παραγωγή του NO με γρήγορο μη γενομικό μηχανισμό (Tsutsumi και συν 2008).

#### **5.1.3. Προστακυκλίνη**

Αρκετές μελέτες in vitro και in vivo έδειξαν ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν τη σύνθεση της προστακυκλίνης που είναι ισχυρός αγγειοδιασταλτικός και αντισυσσωματικός παράγοντας. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η αναλογία προστακυκλίνης /θρομβοξάνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υποκατάστατος δείκτης της αγγειοδιασταλτικής επίδρασης των οιστρογόνων (Rey και συν 2010).

#### **5.1.4. Ενδοθηλίνη**

Η Ενδοθηλίνη είναι ισχυρός αγγειοσυσπαστικός παράγοντας και παρατηρείται αυξημένη στις καρδιαγγειακές ασθένειες. Σε πειράματα in vitro τα οιστρογόνα κατέστειλαν την παραγωγή ενδοθηλίνης και την επαγομένη από την αγγειοτενσίνη II ενδοθηλίνη (O'Lone και συν. 2007 Johns και συν. 1996)

### **5.1.5. Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (Plasminogen-Activator-Inhibitor-1, PAI-1)**

Ο PAI-1 είναι σημαντικό τμήμα του αιμοστατικού μηχανισμού. Μεγάλες συγκεντρώσεις του PAI-1 μετατοπίζουν την ινωδολυτική /πηκτική ισορροπία αυξάνοντας τον κίνδυνο για αρτηριακή θρόμβωση. Ο PAI-1 ανιχνεύθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στις αθηρωματικές πλάκες και μπορεί να επιταχύνει την αρτηριακή θρόμβωση μετά τη ρήξη της πλάκας. Η E2 μειώνει την ενδοθηλιακή παραγωγή (DeGoo και συν.2006, Shanle και συν. 2011)

### **5.1.6. Δείκτες φλεγμονής**

Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας των καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Τα από του στόματος οιστρογόνα αυξάνουν τα επίπεδα της CRP ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε στα διαδερμικά χορηγούμενα οιστρογόνα. Οι στατίνες μειώνουν την επαγομένη από τα οιστρογόνα αύξηση της CRP. Τα μόρια προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης. Αυτά τα μόρια αποτελούν διαμεσολαβητές των λευκοκυττάρων για την προσκόλληση, την κύλιση και την πρόσδεση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο καθώς εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων Murphy και συν.. Κλινικές μελέτες με από του στόματος και διαδερμικά οιστρογόνα αποκάλυψαν σημαντικές μείωση στα επίπεδα των μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνη, ICAM-1 και VCAM-1 (Iwakura και συν. 2006)

### **5.1.7. MCP-1 (Monocyte – Attracting Protein – 1)**

Οι χυμοκίνες όπως οι MCP-1 συντίθενται από το αγγειακά κύτταρα κατά τη φλεγμονή ώστε να προσελκύσουν μονοκύτταρα χρησιμοποιώντας τις χημειοτακτικές ιδιότητες. Η δράση αυτών των μορίων είναι καθοριστική στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρυνσης. Η σύνθεση του MCP-1 μπορεί να διεγερθεί από κυτοκίνες οι αθηρογόνες ουσίες όπως το μόριο της οξειδωμένης LDL. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις E2 αναπέμπουν την μετανάστευση των μονοκυττάρων που έχουν εκτεθεί σε MCP-1.

### **5.1.8. Μεταλλοπρωτεϊνάσες**

Η σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας είναι σημαντική στην πρόληψη οξέων αγγειακών συμβαμάτων Vu και συν. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix metalloproteinase, MMP) που παράγονται από τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποδομούν το κολλαγόνο. Οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί δείχνουν αύξηση στη σύνθεση της MMP-

1, MMP-2 και MMP-9 από τα οιστρογόνα αλλά ο ρόλος μένει να αποσαφηνισθεί. (Iwakura και συν. 2006).



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ER ΚΑΙ ΤΟΥ G PROTEIN COUPLED ER ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ –ΥΠΟΦΥΣΗ –ΟΡΧΕΙΣ**

Η λειτουργία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος βρίσκεται κάτω από την επίδραση τόσο των γοναδοτροπινών όσο και των ανδρογόνων μέσω αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού που περιλαμβάνει τον υποθάλαμο την υπόφυση και τις γονάδες (ΥΥΓ άξονα). Τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ΥΥΓ άξονα αλλά η συμβολή τους στην αναστολή των γοναδοτροπινών που ασκείται από οιστρογόνα που παράγονται στον υποθάλαμο/και στην υπόφυση και τα κυκλοφορούντα οιστρογόνα δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

Η διατήρηση της σπερματογένεσης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των γοναδοτροπινών και της τεστοστερόνης και η δράση τους τροποποιείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο τοπικά παραγόμενων παραγόντων συμπεριλαμβανομένης και της E2. Πέρα από τον κλασικό τρόπο δράσης των οιστρογόνων μέσω των ER, ασκούν και μια γρήγορη μη γενομική δράση μέσω της μεμβρανικής GPER (membrane-associated G protein coupled estrogen receptor) Η GPER στους όρχεις εκφράζεται τόσο σε σωματικά κύτταρα όσο και σε γεννητικά κύτταρα και διαμεσολαβεί την δράση των οιστρογόνων ρυθμίζοντας στη σπερματογένεση τον πολλαπλασιασμό και/η την απόπτωση. Η έκφραση της GPER βρέθηκε στον υποθάλαμο και την υπόφυση.

### **6.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ GnRH,LH ΚΑΙ FSH ΣΤΟΥΣ ΑΝΔΡΕΣ**

#### **6.1.1 Δράση των οιστρογόνων στον υποθάλαμο**

Οι υποθαλαμικοί GnRH νευρώνες που ελέγχουν την έκκριση της LH και FSH από την υπόφυση αποτελούν το κοινό καταληκτικό τμήμα από νευρωνικά και εξωγενή ερεθίσματα

. Σε άνδρες και γυναίκες οι γοναδικές στεροειδικές ορμόνες ασκούν αρνητική ανατροφοδότηση στον ΥΥΓ άξονα τόσο στο επίπεδο του υποθαλάμου όσο και της υπόφυσης. Στις γυναίκες ο μηχανισμός ανατροφοδότησης είναι πιο πολύπλοκος καθώς τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη ασκούν αρνητική και θετική ανατροφοδότηση που ευθύνεται για τη προωθηλακική αιχμή της GnRH και LH.

Στις τελευταίες μελέτες υπάρχει ασυμφωνία στον ρόλο των οιστρογονικών υποδοχέων και των ανδρογονικών υποδοχέων στους άνδρες. Η αρωματοποίηση της

τεστοστερόνης σε E2 και η αναγωγή σε 5α -διυδροτεστοστερόνη(ΔΗΤ) είναι υποχρεωτική στους φυσιολογικούς άνδρες και συμβαίνει σε περιφερικούς και κεντρικούς ιστούς. Ο (Harman και συν. 2001) έδειξαν ότι η χορήγηση αναστολέα της αρωματάσης στην τρίτη κοιλία του εγκεφάλου σε κριάρια είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη συχνότητα των αιχμών της LH χωρίς να επηρεάζει της συγκέντρωση της E2 στο πλάσμα. Επιπρόσθετα αυτός ο μηχανισμός ανατροφοδότησης εμφανίζεται σε διάφορα είδη μετά από ευνουχισμό. Αυξημένη έκκριση τη LH βρέθηκε σε κριάρια που είχαν εμβολιαστεί ενεργά ή παθητικά ώστε να παράγουν αντισώματα ενάντια στη E2.

Στους ανθρώπους η αρωματοποίηση των ανδρογόνων στον μηχανισμό ανατροφοδότησης των γοναδοτροπινών βρέθηκε κατά τη χρήση E2 ή τεστοστερόνης σε άνδρες με ιδιοπαθή υποθαλαμικό υπογοναδισμό. Στα ίδια άτομα δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκκριση LH, FSH όταν χορηγήθηκε ΔΗΤ. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η περιφερική μετατροπή της τεστοστερόνης σε ΔΗΤ διαδραματίζει μικρό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Έτσι η ανασταλτική δράση στην έκκριση των γοναδοτροπινών διαμεσολαβεί στα οιστρογόνα από την ενδογενή μετατροπή της τεστοστερόνης παρά από απευθείας δράση των ανδρογόνων στην υπόφυση. Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι η in situ αρωματοποίηση της τεστοστερόνης απαιτείται στον υποθάλαμο και την υπόφυση ώστε να εξασφαλιστεί ο πλήρης ανατροφοδοτικός μηχανισμός των γοναδοτροπινών.

Η E2 ασκεί την δράση της μέσω των δύο ER. Αρκετές μελέτες, σε διαφορετικά είδη ζώων και στα δυο φύλα, δείχνουν ότι οι νευρώνες GnRH δεν εκφράζουν τον ERα υποδοχέα και μόνο ένας μικρός αριθμός GnRH νευρώνων βρέθηκε σε θηλυκά ποντίκια. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα δρουν στους GnRH νευρώνες μέσω του ERβ. Όμως οι μελέτες σε ERα knock out ποντίκια δείχνει ότι στα αρσενικά ο κυρίαρχος υποδοχέας είναι ο ERα για δράση της E2 στην καταστολή της GnRH. Οι νευρώνες LHRH εκφράζουν μόνο τον ERβ, καθώς ο ανταγωνιστής ICI 182,780 κατέστειλε το αποτέλεσμα της E2 στις διακυμάνσεις του Ca<sup>++</sup>. Στα πρωτεύοντα θηλαστικά δρα μέσω διαφορετικού μηχανισμού γιατί ο ICI 182,780 απέτυχε να εμποδίσει της διακυμάνσεις του Ca<sup>++</sup> από την E2. Σε αυτό το μηχανισμό όπως έδειξε ο Noel και οι συν συμμετέχει ο GPER, χρησιμοποιώντας ειδικό αγωνιστή GPER πέτυχαν αλλαγές στο Ca<sup>++</sup> παρόμοιες με εκείνες μετά από χορήγηση E2.

### **6.1.2 Η δράση των οιστρογόνων στην υπόφυση**

Στα άρρενα σπονδυλωτά τα επίπεδα της LH FSH καθορίζονται από την GnRH και τις ακτιβίνες, ως διεγέρτες, και τα στεροειδή και τις ινχιπίνες σαν αναστολείς. Η δράση των

οιστρογόνων στη υπόφυση απαιτεί την παρουσία των ER των οποίων η έκφραση και κατανομή έχει μελετηθεί στη υπόφυση ποντικών και ανθρώπων. Επίσης η παρουσία του ανδρογονικού υποδοχέα είναι τεκμηριωμένη σε μελέτες σε ανθρώπους και ποντίκια.

Δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα αν η τεστοστερόνη στην υπόφυση ασκεί την δράση της μέσω του ανδρογονικού υποδοχέα ή έμμεσα μέσω αρωματοποίησης και ενεργοποίησης των ER. Η δράση της οιστραδιόλης στην υπόφυση συμβαίνει μέσω γενομικών μηχανισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει ανεξάρτητη από τον ERα μεταγραφική ενεργοποίηση των γοναδοτρόφων κυττάρων μέσω του υποδοχέα GnRH και του σηματοδοτικού μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης C και του MAPK. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι GPER συμμετέχει στη έκκριση της LH από τη GnRH σε καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης από προβατίνες που τις είχαν αφαιρέσει τις ωοθήκες. Μέχρι σήμερα πάντως δεν υπάρχουν μελέτες που να επιβεβαιώνουν την παρουσία GPER διαμεσολαβούμενων δράσεων στη υπόφυση αρσενικών θηλαστικών, αλλά καθώς ανιχνεύεται στη πρόσθια υπόφυση πιθανολογούμε ότι θα έχει κάποιο ρόλο στη δράση των οιστρογόνων.

### **6.1.3 Οιστρογόνα και άξονας ΥΥΓ, μελέτες σε μοντέλα ζώων**

Η δημιουργία knock out ποντικών με έλλειψη στον ER η/και στη αρωμάση οδήγησαν στην κατανόηση αρκετών δράσεων των στεροειδών. Μελέτες σε ERαknock out ποντίκια έδειξαν ότι στα αρσενικά ο ERα είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας που διαμεσολαβεί στη καταστολή των γοναδοτροπινών από τα οιστρογόνα. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ανδρογόνων από την τεστοστερόνη δεν είναι δευτερεύον όπως φάνηκε από την δυνατότητα της τεστοστερόνης(T) να καταστέλλει την LH στα ERknock out. Ενδιαφέρον είναι ότι η αρωματοποίηση της T είχε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στον ανατροφοδοτικό μηχανισμό υποθαλάμου υπόφυσης.

Άλλες μελέτες in vivo έδειξαν ότι τα οιστρογόνα παίζουν μεγάλο ρόλο στη σπερματογένεση. Τα υπογοναδικά (hypogonadal,hpg) ποντίκια που δεν παράγουν ώριμα δεκαπεπτίδια GnRH, λόγω απαλοιφής στο γονίδιο GnRH έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της σπερματογένεσης (Singh και συν. 2001). Τα hpg ποντίκια είναι υπογοναδικα γιατί δεν παράγουν γοναδοτροπίνες και έτσι δεν αναπτύσσονται οι όρχεις. Σε αυτά τα ποντίκια η θεραπεία με LH διέγειρε την σπερματογένεση και η συνδυασμένη θεραπεία με FSH και ανδρογόνα είχε σαν αποτέλεσμα φυσιολογική σπερματογένεση. Είναι ενδιαφέρον ότι η χρόνια χρήση E2 αποκατέστησε τη σπερματογένεση μέσω ενεργοποίησης ενός ασθενούς νευροενδοκρινικού μηχανισμού έκκριση στη FSH.

Αυτό το αποτέλεσμα έθεσε το ερώτημα σε ποιο σημείο δρουν τα οιστρογόνα στα υπογοναδικά ποντίκια. Έτσι περαιτέρω μελέτες έδειξαν σε υπογοναδικά ποντίκια, με εκλεκτικούς αγωνιστές για καθένα από τους ER, ότι η επαγόμενη από τη οιστραδιόλη σπερματογένεση γίνεται μέσω το ERα και σε αυτό οφείλεται η αύξηση της FSH και της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli στους όρχεις.

Τα ERαΚο ποντίκια είχαν μειωμένη γονιμότητα λόγω μειωμένης επαναρρόφησης στα απαγωγά σωληνάρια (Wersinger και συν. 2006). Στα ERβ Κο η σπερματογένεση, στεροειδογένεση και γονιμότητα ήταν ανεπηρεάστα. Σε αυτά τα ποντίκια βρέθηκαν εναλλακτικά μεταγραφήματα (splicing transcripts) που αντισταθμίζουν την έλλειψη του πλήρους υποδοχέα. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη στην οποία τα μεταλλαγμένα ERβ-/- ποντίκια στα οποία το εξόνιο 3 στον υποδοχέα ERβ αποκόπηκε εμποδίζοντας όλα τα μεταγραφήματα παράγοντας στείρα αρσενικά. Η αιτία φαίνεται είναι άγνωστη γιατί τα ποντίκια αυτά έχουν γεννητικά όργανα ακέραια και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι φυσιολογική. Στα ποντίκια με έλλειψη αρωματασης ArΚο η έλλειψη οιστρογόνων έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγή στην ορμονική ισορροπία προκαλώντας μείωση στα σπερματοκύτταρα.

Μια μελέτη με GPERΚο ποντίκια έδειξε ότι GPER δεν συμμετείχε στις οιστρογονικές απαντήσεις των γεννητικών οργάνων. Ένα μοντέλο ποντικού στο οποίο λείπουν αμινοξέα στη περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη στον ERα μέσω των ERE επέτρεψε των διαχωρισμό των μηχανισμών που διενεργούνται μέσω ERE. Έτσι η απώλεια του μη κλασσικού μηχανισμού ERα είναι υπεύθυνη για τα ελαττώματα στα γεννητικά όργανα στα άρρενα ERαΚο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΤΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Τα γοναδικά στεροειδή είναι σημαντικοί ρυθμιστές της φυσιολογίας. Οι ερευνητές προσεγγίζουν την φυσιολογία αυτή με το απλούστερο μοντέλο, τους άνδρες. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν το μεταβολισμό όπως την πρόσληψη της τροφής, το σωματικό βάρος, την ομοιόσταση της γλυκόζης /την αντίσταση στην ινσουλίνη, την κατανομή του λίπους, την λιπόλυση /λιπονεογένεση, την φλεγμονή, την κινητική δραστηριότητα, την κατανάλωση ενέργειας, την αναπαραγωγή και γνωσιακές λειτουργίες.

Οι δυο οιστρογονικοί υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία (Mendelsohn και συν. 1999). Υπάρχουν άνθρωποι με μεταλλάξεις ανδρικοποιητικές του ERα που εκφράζουν την πλήρη εικόνα του μεταβολικού συνδρόμου. Η μειωμένη δραστηριότητα του ERα σχετίζεται με παχυσαρκία σε άνδρες και γυναίκες. Τα ERαΚο ποντίκια που ήταν ομόζυγα στην έλλειψη του ERα εμφάνιζαν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, φλεγμονή, αντίσταση στην ινσουλίνη και παχυσαρκία. Ο Elmquist και συν (2006) παρατήρησαν ότι οι ρυθμιστές του μεταβολισμού έχουν υποδοχείς στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι περιοχές του εγκεφάλου όπως ο τοξοειδής πυρήνας, ο περικοιλιακός πυρήνας και το εγκεφαλικό στέλεχος τροποποιούν ή διαμεσολαβούν την ομοιόσταση της ενέργειας. Οι ER βρίσκονται στις ίδιες περιοχές. Τα ποντίκια με έλλειψη του ERα από το κεντρικό νευρικό σύστημα γινόντουσαν παχύσαρκα λόγω αυξημένης πρόσληψης τροφής και μειωμένης δραστηριότητας. Επιπρόσθετα είχαν αύξηση στα επίπεδα της E2.

Μελετήθηκαν τα ποντίκια με έλλειψη του ERα στο κοιλιακό μέσο πυρήνα: παρατηρήθηκε αύξηση του λίπους στα θηλυκά αλλά όχι στα αρσενικά ποντίκια. Τα θηλυκά είχαν σημαντική αύξηση στην εναπόθεση του σπλαγχνικού λίπους, το οποίο είναι περιγοναδικό λίπος. Αυτή ήταν πρώτη ένδειξη εναπόθεσης λίπους που οφείλεται σε έλλειψη ERα. Η ανάλυση του λιπώδους ιστού έδειξε ότι υπήρχε αυξημένο ποσοστό τριγλυκεριδίων καθώς και μια αύξησης έκφρασης των λιπογόνων γονιδίων. Δεν υπήρχε αλλαγή στην πρόσληψη τροφής αλλά υπήρχε ελάττωση στη δαπάνη ενέργειας. Περαιτέρω ανάλυση του λιπώδους ιστού έδειξε διήθηση λευκών λιποκυττάρων στο φαιό λίπος που σχετίστηκε με ελάττωση στην έκφραση των γονιδίων των μιτοχονδρίων. Αυτά τα ποντίκια είχαν βλάβη στη θερμογένεση.

Τα ευρήματα δείχνουν ότι δράση του ERα στον κεντρικό μέσο πυρήνα είναι ρυθμιστής της δαπάνης ενέργειας στα θηλυκά.

Οι νευρώνες τις προοπιομελανοκορτίνης (POMC) βρίσκονται μαζί με τους ERα. Οι νευρώνες POMC ρυθμίζουν την πρόσληψη της τροφής και τη ρύθμιση του σωματικού βάρους. Έτσι δημιουργήθηκαν ποντίκια που δεν είχαν ERα δίπλα από τους νευρώνες της

POMC και βρέθηκε ότι τα θηλυκά παρουσίαζαν αύξηση του σωματικού τους βάρους χωρίς να συμβαίνει το ίδιο και στα αρσενικά. Αυτό συνέβαινε λόγω αυξημένης πρόσληψης τροφής

Τέλος οι Hart-Unger Korach (2011) διαπίστωσαν ότι τα οιστρογόνα δρουν στους νευρώνες POMC και ρυθμίζουν τη πρόσληψη τροφής και το αρνητικό μηχανισμό ανατροφοδότησης FSH/LH, τη δαπάνη ενέργειας και την κατανομή του λίπους.

Ο Gosselin και συν (2011) μελέτησε τις διαφορές στην εξέλιξη των ασθενειών στα δυο φύλα, εστιάζοντας στην ευαισθησία των γυναικών στα αυτοάνοσα και στα φλεγμονώδη νοσήματα στις γυναίκες. Ο Glass και συν (2011) εστίασε στο ρόλο της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων όπου και οι δυο ER έχουν υψηλή έκφραση. Έδειξαν ότι ο ERβ συμμετέχει σε ένα διακατασταλτικό (transrepression) μονοπάτι φλεγμονής που ελέγχεται ενδογενώς από την ADIOL (5-androsten-3β,17β-diol). Η ADIOL έχει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Ο Glass έδειξε ένα ένζυμο η HSD17B14 που βρίσκεται στη μικρογλοία μετατρέπει τη δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA) σε ADIOL και η έκφραση της ελέγχεται από επαγωγείς και καταστολείς της φλεγμονής.

Σε ένα προ φλεγμονώδες περιβάλλον η μείωση της HSD17B14 της ADIOL μπορεί να εμποδίσει ένα αντιφλεγμονώδες μονοπάτι που διαμεσολαβείται από το ERβ. Η E2 δεν είχε αντ φλεγμονώδη δράση και επιπλέον μείωνε την ικανότητα της ADIOL. Αυτό εξηγεί γιατί στους άνδρες που έχουν χαμηλότερα επίπεδα η E2 μπορεί να σχηματιστεί η ADIOL και κατ' επέκταση να έχουν μικρότερη συχνότητα φλεγμονωδών νοσημάτων.

Άλλες μελέτες σε ποντίκια με μακροφάγα κύτταρα με έλλειψη του ERα ανέπτυξαν μη υγιή λιπώδη ιστό και αυξημένους δείκτες φλεγμονής. Αυτό σχετίστηκε με ινσουλινοαντίσταση και αύξηση των αθηροσκληρωτικών βλαβών.

Ο Tiano και συν (2011) παρατήρησαν ότι στα τρωκτικά η χορήγηση της E2 καταστέλλει την σύνθεση και συσσώρευση λιπαρών οξέων και τα προφύλαξε από παγκρεατική βλάβη. Επιπλέον αναπαρήγαγαν τα ίδια αποτελέσματα όταν διέγειραν φαρμακολογικά τον ERα.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει μια αβεβαιότητα για το το χρόνο που πρέπει να δοθεί ορμονική θεραπεία και υποκατάσταση στις γυναίκες. Στις συστάσεις της αμερικανικής εταιρείας των ενδοκρινολόγων η ορμονική θεραπεία για την εμμηνόπαυση μπορεί να χορηγηθεί σε διάφορες φάσεις της ζωής της γυναίκας και με διάφορους τρόπους. Τα οιστρογόνα έχουν αρκετά ευεργετικά μεταβολικά αποτελέσματα όπως προαναφέρθηκε και η καινούργια βιβλιογραφία εστιάζει στο πότε και με ποιο τρόπο τα οιστρογόνα τροποποιούν το μεταβολισμό. Θα πρέπει να βρούμε τρόπο να ανακουφίσουμε τα επιβλαβή αποτελέσματα των οιστρογόνων και να προάγουμε τα ευεργετικά τους αποτελέσματα.

## **B ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Υπάρχει η ένδειξη ότι η γενετική διακύμανση του ERα και του ERβ σχετίζεται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, πρώιμη ισχαιμική καρδιοπάθεια καθώς και δυσμενείς αγγειογραφικές αλλαγές. Εντούτοις υπάρχουν άλλες μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Τα οιστρογόνα μέσω των υποδοχέων τους τροποποιούν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο έμμεσα μέσω αλλαγών στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων και άμεσα διάμεσου της δράσης τους στο αγγεία και το ενδοθήλιο καθώς έχουν βρεθεί συγκεκριμένες περιοχές σύνδεσης στο ενδοθήλιο.

Υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στα επίπεδα των ορμονών σε διάφορες ομάδες ηλικιακά όμοιες. Ο Schuit και συν. (2005) βρήκε ότι αυτή η ποικιλομορφία να οφείλεται στη γενετική διαφορά στους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών. Οι δύο οιστρογονικοί υποδοχείς είναι λειτουργικά και δομικά ξεχωριστοί αλλά έχουν σημεία δράσης στα όποια αλληλοεπικαλύπτονται. Το πλαίσιο στο οποίο οι οιστρογονικοί υποδοχείς σχετίζονται με τα επίπεδα των στεροειδικών ορμονών δεν έχει καθοριστεί. Διαταραχές του σηματοδοτικού μηχανισμού των οιστρογόνων μπορεί να έχει επίδραση σε ενζυμικές δράσεις που μπορεί να επηρεάζουν το μεταβολισμό. Στους άνδρες η τεστοστερόνη είναι η κύρια πηγή της παραγόμενης οιστραδιόλης μέσω αρωματοποίησης στην περιφέρεια και η δράση της αρωματάσης είναι σημαντικός της ρυθμιστής της διαθεσιμότητας των οιστρογόνων και των ανδρογόνων. Συνεπώς η ρύθμιση της αρωματάσης μέσω του ERα όπως έδειξε ο Kinoshita και συν. (2003) θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός μηχανισμός. Από μια άλλη σκοπιά ο λιπώδης ιστός είναι το μέρος όπου γίνεται η αρωματοποίηση της τεστοστερόνης και τα επίπεδα της οιστραδιόλης σχετίζονται θετικά με το ποσοστό λίπους (Jiang και συν.2004)

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί του οιστρογονικού υποδοχέα ERα επηρεάζουν το ποσοστό λίπους (Okura 2003, Nilsson 2007, Tobias 2007). Μόνο ένας μικρός αριθμός μελετών ερεύνησε τη σχέση του γενετικού πολυμορφισμού και των επιπέδων των στεροειδών ορμονών στις γυναίκες (Westberg 2001, Schuit 2005, Sowers 2006). Τα δεδομένα για τους άνδρες περιορίζονται μόνο στο ERα (Schuit 2005). Επιπρόσθετα δεν υπάρχουν δεδομένα για το ρόλο του λίπους στη δράση των οιστρογονικών υποδοχέων στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών. Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς του ERα και ERβ με τα επίπεδα των λιπιδίων και την επίδραση της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης καθώς και την αντίσταση στην ινσουλίνη και την

επίπτωση του διαβήτη τύπου 2. Εντούτοις τα αποτελέσματα δεν ήταν σταθερά στις διάφορες εθνικότητες και ηλικίες και τέλος ήταν περισσότερο εμφανή στις γυναίκες από ότι στους άνδρες.

Το γονίδιο του ERβ δεν περιλαμβάνεται στις περισσότερες μελέτες και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα ενώ υπάρχει συσχέτιση με την εθνικότητα.

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση τεσσάρων πολυμορφισμών SNP (single nucleotide polymorphism) των ERα και ERβ στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών και τους σωματομετρικούς παράγοντες και τα επίπεδα των λιπιδίων στους άνδρες.

## 2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 2.1 Το δείγμα της μελέτης

Στη μελέτη περιλαμβάνονται 170 Καυκάσιοι Έλληνες άνδρες με ηλικία μεταξύ 22-59 ετών (μέση ηλικία  $\pm$  σταθερά απόκλισης,  $42 \pm 8.9$ ). Η επιλογή των ανδρών ήταν τυχαία από ένα μεγαλύτερο δείγμα του ενήλικου ανδρικού πληθυσμού της κεντρικής Ελλάδας, την Θεσσαλία (Κουκούλης και συν, 2010)

Το αρχικό δείγμα της μελέτης αποτελούνταν από ενήλικες ηλικίας 18-79 ετών που κατοικούσαν στη περιοχή της Θεσσαλίας για τουλάχιστον ένα χρόνο τη στιγμή διεξαγωγής της μελέτης. Συνοπτικά ο αρχικός πληθυσμός διαιρέθηκε στις γεωγραφικές περιοχές των τεσσάρων νομών της Θεσσαλίας και το δείγμα συλλέχθηκε από κάθε πόλη, κωμόπολη και χωρίο του νομού σύμφωνα με τα δεδομένα της στατιστικής υπηρεσίας της πληθυσμιακής απογραφής του 2001. Στις τέσσερις πρωτεύουσες των νομών επιλέχθηκαν τυχαία και διαστρωματοποιημένα οικοδομικά τετράγωνα. Η τυχαία επιλογή των νοικοκυριών διαιρέθηκε με τον αριθμό του δείγματος που εκτιμήθηκε σε καθένα από αυτά και το αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή του αριθμού των νοικοκυριών. Ένας ενήλικας επιλέχθηκε από κάθε νοικοκυριό.

Από κάθε συμμετέχοντα ζητήθηκε να προσέλθει στο περιφερικό ιατρείο στις 9.00 το πρωί της επόμενης μέρας και μετά από 12 ώρη νηστεία το βράδυ. Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν άτομα που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, καρδιοαγγειακή νόσο, ηπατική ή νεφρική νόσο, έλλειψη ανδρογόνων και όσοι ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή.

Όλοι οι συμμετέχοντες υπεβλήθησαν σε πλήρη κλινική εξέταση από γιατρό. Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στη καθιστική θέση, με τη χρήση υδραργυρικού σφυγμομανομέτρου, μετά από 20 λεπτά ηρεμίας στο δεξιά βραχίονα. Η μέση τιμή των



μετρήσεων αποτέλεσε την αρτηριακή πίεση του συμμετέχοντος που καταγράφηκε. Ανθρωπομετρικές παράμετροι όπως το ύψος το βάρος και η περιφέρεια μέσης καταγράφηκαν σε όλους του συμμετέχοντες. Η περιφέρεια της μέσης μετρήθηκε με μια πλαστική, μη εκτατή μετροταινία ραπτικής στο επίπεδο της μεσότητας της απόστασης ανάμεσα στο κατώτερο πλευρικό χείλος και την λαγόνια ακρολοφία με προσέγγιση στο πλησιέστερο εκατοστόμετρο καθώς και το ύψος με φορητό αναστημόμετρο. Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε από τον τύπο Quetelet  $BMI=W/H^2$  όπου W είναι το σωματικό βάρος εκφρασμένο σε κιλά (Kgr) και H είναι το ύψος σε μέτρα (μ) (Garrow and Webster, 1985)

Το ποσοστό σωματικού λίπους υπολογίστηκε με τη βοήθεια μετρητή βιοηλεκτρικής εμπέδησης, χρησιμοποιώντας τον αναλυτή του εμπορίου (Omron HBF 302 Body Fat Analyser, Omron Healthcare Inc., Vernon Hills, IL, USA) με τον ασθενή σε όρθια θέση. Καθένας από τους συμμετέχοντες συμπλήρωσε ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με την κατάσταση της υγείας του και τις συνήθειες του (λήψη αλκοόλ και κάπνισμα) υπό την επίβλεψη γιατρού. Στο τέλος της εξέτασης διενεργήθηκε αιμοληψία για τον προσδιορισμό της γλυκόζης πλάσματος, ινσουλίνης, SHBG, τα λιπίδια και τις ορμόνες του φύλου. Ο όρος παρέμεινε κατεψυγμένος στους  $-70^{\circ}\text{C}$  μέχρι το χρόνο διενέργειας των μετρήσεων. Η LDL χοληστερόλη υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedwald (χωρίς να υπάρχουν τιμές που ξεπερνούσαν τα 400mg/dl). Το μοντέλο εκτίμησης ομοιόστασης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του με τον μαθηματικό τύπο ινσουλίνη νηστείας X γλυκόζη νηστείας /22.5X18(Mathews και συν.1985).

Όλα τα άτομα της μελέτης έδωσαν γραπτώς τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή στην έρευνα και το πρωτόκολλο της έρευνας ανασκοπήθηκε και εγκρίθηκε από την επιστημονική επιτροπή Δεοντολογίας και Έρευνας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

## 2.2 Βιοχημικές εξετάσεις

Όλες οι εξετάσεις διενεργήθηκαν με μεθόδους διαθέσιμες στο εμπόριο. Η ολική τεστοστερόνη και οιστραδιόλη μετρήθηκε με την ραδιοανοσολογική τεχνική στερεάς φάσης (coat-a-count). Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0,08 και 0.6, ενώ ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των μετρήσεων ήταν 8% και 4% αντίστοιχα. Τα επίπεδα της SHBG και ινσουλίνης μετρήθηκαν με τη χρήση IRMA (Radim Spa και Immunoteck Beckman Counter Company, PW, αντίστοιχα) ενώ ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των μετρήσεων ήταν 5% και 3.4% αντίστοιχα. Η ελεύθερη τεστοστερόνη ορού, η ελεύθερη οιστραδιόλη, η βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη και η βιοδιαθέσιμη οιστραδιόλη υπολογίστηκαν με βάση τις

συγκεντρώσεις της ολικής τεστοστερόνης του ορού, της SHBG και της λευκοματίνης χρησιμοποιώντας έγκυρους μαθηματικούς τύπους που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες μελέτες (Södergård et al., 1982; Vermeulen et al., 1999; Van den Beld et al., 2000; Van Uytvanghe et al., 2005).

Η ολική χοληστερόλη, η HDL χοληστερόλη, η LDL (εξίσωση Friedwald), τα τριγλυκερίδια και η γλυκόζη ορού προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια αυτόματου αναλυτή (Olympus 600, Medicon).

### 2.3 Μοριακή ανάλυση των οιστρογονικών υποδοχέων

Όλα τα άτομα της μελέτης μελετήθηκαν για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του ER $\alpha$  και του ER $\beta$ .

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ DNA

Το γενομικό DNA απομονώθηκε, από το περιφερικό αίμα, χρησιμοποιώντας το QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA).

### 2.4 Γονίδιο ER $\alpha$

Για το γονίδιο ER $\alpha$ , το πολλαπλασιαζόμενο κομμάτι DNA είχε μήκος 1.3kb, (περιείχε το ιντρονίο 1 και τμήμα του εξονίου 2) και χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών (primers):

(5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3' και  
5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGGGTCGATTATCTGA-3')

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης που περιείχε 250 ng DNA, 10  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος 10x (10x PCR Buffer, minus Mg) της εταιρίας Invitrogen, USA, 2  $\mu$ l τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (μίγμα 40 mM), 4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 1  $\mu$ l από καθένα από τους primers A και B, 2,5 μονάδες DNA Ταq πολυμεράση και αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 $\mu$ l. PCR έγινε σε συσκευή DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems 9700) 40 κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελούταν από 1' (λεπτό) αποδιάταξης στους 94°C, 1' υβριδοποίησης στους 63°C, και 1' επιμήκυνσης στους 72°C. Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72°C για 10'. Τα προϊόντα της PCR διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Στο πολ/νο DNA έγινε πέψη με Pvu II ή XbaI (New England Biolabs, Inc.) στους 37°C για 3 ώρες και στη συνέχεια ηλεκτοφορήθηκε σε γέλη αгарόζης 1.5 % με βρωμιούχο αιθίδιο. Η πέψη με Pvu II αποκάλυψε τους ακόλουθους γονότυπους

PP(1.3kb),Pp(1.3kb,850bp,450bp) και pp(850bp,450bp). Η πέψη με XbaI είχε σαν αποτέλεσμα τους ακόλουθους γονότυπους XX(1.3kb),Xx(1,3kb,910bp,390bp) και xx(910,390bp).Οι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού τμήματος DNA (the restriction fragment length polymorphisms(RLFPs) παρουσιάζονται με το γράμμα P και p(Pvu II),και X και x(Xba I). Τα κεφαλαία και μικρά γράμματα συμβολίζουν την απουσία και παρουσία αντίστοιχα των περιοριστικών σημείων.

## 2.5 Γονίδιο ERβ

Η περιοχή του γονιδίου ERβ που πολλαπλασιάστηκε, περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης με την οιστραδιόλη του εξονίου 5 και την 3' μη μεταφρασμένη περιοχή του εξονίου 8 και χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές (primers): Α, 5'-TCTTGCTTTCCCCAGGCTTT-3'; Β, 5'-ACCTGTCCAGAACAAGATCT-3'; Γ, 5'-TTTTTGTCCCATAGTAACA-3'; και Δ, 5'-AATGAGGGACCACAGCA-3'

Η PCR πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης που περιείχε 250 ng DNA, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (10x PCR Buffer, minus Mg) της εταιρίας Invitrogen, USA, 1 μl τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (μίγμα 40 mM), 1 μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 1 μl από καθένα από τους primers Α και Β, 1,5 μονάδα DNA Ταq πολυμεράση και αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 μl. Η PCR έγινε σε συσκευή DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems 9700\_) για 40 κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελούταν από 1' (λεπτό) αποδιατάξης στους 94°C, 1' υβριδοποίησης στους 53°C (για τους εκκινητές Α και Β) και στους 43°C (για τους εκκινητές Γ και Δ), και 1' επιμήκυνσης στους 72°C. Η τελική επιμήκυνση έγινε στους 72°C για 10'. Ο πολ/σμος των εξονίων 5 και 8 έδωσε τα επιθυμούμενα προϊόντα DNA 156bp και 307bp, αντίστοιχα. Η αλλαγή του νουκλεοτιδίου G-A στο νουκλεοτίδιο 1082 στο εξόνιο 5, δημιούργησε μια πολυμορφική θέση για την ενδονουκλεάση Rsa I (New England Biolabs, Inc, USA.). Η αλλαγή στο νουκλεοτίδιο 1730, στο εξόνιο 8, δημιούργησε μια πολυμορφική θέση για την ενδονουκλεάση AluI (New England Biolabs, Inc, USA.) Η παρουσία G (γουανίνης) στο νουκλεοτίδιο 1730 θεωρείται αλληλουχία «άγριου τύπου» γιατί αποτελεί την κυρίαρχη αλληλουχία στο μελετηθέντα πληθυσμό.

Έγινε επώαση στους 37°C για 12 ώρες και στη συνέχεια ηλεκτοφορήθηκε σε γέλη αгарόζης 2.0 % με βρωμιούχο αιθίδιο. Η πέψη με Rsa I αποκάλυψε τους ακόλουθους γονότυπους :RR(156bp),Rr(156bp,125bp,31bp) και rr(125bp,31bp). Η πέψη με Alu I είχε σαν αποτέλεσμα τους ακόλουθους γονότυπους Aa(307bp),Aa(307bp,240bp,67bp) και aa (240bp,67bp). Οι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού τμήματος DNA (RLFPs)

παρουσιάζονται με το γράμμα R και r (Rsa I), και A και a (Alu I). Τα κεφαλαία και μικρά γράμματα συμβολίζουν την απουσία και παρουσία αντίστοιχα των περιοριστικών σημείων.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή± σταθερά απόκλιση ή ως διάμεση (διατεταρτημοριακό εύρος, interquartile range, IQR) στις περιπτώσεις ασύμμετρης κατανομής. Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται σαν συχνότητες και/η ποσοστά. Η ισορροπία Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε καθώς και το  $\chi^2$  test για καθένα από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν. Το  $\chi^2$  test χρησιμοποιήθηκε για το έλεγχο της ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) ανάμεσα στους δυο πολυμορφισμούς των δυο οιστρογονικών υποδοχέων.

Οι διαφορές στις συνεχείς μεταβλητές μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων μελετήθηκαν με δοκιμασία ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA). Στην περίπτωση σημαντικών διαφορών ανάμεσα στους γονότυπους σε ένα συγκεκριμένο πολυμορφισμό χρησιμοποιήθηκε η διαφορά ελάχιστης σημασίας test (least significance difference test) για post hoc ανάλυση (πολλαπλών συγκρίσεων).

Η ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμηση (multivariate linear regression) χρησιμοποιήθηκε για να εκτίμησει την δυνατότητα ανεξαρτησίας στη δράση των διαφόρων γονοτύπων. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν τα επίπεδα των λιπιδίων και HOMA-IR σε όλους τους γονότυπους (τρεις ομάδες, για τον Rsa I μόνο 2 ομάδες σχηματίστηκαν :Rr και rr μελετήθηκαν σαν μια ομάδα λόγω του μικρού αριθμού των ανδρών που έφεραν το γονότυπο rr (n=2) προσαρμόστηκαν για την ηλικία, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, την περιφέρεια μέσης, %λίπους και το HOMA-IR (για τη μελέτη των λιπιδίων). Η συνέργια ανάμεσα στους δυο πολυμορφισμούς του ERα και του ERβ επίσης μελετήθηκε καθώς και η συνέργια και των τεσσάρων γονοτύπων μεταξύ τους. Μόνο γονοτυπικές ομάδες που αποτελούνταν από πέντε ή περισσότερα άτομα περιλήφθησαν στη μελέτη. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $p < 0.05$ . Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ανθρωπομετρικά δεδομένα των συμμετεχόντων στην έρευνα φαίνονται στον Πίνακα 1. Η μέση τιμή ήταν  $42.3 \pm 8.9$  έτη, ενώ η μέση τιμή του δείκτη μάζας σώματος είναι  $27.9 \pm 3.9$ .

Η κατανομή της συχνότητας των γονοτύπων *PvuII*, *XbaI*, *RsaI* και *AluI* φαίνεται στον Πίνακα 2 . Η κατανομή των γονοτύπων βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Η συχνότητα των γονοτύπων σύμφωνα με τους δυο σημειακούς πολυμορφισμούς μελετήθηκε στο καθένα από τα γονίδια του οιστρογονικού υποδοχέα, παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Ανιχνεύθηκαν οκτώ γονότυποι για το πολυμορφισμό *Pvu II* και *XbaI* του *ERα* και 6 γονότυποι του *RsaI* και *AluI* του *ERβ*. Οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου του *ERα* βρέθηκαν σε ανισορροπία σύνδεσης γεγονός που είναι σε συμφωνία με μελέτες σε άλλους πληθυσμούς (Efstathiadou και συν, 2001).

Καμία σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε ανάμεσα στην ηλικία και το BMI στους γονότυπους καθενός από τους πολυμορφισμούς (Πίνακες 10 και 11).

#### ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ηλικία (χρόνια)	42.3±8.9
Βάρος (kg)	86.2±13.0
Ύψος (cm)	175.8±7.0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.9±3.9
Περίμετρος μέσης WC (cm)	97.8±10.7
% ποσοστό λίπους	22.8±5.6
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	120.2±12
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	77.1±8.7
Ολική χοληστερόλη (mmol/L)	6.1 ± 1.3
Τριγλυκερίδια (mmol/L)	1.5(1.0-2.0)
HDL-χοληστερόλη (mmol/L)	1.4 ± 1.1
LDL-χοληστερόλη (mmol/L)	4.0 ± 1.1
Γλυκόζη νηστείας (mmol/L)	5.0±0.7
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	50.9(30.1-82.5)
HOMA-IR	1.6(0.9-2.5)

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ±(σταθερά απόκλιση)SD, εκτός από τις τιμές αυτές με ασύμμετρη κατανομή που εκφράζονται σαν μέση (διατεταρτημοριακό εύρος, IQR)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ER $\alpha$  ΚΑΙ ER $\beta$**

	<i>ER<math>\alpha</math></i> πολυμορφισμοί		<i>ER<math>\beta</math></i> πολυμορφισμοί	
	<i>XbaI</i>	<i>PvuII</i>	<i>RsaI</i>	<i>AluI</i>
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1	27 (15.9)	25 (14.7)	154 (90.6)	89 (52.4)
2	95 (55.9)	94 (55.3)	14 (8.2)	67 (39.4)
3	48 (28.2)	51 (30)	2 (1.2)	14 (8.2)

1 σημαίνει την έλλειψη της περιοριστικής θέσης στα δυο αλληλία (πχ. XX, PP, RR και AA αντίστοιχα), 2 αντιπροσωπεύει τους ετεροζυγώτες και 3 τους ομοζυγώτες που φέρουν την περιοριστική θέση και στα δυο αλληλία

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΔΥΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ ΓΙΑ ΚΑΘΕΝΑ ΑΠΟ ΤΑ ΔΥΟ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ER**

	<i>ER<math>\alpha</math></i> πολυμορφισμοί			<i>ER<math>\beta</math></i> πολυμορφισμοί			
	<i>XX</i>	<i>Xx</i>	<i>xx</i>	<i>RR</i>	<i>Rr</i>	<i>rr</i>	
<i>PP</i>	21	3	1	<i>AA</i>	77	11	1
<i>Pp</i>	6	79	9	<i>Aa</i>	63	3	1
<i>pp</i>	0	13	38	<i>aa</i>	14	0	0
$\chi^2=172.33, p=2.22 \cdot 10^{-16}$				$\chi^2=4.75, p=0.3$			

*XbaI* και *PvuII* πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ERα**

	<i>Pvu II</i>			<i>Xba I</i>		
	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
<b>Ηλικία (χρόνια)</b>	41.6±8.7	42.2±8.7	43±9.4	40.1±8.9	42.2±8.8	43.5±9.1
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.2±4.5	27.7±3.7	28.5±3.9	27.2±4.2	27.6±3.8	28.9±3.8
<b>WC (cm)</b>	98.7±2.2	97.1±11	98.9±9.4	98.9±11.8	96.8±11	99.3±9.2
<b>% ποσοστό λίπους</b>	21.2 ±6.7 <sup>a</sup>	22.4 ±5.2	24.6 ±5.3	21.0 ±7.0	22.8 ±5.3	23.8 ± 5.3
<b>SHBG (nmol/l)</b>	21.5 (17.7-30.2)	22.8 (19.4-27.0)	22.5 (17.1-30.7)	22.4 (17.8-34.1)	22.9 (19.3-28.4)	21.3 (16.7-25.9)
<b>E2 (pg/ml)</b>	57.7 (44.0-70.5)	48.8 (42.9-60.1)	58.5 (42.1-73.4) <sup>b</sup>	49.7 (43-66)	48.9 (43.7-61.9)	59.3 (41.8-73.8)
<b>FE2 (pmol/l)</b>	5.2 (3.5-5.9)	4.2 (3.6-5.2)	4.9 (3.6-5.9)	4.3 (3.5-5.6)	4.2 (3.6-5.2)	5.0 (3.5-6.2)
<b>Testo (ng/dl)</b>	602 (392-752)	589 (499-707)	553 (409-738)	625 (427-769)	591 (493-712)	553 (424-677)
<b>FTesto (ng/dl)</b>	13.8 (8.7-17.6)	13.8 (11.5-17.3)	13.3 (11.5-14.4)	13.8 (9.8-17.3)	13.8 (11.5-17.3)	13.3 (10.1-17.3)
<b>Δείκτης ανδρογόνων</b>	0.9 (0.7-1.1)	0.8 (0.7-1.1)	0.8 (0.6-1.1)	0.8 (0.7-1.1)	0.8 (0.7-1.1)	0.9 (0.7-1.2)

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± σταθερά απόκλισηSD, εκτός από τις τιμές με ασύμμετρη κατανομή που εκφράζονται σαν μέση, IQR

**a** PP vs. Pp, p=0.002; PP vs. pp, p=0.003

**b** pp vs. Pp, p= 0.016

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11. ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ERβ**

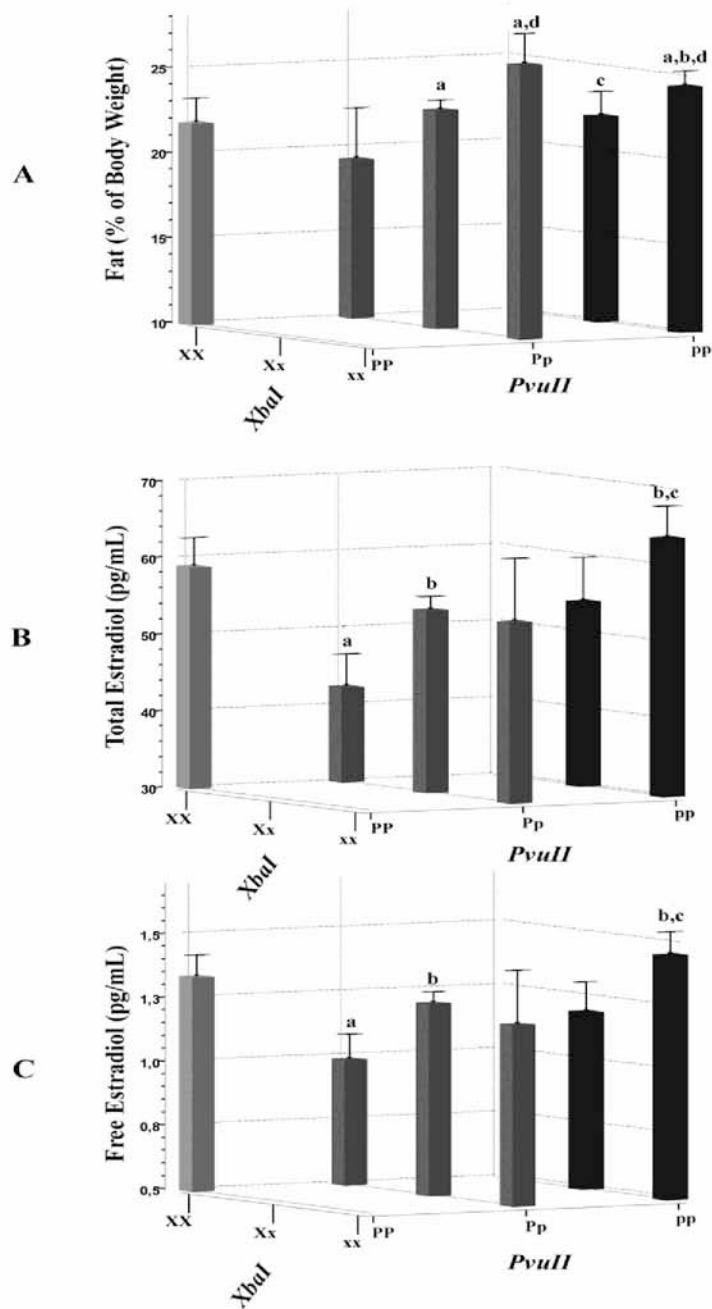
	<i>AluI</i>			<i>RsaI</i>	
	AA	Aa	aa	RR	Rr/rr *
<b>Ηλικία (χρόνια)</b>	43.1±8.9	41.8 ± 9.3	39.7 ± 5.3	42.4±8.9	42.2±7.8
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28.2±4.4	27.9 ±3.1	25.9 ±3.3	27.7±3.7	29.3±5.5
<b>WC (cm)</b>	99.8±10.6	96.5 ±10.5	91.7 ±9.2	97.4±10.4	102.6±12.6
<b>% ποσοστό λίπους</b>	23.4 ±5.8	22.8 ±5.3	19.6 ±4.9	22.6 ±5.5	25.2 ±6.3
<b>SHBG (nmol/l)</b>	21.8 (17.8-29.8)	23.0 (19.6-29.3)	22.1 (17.8-27.2)	22.6 (18.4-29.1)	23.2 (19.4-30.3)
<b>E2 (pg/ml)</b>	49.0 (43.0-65.2)	54.5 (42.1-63.1)	54.8 (45.3-66.1)	51.4 (43.0-64.7)	47.3 (42.2-61.7)
<b>FE2 (pmol/l)</b>	4.3 (3.6-5.7)	4.5 (3.6-5.3)	4.7 (3.9-5.7)	4.3 (3.6-5.6)	4.1 (3.4-5.5)
<b>Testo (ng/dl)</b>	573 (435-693)	611 (499-761)	585 (483-699)	589 (473-715)	522 (416-651)
<b>FTesto (ng/dl)</b>	13.3 (11.5-24.5)	13.7 (10.5-16.9)	13.8 (12.6-16)	13.5 (11.5-17.3)	11.8 (9.8-14.4)
<b>Δείκτης ανδρογόνων</b>	0.9 (0.7-1.1)	0.8 (0.7-1.1)	0.9 (0.7-1.1)	0.9 (0.7-1.1)	0.7 (0.6-1.1)

Οι τιμές εκφράζονται σαν μέση τιμή ± σταθερά απόκλισηSD, εκτός από τις τιμές με ασύμμετρη κατανομή που εκφράζονται σαν μέση, IQR

\* οι γονότυποι Rr και rr εμφανίζονται μαζί λόγω του πολύ μικρού αριθμού των rr ομοζυγωτών (n=2)



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Συνεργική δράση των πολυμορφισμών *PvuII* και *XbaI* του ERα στο % λίπους και στα επίπεδα της ολικής E2 και FE2

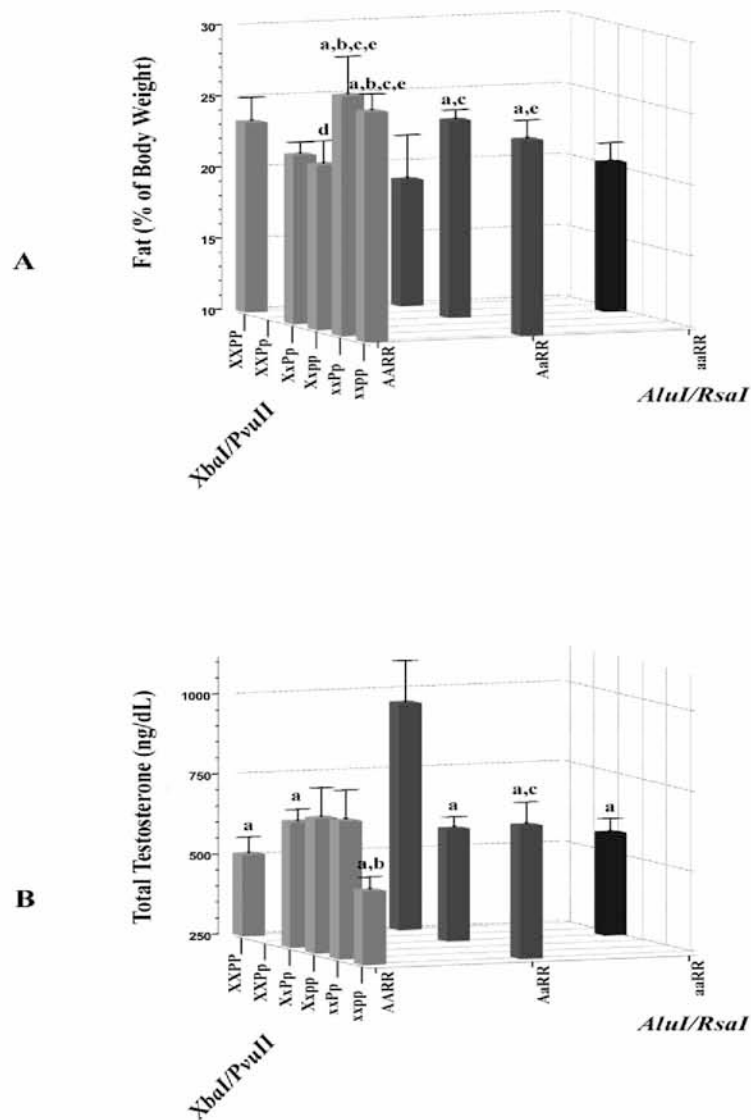


**A:** a XXPP vs. XxPp  $p=0.009$ , XXPP vs. xxPp  $p=0.024$ , XXPP vs. xxpp  $p=0.001$ ; b XXPp vs. xxpp  $p=0.047$ ; c XxPp vs. Xxpp  $p=0.038$ ; d Xxpp vs. xxPp  $p=0.043$ , Xxpp vs. xxpp  $p=0.008$

**B:** a XXPP vs. XXPp  $p=0.011$ ; b XXPp vs. XxPp  $p=0.031$ , XXPp vs. xxpp  $p=0.002$ ; c XxPp vs. xxpp  $p=0.014$

**C:** a XXPP vs. XXPp  $p=0.02$ ; b XXPp vs. XxPp  $p=0.039$ , XXPp vs. xxpp  $p=0.003$ ; c XxPp vs. xxpp  $p=0.024$

**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Συνεργική δράση των πολυμορφισμών του ERα και του ERβ



**A:** a XXPPAARR vs. XxPpAaRR  $p=0.009$ , a XXPPAARR vs. xxPpAARR  $p=0.011$ , XXPPAARR vs. xxppAARR  $p=0.006$ , XXPPAARR vs. xxppAARR  $p=0.05$ ; b XXPPAARR vs. xxPpAARR  $p=0.036$ , XXPPAARR vs. xxppAARR  $p=0.046$ ; c XxPpAARR vs. XxPpAaRR  $p=0.014$ , XxPpAARR vs. xxPpAARR  $p=0.028$ , XxPpAARR vs. xxppAARR  $p=0.014$ ; d XxPpAARR vs. XxppAARR  $p=0.009$ ; e XxppAARR vs. xxPpAARR  $p=0.008$ , XxppAARR vs. xxppAARR  $p=0.008$ , XxppAARR vs. xxppAARR  $p=0.039$

**B:** a XXPPAARR vs. XXPPAARR  $p=0.001$ , XXPPAARR vs. XxPpAARR  $p=0.005$ , XXPPAARR vs. XxPpAaRR  $p=0.001$ , XXPPAARR vs. XxPpaARR  $p=0.002$ , XXPPAARR vs. xxppAARR  $p=0$ , XXPPAARR vs. xxppAARR  $p=0.016$ ; b XxPpAARR vs. xxppAARR  $p=0.033$ ; c xxppAARR vs. xxppAARR  $p=0.022$

### 3.1 Επίδραση των πολυμορφισμών στα επίπεδα των λιπιδίων

Ο πολυμορφισμός AluI του ERβ σχετίζεται με τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης ( $p=0.023$ ), ανεξάρτητα από την ηλικία, την περιμέτρο μέσης, το ποσοστό λίπους, το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ.

Ο πολυμορφισμός RsaI του of ERβ σχετίστηκε με την περιφέρεια μέσης, το ποσοστό λίπους μετά από προσαρμογή για την ηλικία, την αρτηριακή πίεση, HOMA-IR, LDL-χοληστερόλη, το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ. Επιπρόσθετα βρέθηκε συσχετισμός του RsaI με το HOMA-IR ανεξάρτητα από την περιφέρεια μέσης και το ποσοστό λίπους.

Κανένας άλλος συσχετισμός δεν φάνηκε σε κανένα από τους γονότυπους όταν μελετήθηκαν χωριστά.

### 3.2 Συνέργια των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ERα

Υπάρχει συνεργική δράση των δυο των πολυμορφισμών ERα στο ποσοστό λίπους ( $p=0.004$ ), προσαρμοσμένο για την ηλικία και την περιμέτρο μέσης στη μελέτη αυτή. Συγκρίσεις κατά ζεύγη έδειξαν ότι οι γονότυποι xxrr και xxRr σχετίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά λίπους.

### 3.3 Συνέργια των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ERβ

Συνεργική δράση των δυο πολυμορφισμών υπάρχει στο ποσοστό λίπους, την περιμέτρο μέσης και την LDL-χοληστερόλη. Συγκρίσεις κατά ζεύγη έδειξαν ότι οι γονότυποι AARr σχετίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά λίπους και περιμέτρο μέσης καθώς και μη σημαντικά επίπεδα με την LDL-χοληστερόλη. Επιπρόσθετα ο γονότυπος AARR σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα LDL-χοληστερόλης σε σχέση με τον γονότυπο AaRR. (Σχήμα 1)

### 3.4 Συνεργία των πολυμορφισμών του γονιδίου του ERα και του γονιδίου του ERβ

Συνεργική δράση των δυο γονιδίων στην ολική και την LDL-χοληστερόλη υπάρχει με το γονότυπο XxRpAARR να εκδηλώνει υψηλότερες τιμές από τους υπόλοιπους γονότυπους. (Σχήμα 2). Συνεργική δράση υπάρχει ανάμεσα και στους τέσσερις πολυμορφισμούς των γονιδίων στο ποσοστό %λίπους.

### 3.5 Επίδραση των πολυμορφισμών στα επίπεδα των ορμονών

Ο πολυμορφισμός *PvuII* σχετίζεται με τα επίπεδα της E2 ( $p=0.032$ ) και με το ποσοστό λίπους ( $p=0.044$ ), ανεξάρτητα από τη ηλικία και την περίμετρο μέσης και ο γονότυπος *rr* έχει τα υψηλότερα επίπεδα ανάμεσα στις δυο μεταβλητές.

Σε ξεχωριστή ανάλυση όπου το ποσοστό % λίπους προστέθηκε σαν παράγοντος σύγκρισης, η δράση του *PvuII* στην E2 παρέμενε στατιστικά σημαντική ( $p=0.038$ ).

Καμία άλλη σημαντική σχέση δεν φάνηκε όταν κάθε γονότυπος ελέγχθηκε ξεχωριστά συμπεριλαμβανομένης και της SHBG.

### 3.6 Συνέργια των πολυμορφισμών στο γονίδιο του ERα

Υπάρχει συνεργική δράση των δυο πολυμορφισμών του ERα στην E2 ( $p=0.023$ ), FE2 ( $p=0.03$ ) και στο ποσοστό % λίπους ( $p=0.004$ ) όταν έγινε προσαρμογή για την ηλικία και την περίμετρο μέσης (εικόνα 1). Συγκρίσεις κατά ζεύγη δείχνουν ότι οι γονότυποι *xxrr* και *xxPp* σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα E2, FE2 και ποσοστού % λίπους. Σε ξεχωριστή ανάλυση όπου το ποσοστό % λίπους προστέθηκε σαν παράγοντας σύγκρισης, είχε παρόμοια αποτελέσματα για τα επίπεδα της E2 και της FE2. Καμία συνεργική δράση δεν φάνηκε στην SHBG.

### 3.7 Συνέργια των πολυμορφισμών του γονιδίου του ERα και του γονιδίου του ERβ

Συνεργική δράση των δυο γονιδίων στα επίπεδα της ολικής τεστοστερόνης TT, ανεξάρτητα από τη ηλικία, την περίμετρο μέσης και το ποσοστό λίπους (Εικόνα 2). Ο γονότυπος *xxrrAARR* παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης. Σε αντίθεση ο ίδιος γονότυπος μαζί με το γονότυπο *xxPpAARR* σχετίστηκε με υψηλότερο ποσοστό % λίπους. Καμία συνεργική δράση δεν φάνηκε στην SHBG.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι γενετικές παραλλαγές του ERβ σχετίζονται με υψηλά επίπεδα λιπιδίων και αντίσταση στην ινσουλίνη στους υγιείς άνδρες. Εκτός από αυτό οι πολυμορφισμοί και των δυο γονιδίων συμμετέχουν στη διαμόρφωση σώματος μέσω της ποσότητας του λίπους και της περιμέτρου της μέσης. Παρολ' αυτά η επίδραση στα επίπεδα των λιπιδίων ήταν ανεξάρτητη από το ποσό του λίπους. Επιπρόσθετα φαίνεται να υπάρχει συνεργική δράση ανάμεσα στους δυο πολυμορφισμούς του ERα όσον αφορά το ποσό του λίπους και το αλληλόμορφο *xxrr* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσό λίπους. Ανάμεσα στους δυο υπό μελέτη πολυμορφισμούς του ERβ σε σχέση με το λίπος, την περίμετρο μέσης και την LDL-χοληστερόλη ο γονότυπος AARr εμφάνισε το χειρότερο φαινότυπο.

Όταν και οι τέσσερις πολυμορφισμοί μελετήθηκαν μαζί υπήρξε συνέργια μεταξύ του ERα και του ERβ στην ολική χοληστερόλη και στο ποσό του λίπους.

Τα οιστρογόνα μέσω των υποδοχέων τους είναι βασικοί ρυθμιστές της λειτουργίας του λιπώδους ιστού, της γλυκόζης και του μεταβολισμού των λιπιδίων (Faulds και συν). Διαταραχή στη σηματοδότηση των οιστρογόνων που μελετήθηκε στα πειραματικά μοντέλα των ERknock out ποντικών και στους άνδρες που φέρουν μεταλλάξεις είτε στον οιστρογονικό υποδοχέα στο γονίδιο της αρωματάσης οδηγεί σε μεταβολική διαταραχή (αλλαγή στη ποσότητα του λίπους και στη κατανομή του, διαταραγμένος μεταβολισμός λιπιδίων και γλυκόζης και μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη). Ο μοριακός μηχανισμός αυτής της δράσης παραμένει αδιευκρίνιστος.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες διάφορες μελέτες εστίασαν στη συσχέτιση του πολυμορφισμού των ER με τον κίνδυνο ή τη σοβαρότητα της καρδιαγγειακής νόσου (Shearman 2006, Domingues 2008, Mansur 2005, Evangelopoulos 2003, Kjaergaard 2007, Matsubara 1997). Είναι αξιοσημείωτο ότι θετικές συσχετίσεις ήταν πιο έντονες στους άνδρες από ότι στις γυναίκες (πιθανότατα γιατί οι υποδοχείς στις γυναίκες βρίσκονται κάτω από μεγαλύτερη οιστρογονική έκθεση στα αναπαραγωγικά τους χρόνια). Επίσης υπάρχει μόνο θετική συσχέτιση με τον ERβ. Σε αντίθεση μια μετά- ανάλυση από όλες της αναφερόμενες ομάδες δεν έδειξε συσχέτιση του ERα με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο στους άνδρες (Kjaergaard και συν 2007).

Επιπρόσθετα τέθηκε το ερώτημα αν η γενετική παραλλαγή ασκεί επίδραση στα λιπίδια που είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την αθηροσκλήρυνση και την καρδιαγγειακή νόσο. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού του ERα στα επίπεδα των λιπιδίων ελετήθηκε μόνο σε λίγες μελέτες και μόνο στις γυναίκες (Huang 2006, Klos 2008, Lamon-Fava 2010, Almeida 2008, Lawlor 2006).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη SWAN (Study of Women's Health Across the Nation) που είναι μια μεγάλη συγχρονική (cross-sectional) μελέτη πολυεθνική και πολυφυλετική που διεξήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες τις Αμερικής και συμμετείχαν Καυκάσιες γυναίκες μέσης

ηλικίας. Σε αυτή τη μελέτη μελετήθηκαν και οι δυο υποδοχείς αλλά δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του ERα και των λιπιδίων Sowers και συν. Αντίθετα σε μελέτες σε Κινέζες που μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί XbaI και PvuII συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης και της LDL καθώς και με την παρουσία διαβήτη, (Huang και συν 2006).

Σε μια άλλη ιαπωνική μελέτη όπου οι άνδρες και η γυναίκες είχαν εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο και συγκρίθηκαν με μια ομάδα υγιών ατόμων, τα επίπεδα των λιπιδίων δεν σχετίστηκαν με τους πολυμορφισμούς ERα. Δεν βρέθηκε επίσης συσχέτιση με τον επιπολασμό και τη σοβαρότητα της στεφανιαίας νόσου (Matsubara και συν 1997). Είναι ενδιαφέρουσα η μελέτη σε καυκάσιους όπου χρησιμοποιήθηκαν μητρώα πολλαπλών γενεών, ότι οι μετρήσεις του μεταβολισμού της HDL (HDL χοληστερόλη, Apo-A1 και apo-AII) σχετίστηκαν μόνο στις γυναίκες και μόνο σε νεαρές (Klos και συν 2008). Στις γυναίκες η HDL χοληστερόλη και /ή τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σχετίστηκαν με τους πολυμορφισμούς του ERα (Lamon-Fava 2010, Almeida 2008).

Συνοπτικά τα δεδομένα για την επίδραση του ERα στα λιπίδια στους άνδρες είναι περιορισμένα και χωρίς να συσχετίζονται μέχρι σήμερα (Klos και συν 2008, Matsubara και συν 1997, Almeida και συν 2008). Η επίδραση των πολυμορφισμών του ERβ στα λιπίδια μελετήθηκε μόνο σε γυναίκες χωρίς εντυπωσιακά αποτελέσματα (Almeida 2005, Sowers 2008). Στην πρώτη μελέτη βρέθηκε μια θετική συσχέτιση με την LDL-χοληστερόλη και την ολική χοληστερόλη αλλά αυτό περιορίστηκε στις γυναίκες που είχαν οιστρογόνα (προεμμηνοπαυσιακές και εμμηνοπαυσιακές σε ορμονική θεραπεία υποκατάστασης. Στη μελέτη SWAN μια περιορισμένη επίδραση του πολυμορφισμού του ERβ φάνηκε μόνο στις Κινέζες.

Καμιά μελέτη μέχρι τώρα δεν συσχέτισε τα επίπεδα των λιπιδίων και την ινσουλινοαντίσταση με το ERβ σε ανδρικό πληθυσμό.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης αυξάνουν δραματικά τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για μελέτες που ερεύνησαν την επίδραση του ER στις παραμέτρους μεταβολισμού της γλυκόζης. Σε μια μελέτη cross-sectional που προήλθε από την μελέτη British Women's Heart and Health Study δεν παρατηρήθηκε επίδραση του ERα στη HDL ή LDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και την αρτηριακή πίεση. Βρέθηκε όμως σημαντική δράση στο HOMA-IR που χρησιμοποιήθηκε σαν υποκατάστατο μέτρο εκτίμησης της αντίστασης στην ινσουλίνη (Lawlor 2006).

Η γενετική μεταβλητότητα της δράσης του ERα στην ομοιόσταση της γλυκόζης φάνηκε και στην Αμερικανική πολυεθνική μελέτη σε γυναίκες, Lo 2006, όπου οι γενετικοί πολυμορφισμοί του ERα συσχετίστηκαν με την αντίσταση στην ινσουλίνη μόνο στις Κινέζες και τις Γιαπωνέζες. Δεν υπήρχε συσχέτιση στις Καυκάσιες ή στις Αφροαμερικανίδες. Ανάλογα οι πολυμορφισμοί του ERβ σχετίστηκαν με μεταβολικό σύνδρομο μόνο στις Κινέζες. Παρόλ' αυτά καμία επίδραση του ERβ δεν βρέθηκε στην αντίσταση στην ινσουλίνη ή στον επιπολασμό του

μεταβολικού συνδρόμου σε οποιαδήποτε φυλετική /εθνική ομάδα γυναικών μέσης ηλικίας (Lo και συν. 2006). Δεδομένα για τους άνδρες δεν υπάρχουν.

Μέχρι τώρα η μελέτη μας είναι η πρώτη που εξετάζει όλες τις αναφερόμενες παραμέτρους αποκλειστικά σε υγιείς Κανκάσιους άνδρες και είναι η πρώτη μελέτη που συσχετίζει τη θετική δράση των πολυμορφισμών του ERβ με τα επίπεδα των λιπιδίων. Μπροστά στη εκρηκτική αύξηση του επιπολασμού του μεταβολικού συνδρόμου και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρέπει να βρεθούν τα ευαίσθητα γονίδια με σκοπό να καταρτιστούν στρατηγικές πρόληψης.

Θα πρέπει να αναγνωρίσουμε στην παρούσα μελέτη κάποιους περιορισμούς. Πρώτο το μικρό δείγμα των ατόμων και η απουσία μιας ομάδας επικύρωσης (validation cohort). Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι πρόκειται για μια ομοιογενή ομάδα όσον αφορά το φύλο, την εθνικότητα και τις επιδράσεις του περιβάλλοντος, καθώς οι άνδρες της μελέτης προέρχονται από την κεντρική Ελλάδα. Περαιτέρω πληθυσμιακές μελέτες θα πρέπει να γίνουν για να ερευνηθεί αυτό το πεδίο. Κατά δεύτερο λόγο το ποσοστό λίπους υπολογίστηκε με τη μέθοδο της βιοηλεκτρικής εμπέδισης και όχι με τη μέθοδο της απορρόφησης της διπλής δέσμης ακτίνων χ που θεωρείται η καλύτερη μέθοδος. Ένας άλλος περιορισμός θα μπορούσε να είναι το τύπου I λάθος λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων. Επιπρόσθετα η εθνικότητα καθορίστηκε βάση της ταυτότητας και όχι με γενετική ανάλυση. Τέλος τα αποτελέσματα δεν προσαρμόστηκαν βάση των διαιτητικών συνηθειών και της σωματικής άσκησης που μπορούν να αποτελέσουν συγχρητικούς παράγοντες.

Συμπερασματικά τα δεδομένα δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός των οιστρογονικών υποδοχέων στους άνδρες καθορίζει τα επίπεδα των λιπιδίων και κατ'επέκταση τροποποιεί τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, ανεξάρτητα από το ποσοστό λίπους. Πρέπει να υπάρξουν περαιτέρω μελέτες που θα αξιολογήσουν τα ευρήματά μας.

Σε ότι αφορά τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με τα επίπεδα των ορμονών στη παρούσα μελέτη ο πολυμορφισμός Pvu II του ERα συσχετίστηκε με το ποσοστό λίπους και τα επίπεδα της οιστραδιόλης. Ειδικότερα ο γονότυπος pp είχε τις υψηλότερες τιμές και στις δυο μεταβλητές. Αυτή η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική ανεξάρτητα από το ποσοστό % λίπους. Επιπρόσθετα φάνηκε ότι υπάρχει συνεργική δράση ανάμεσα στους δυο πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν στα επίπεδα της οιστραδιόλης E2, της FE2 και στο ποσοστό λίπους. Ο γονότυπος ppxx έχει τις υψηλότερες τιμές και στις τρεις μεταβλητές. Ακόμη συνεργία υπάρχει στη δράση και των τεσσάρων πολυμορφισμών και στα δυο γονίδια ERα και του ERβ, στα επίπεδα της τεστοστερόνης ανεξάρτητα από την ηλικία και το ποσοστό λίπους. Σε αντίθεση, καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ του ERα και του ERβ με τη SHBG όταν μελετήθηκαν χωριστά.

Η σκέψη για τη δημιουργία αυτής της μελέτης βασίστηκε στο γεγονός ότι ενώ υπάρχουν αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών ενός άνδρα υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων στις στεροειδικές ορμόνες στη γήρανση που θα μπορούσε να αποδοθεί σε γονίδια (Jiang 2004). Στους άνδρες υπάρχει η ένδειξη ότι αυξημένος αριθμός των δράσεων των ανδρογόνων

διαμεσολαβείται από τους ERα και του ERβ. Τα γονίδια των ER φαίνεται καθορίζουν τα περιφερικά επίπεδα της οιστραδιόλης καθώς δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες που πιθανόν καθορίζουν τη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των οιστρογόνων (Schuit και συν,2005). Ο Kinoshita και συν. (2003) επιβεβαίωσε την υπόθεση δείχνοντας ότι η οιστραδιόλη μέσω του ERα μπορεί να τροποποιεί την έκφραση του γονιδίου της αρωματάσης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού. Η E2 φαίνεται να αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της αρωματάσης μέσω του ERα μέσω μη γενομικού μηχανισμού και μέσω cross-talk με αυξητικούς παράγοντες διαμεσολαβούντων μηχανισμών.

Ο μηχανισμός για την επαγωγή της έκφρασης της αρωματάσης από τα οιστρογόνα φαίνεται να είναι η προς τα πάνω ρύθμιση του προαγωγέα 1.1 του γονιδίου του ERα (Kinoshita και συν,2003). Υποθέτουμε ότι στους άνδρες η κύρια πηγή E2 προέρχεται από την μετατροπή της τεστοστερόνης σε E2 από την αρωματάση μπορούμε να υποθέσουμε ότι η τροποποίηση της δραστηριότητας της αρωματάσης αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα της κυκλοφορούσας E2. Επιπρόσθετα στη μελέτη ο γονότυπος  $xchrr$  του ERα σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα E2, ενώ ο συνδυασμένος γονότυπος  $xchrrAARR$  του ERα και του ERβ σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα ολικής τεστοστερόνης. Αυτό ενισχύει τη σκέψη ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης συμμετέχει στα αντίθετα αποτελέσματα της δράσης του πολυμορφισμού του ERα στα επίπεδα της E2 και TT.

Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι μεταβολές στη λιπώδη μάζα, στην κατανομή της που ελέγχονται από τους πολυμορφισμούς του ER(Okura 2003,Nilsson 2007) μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα επίπεδα της οιστραδιόλης, μέσω αρωματοποίησης της τεστοστερόνης στο λιπώδη ιστό. Παρ'όλα αυτά ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι πολυμορφισμοί του ERα επηρεάζουν το ποσοστό λίπους ή την κατανομή του παραμένει άγνωστος. Οι ER εκφράζονται τόσο στο υποδόριο όσο και στο σπλαχνικό λίπος και οι ορμόνες του φύλου επηρεάζουν το λιπώδη ιστό. Η διαφορετική κατανομή του λίπους στα δυο φύλα, με τους άνδρες να έχουν υψηλότερο σπλαχνικό λίπος σε σχέση με τις γυναίκες (Enzi και συν. 2003) μπορεί να οφείλεται στην τροποποίηση της δράσης των οιστρογόνων από τα ανδρογόνα.

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι ER ασκούν τη δράση τους στα επίπεδα των στεροειδών του φύλου είναι μέσω βρόχων κεντρικής ανατροφοδότησης.

Σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους ασκούν τις μεταγραφικές τους δράσεις, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός Pvu II βρίσκεται εντός της θέσης σύνδεσης ενός πιθανού μεταγραφικού παράγοντα και η παρουσία των P απλότυπων έχει σαν αποτέλεσμα υψηλότερο επίπεδο μεταγραφής του ERα συγκρινόμενο με τον απλότυπο p (Shearman και συν. 2006). Ο πολυμορφισμός Pvu II έχει σχετιστεί με μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου στους άνδρες (Shearman και συν.2006).

Ο συσχετισμός των ER με τα στεροειδή του φύλου έχει αναφερθεί σε δυο πρόσφατες μελέτες που περιλαμβάνει γυναίκες (Westeberg 2001, Sowers 2006) καθώς και μια μελέτη που



περιλαμβάνει και τα δυο φύλα (Schuit 2005). Ο Westeberg και συν (2001) βρήκαν συσχετισμό μεταξύ των ανδρογόνων (ολικής, ελεύθερης τεστοστερόνης και ανδροστενεδιόνης) και SHBG, με μια πολυμορφική θέση (επαναλαμβανόμενο διουκλεοτίδιο) του ERα μελετώντας ένα Σουηδικό πληθυσμό γυναικών με έμμηνο ρήση. Ο Sowers και συν. (2006) δεν βρήκε συσχέτιση ανάμεσα σε 7 πολυμορφισμούς του ERα και του ERβ και τα επίπεδα της E2 σε Καυκάσιες γυναίκες ενώ βρήκε μια ασθενή σχέση σε Γιαπωνέζες και Αφρο-Αμερικανίδες.

Στο τέλος η μελέτη των Schuit και συν. (2005) αποκάλυψε μια σχέση ανάμεσα στον ERα και τα επίπεδα της οιστραδιόλης στις μετεμηνόπαυσιακές γυναίκες αλλά απέτυχε να δείξει σχέση με τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα στους άνδρες.

Σε αντίθεση με αυτές τις παρατηρήσεις στους άνδρες βρήκαμε ότι οι πολυμορφισμοί του ERα και του ERβ είχαν συνεργική δράση στα επίπεδα της τεστοστερόνης ανεξάρτητα από την ηλικία, την κεντρική παχυσαρκία και το ποσοστό λίπους. Πρόσφατα, έγινε η παρατήρηση ότι η τεστοστερόνη με ένα δόσοεξαρτωμένο τρόπο επάγει τη δραστηριότητα της αρωματάσης σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Kinoshita, 2003). Η καταστολή αυτής της δράσης από ένα ανταγωνιστή ERα και ένα αναστολέα της αρωματάσης, που αναστέλλει τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε E2, υποδηλώνει ότι η τεστοστερόνη τροποποιεί τη δραστηριότητα της αρωματάσης μέσω της E2 και του ERα. Δεν μπορούμε να προσφέρουμε καμία εξήγηση ότι υπάρχει συνεργική δράση ανάμεσα στους δυο υποδοχείς και στα επίπεδα της τεστοστερόνης. Υπάρχει η πιθανότητα ότι οι πολυμορφισμοί του ERα και του ERβ εξασθενούν την επίδραση της τεστοστερόνης στη δράση της αρωματάσης ή η ασθενής δράση του ERβ να ενισχύεται από τον ERα.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που μελετά τη δράση και των τεσσάρων πολυμορφισμών και στα δυο γονίδια των ER στα ανδρογόνα, οιστρογόνα και την SHBG σε υγιείς άνδρες από ένα ομοιογενές δείγμα πληθυσμού της κεντρικής Ελλάδας. Ακόμη είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει τη δράση των αναφερόμενων πολυμορφισμών στο ποσοστό λίπους ως πιθανό μηχανισμό τροποποίησης των ενδογενών στεροειδών. Και στη συνέχεια το αποκλείει ως το μοναδικό μέσο καθώς οι επιδράσεις στα επίπεδα των στεροειδών είναι ανεξάρτητες από τις επιδράσεις στο ποσοστό του λίπους. Μια άλλη σημαντική πτυχή της μελέτης είναι ότι έδειξε τη συνεργική δράση των δύο πολυμορφισμών του ERα στα επίπεδα της E2 καθώς και τους πολυμορφισμούς και των δύο γονιδίων στα επίπεδα της τεστοστερόνης.

Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των συμμετεχόντων ήταν μικρός περιορίζει την ισχύ της μελέτης.

Συμπερασματικά οι πολυμορφισμοί των οιστρογονικών υποδοχέων στους άνδρες τροποποιούν τα επίπεδα των στεροειδών του φύλου και το ποσοστό % του λίπους. Απαιτούνται διαχρονικές μελέτες που θα επιβεβαιώσουν τα ευρήματα αυτής της μελέτης και θα δείξουν τη γενετική επίδραση στις ορμονικές αλλαγές.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SNPs	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS
SHBG	SEX HORMONE BINDING GLOBULIN
T	ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ
TT	ΟΛΙΚΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ
FT	ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ
E2	ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ
HOMA-IR	HOMEOSTATIC MODEL ASSESSMENT – INSULIN RESISTANCE
BMI	BODY MASS INDEX
IQR	INTERQUARTILE RANGE
LDL	LOW DENSITY LIPOPROTEIN
HDL	HIGH DENSITY LIPOPROTEIN
ER $\alpha$	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ $\alpha$
ER $\beta$	ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ $\beta$
DHT ή ΔHT	ΔΙΥΔΡΟΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ
LNCaP CELLS	ANDROGEN-SENSITIVE HUMAN PROSTATE ADENOCARCINOMA CELLS
SERMs	SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATORS
LH	ΩΧΡΙΝΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ
FSH	ΘΥΛΑΚΙΟΤΡΟΠΟΣ ΟΡΜΟΝΗ
ΣN	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ
KYΠ	ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ
cAMP	CUCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE
ICAM	INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE
VCAM-1	VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE-1
Apo E-KO	APOLIPOPROTEIN E -KNOCKOUT
RAG-2 KO	RECOMBINATION ACTIVATING GENE 2 -KNOCKOUT
ROS	REACTIVE OXYGEN SPECIES
VEGF	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR
FGF-2	FIBROBLAST GROWTH FACTOR -2
MAP	MITOGEN ACTIVATED PROTEIN
Th1	ΘΥΜΟΚΥΤΤΑΡΑ 1
CIMT	CAROTID INTIMA MEDIA THICKNESS
ΠΑΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ
ABI	ANKLE/BRACHIAL INDEX

<b>HR</b>	<b>HAZARD RATIO</b>
<b>CI</b>	<b>CONFIDENCE INTERVAL</b>
<b>ArKO</b>	<b>AROMATASE KNOCKOUT</b>
<b>ERKO</b>	<b>ESTROGEN RECEPTOR KNOCKOUT</b>
<b>PRL</b>	<b>PROLACTIN</b>
<b>SRC</b>	<b>PROTO-ONCOGENE TYROSINE-PROTEIN KINASE</b>
<b>MAPK</b>	<b>MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE</b>
<b>ΥΥΓ</b>	<b>ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ ΥΠΟΦΥΣΗ ΓΟΝΑΔΕΣ</b>
<b>SERM</b>	<b>SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATOR</b>
<b>AF-1</b>	<b>ACTIVATION FUNCTION -1</b>
<b>AF-2</b>	<b>ACTIVATION FUNCTION -2</b>
<b>SNPs</b>	<b>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS</b>
<b>PAI-1</b>	<b>PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR -1</b>
<b>CRP</b>	<b>C-REACTIVE PROTEIN</b>
<b>MCP-1</b>	<b>MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN -1</b>
<b>GPER</b>	<b>G-PROTEIN ESTROGEN RECEPTOR</b>
<b>GnRH</b>	<b>GONADOTROPIN RELEASING HORMONE</b>
<b>POMC</b>	<b>PROOPIOMELANOCORTIN</b>
<b>ADIOL</b>	<b>5-ANDROSTEN-3<math>\beta</math>, 17<math>\beta</math>-DIOL DIBENZOATE</b>
<b>DHEA</b>	<b>DEHYDROEPIANDROSTERONE</b>
<b>RLFPs</b>	<b>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS</b>

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbott RD, Launer LJ, Rodriguez BL, Ross GW, Wilson PW, et al. Serum estradiol and risk of stroke in elderly men. *Neurology* 2007; 68: 563–8.
- Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, et al. Low testosterone level as a predictor of cardiovascular events in Japanese men with coronary risk factors. *Atherosclerosis* 2010; 210: 232–6.
- Almeida S, Franken N, Zandona MR, Osorio-Wender MC, Hutz MH. Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J* 2005;5(1):30-4.
- Almeida S, Hutz MH. Estrogen receptor 1 gene polymorphisms in premenopausal women: interaction between genotype and smoking on lipid levels. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(10):872-6.
- Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, et al. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 2003; 18: 2039–2047.
- Anwaar I, Rendell M, Gottsater A, Lindgarde F, Hulthen UL, Mattiasson I. *J. Intern. Med.* 2000; 247:463
- Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, et al. Clinical review: endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3007–19.
- Araujo AB, Kupelian V, Page ST, Handelsman DJ, Bremner WJ, et al. Sex steroids and cause-specific mortality in men. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1252–60.
- Arnal JF & Bayard F. Vasculoprotective effects of oestrogens. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* 2001 28 1032–1034.
- Arnlov J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, et al. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. *Ann Intern Med* 2006; 145: 176–84.
- Bagatell CJ, Knopp RH, Rivier JE, et al. Physiological levels of estradiol stimulate plasma high density lipoprotein2 cholesterol levels in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 855–861.
- Balthazard J & Foidart A. 1993 Brain aromatase and the control of male sexual behaviour. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 44 521-540
- Barros RP, Gustafsson JÅ. 2011. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* 14:289–299
- Bellou S, Karali E, Bagli E, et al. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer* 2012; 11: 35.

- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2536–59.
- Bhasin S, Pencina M, Jasuja GK, Travison TG, Coviello A, et al. Reference ranges for testosterone in men generated using liquid chromatography tandem mass spectrometry in a community-based sample of healthy nonobese young men in the Framingham Heart Study and applied to three geographically distinct cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 2430–9
- Boosani CS, Sudhakar YA. Proteolytically Derived Endogenous Angiostatics Originating from the Extracellular Matrix. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011; 4: 1551–1577.
- Bourassa P-A, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL & Aiello RJ. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice.
- Bouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- $\alpha$  but not estrogen receptor $\beta$ . *Circulation* 2001;103:423–428.
- Calof OM, Singh AB, Lee ML, Kenny AM, Urban RJ, et al. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60A: 1451–7
- Camacho EM, Huhtaniemi IT, O'Neill TW, Finn JD, Pye SR, et al. EMAS Group. Age-associated changes in hypothalamic-pituitary-testicular function in middle-aged and older men are modified by weight change and lifestyle factors: longitudinal results from the European Male Ageing Study. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 445–55.
- Campos H, Walsh BW, Judge H, Sacks FM. Effect of estrogen on very low density lipoprotein and low density lipoprotein subclass metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*.1997; 82:3955-3963
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001;20:6050–6059.
- Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, Dai WS. Usefulness of sex steroid hormone levels in predicting coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 1987; 60: 771–7
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ER $\beta$  has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 2002;16:938–946.
- Chen YF, Oparil S. Effects of sex steroids in vascular injury. In *endocrinology of cardiovascular function*, Levin, Nadler, Eds.;Kluwer Academic Publishers :Dordrecht,1998

- Cornoldi A, Caminit G, Marazzi G, Vitale C, Patrizi R, et al. Effects of chronic testosterone administration on myocardial ischaemia, lipid metabolism and insulin resistance in elderly male diabetic patients with coronary disease. *Int J Cardiol* 2010; 142: 50–5.
- Corona G, Rastrelli G, Monami M, Guay A, Buvat J, et al. Hypogonadism as a risk factor for cardiovascular mortality in men: a meta-analytic study. *Eur J Endocrinol* 2011; 165: 687–701. Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, et al. Adverse events associated with testosterone administration. *New Engl J Med* 2010;363: 109–22.
- Cunningham GR, Toma SM. Clinical review: why is androgen replacement in males controversial? *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 38–52.
- Dansky HM, Charlton SA, Harper MM & Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse.
- Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circulation Research* 2002 90 413–419.
- Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, et al. ER $\alpha$  gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 2001;15:2064–2077.
- Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 561–570
- Dorr M, Wallaschofski H, Friedrich N. Association of low total testosterone levels and prevalent carotid plaques: result of the study of health in Pomerania. *Eur J Epidemiol* 2009; 24: 389–91
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P & Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000 127 4277–4291.
- Efstathiadou Z, Kranas V, Ioannidis JPA, Georgiou J & Tsatsoulis A 2001 The Sp1 COLIA1 gene polymorphism, and not vitamin d receptor or estrogen receptor gene polymorphisms, determines bone mineral density in postmenopausal greek women *Osteoporosis International* 12 326-331
- Elhage R, Clamens S, Reardon-Alulis C, Getz GS, Fievet C, Maret A et al. Loss of atheroprotective effect of estradiol in immunodeficient mice. *Endocrinology* 2000 141 462–465.
- Elkin M, Orgel A, Kleinman HK. An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 875–878.

- Elmquist J, Zigman J, Lutter M. 2006. Molecular determinants of energy homeostasis. *Am J Psychiatry* 163:1137
- Enzi G, Gasparo M, Biondetti PR, Fiore D, Semisa M & Zurlo F. 1986 Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography *American Journal of Clinical Nutrition* 44 739-746
- Evangelopoulos D, Alevizaki M, Lekakis J, Cimponeriu A, Papamichael C, Kominakis A, et al. Molecular analysis of the estrogen receptor alpha gene in men with coronary artery disease: association with disease status. *Clin Chim Acta* 2003;331(1-2):37-44.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 1996;10(5):615-24.
- Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol* 1996;51(5):571-6.
- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 2012;212(1):3-12.
- Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 589–98
- Figtree GA, McDonald D, Watkins H, Channon KM. Truncated estrogen receptor  $\alpha$  46-kDa isoform in human endothelial cells. *Circulation* 2003;107:120–126.
- Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- $\alpha$  (hER- $\alpha$ ) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- $\alpha$  activation function 1. *EMBO J* 2000;19:4688–4700.
- Fogelberg M, Bjorkhem I, Diczfalusy U, Henriksson P. Stanozolol and experimental atherosclerosis: atherosclerotic development and blood lipids during anabolic steroid therapy of New Zealand white rabbits. *Scand J Clin Invest* 1990; 50: 693–6.
- Freiberg MS, Arnold AM, Newman AB, Edwards MS, Kraemer KL, et al. Abdominal aortic aneurysms, increasing infrarenal aortic diameter, and risk of total mortality and incident cardiovascular disease events: 10-year follow-up data from the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2008; 117: 1010–7.
- Frost M, Wraae K, Nielsen TL, Hougaard DM, Brixen K, et al. Similar reference intervals for total testosterone in healthy young and elderly men: results from the Odense Androgen Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78: 743–51.
- Garrow JS & Webster J. 1985 Quetelet's index ( $W/H^2$ ) as a measure of fatness. *International Journal of Obesity* 9 147-153.

- Goodman NF, Cobin RH, Ginzburg SB, Katz IA, Woode DE.; American Association of Clinical Endocrinologists 2011. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of menopause: executive summary of recommendations. *Endocr Pract* 17:949–954
- Gosselin D, Rivest S. 2011. Estrogen receptor transrepresses brain inflammation. *Cell* 145:495–497
- Gourdy P, Mallat Z, Castano C, Garmy-Susini B, Mac Gregor JL, Tedgui A et al. The atheroprotective effect of 17 beta-estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* 2003 166 41–48.
- Goutou M, Sakka Ch, Stakias N, Stefanidis I & Koukoulis G. 2008 AR CAG repeat length is not associated with serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *International Journal of Andrology* Jul 24
- Haddad RM, Kennedy CC, Caples SM, Tracz MJ, Bolona ER, et al. Testosterone and cardiovascular risk in men: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 29–39. 108 Fernandez-Balsells MM, Murad MH, Lane M, Lampropulos JF, Albuquerque F, et al. Clinical review 1: adverse effects of testosterone therapy in adult men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2560–75
- Hak AE, Wittman JC, de Jong FH, Geerlings MI, Hofman A, et al. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3632–9.
- Hanke H, Hanke S, Bruck B, Brehme U, Gugel N, Finking G, Muck AO, Schmahl FW, Hombach V, Haasis R. Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*.1996; 121:129-138
- Haring R, Teng Z, Xanthakis V, Coviello A, Sullivan L, et al. Associations of sex steroids, gonadotrophins, and their trajectories with clinical cardiovascular disease and all-cause mortality in elderly men from the Framingham Heart Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78: 629–34.
- Haring R, Travison TG, Bhasin S, Vasan RS, Wallaschofski H, et al. Relation between sex hormone concentrations, peripheral arterial disease, and change in ankle-brachial index: findings from the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3724–32
- Haring R, Volzke H, Steveling A, Krebs A, Felix SB, et al. Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20–79. *Eur Heart J* 2010; 31: 1494–501



- Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 724–31
- Hart-Unger S, Korach KS. 2011. Estrogens and obesity: is it all in our heads? *Cell Metab* 14:435–436
- Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem* 2003;278:2118–2123.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000;87:677–682.
- Hodgins JB & Maeda N. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 2002 143 4495–4501.
- Hoteit M, Arabi A, Habib R, et al. Estrogen receptor alpha is not a candidate gene for metabolic syndrome in Caucasian elderly subjects. *Metabolism* 2014;63(1):50–6
- Huang Q, Wang TH, Lu WS, Mu PW, Yang YF, Liang WW, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphism associated with type 2 diabetes mellitus and the serum lipid concentration in Chinese women in Guangzhou. *Chin Medical J (Engl)* 2006;119(21):1794-801.
- Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, O'Neill TW, Finn JD, et al. EMAS Group. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry: relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 983–91
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D & Riggs B. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Journal of the American Medical Association* 1998 280 605–613
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998;280:605–613.
- Hyde Z, Norman PE, Flicker L, Hankey GJ, Almeida OP, et al. Low free testosterone predicts mortality from cardiovascular disease but not other causes: the Health In Men Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 179–89.

- Hyde Z, Norman PE, Flicker L, Hankey GJ, McCaul KA, et al. Elevated luteinizing hormone predicts ischaemic heart disease events in older men: the Health In Men Study. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 569–77.
- Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR Jr, Lubahn DB, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor- $\alpha$ -deficient mice. *Nat Med* 1997;3:545–548. [
- Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR Jr, Lubahn DB, O'Donnell TF Jr, Korach KS, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor- $\alpha$ -deficient mice. *Nat Med*.1997; 3:545-548
- Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 2006; 113: 1605–1614.
- Jesmin S, Mowa CN, Sultana SN, et al. Estrogen receptor alpha and beta are both involved in the cerebral VEGF/Akt/NO pathway and cerebral angiogenesis in female mice. *Biomed Res* 2010; 31: 337–346.
- Jiang M & Huhtaniemi I. 2004 Polymorphisms in androgen and estrogen receptor genes: effects on male aging. *Experimental Gerontology* 39 1603-1611
- Johns A, Freay AD, Fraser W, et al. Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology* 1996; 137: 4511–4513
- Karas RH, Hodgins JB, Kwoun K, Krege JH, Aronovitz M, Mackey W, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor  $\beta$ -deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:15133–15136.
- Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. The effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor, (double) knockout mice. *Circ Res*.2001; 89:534-539
- Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2005; 26: 833–76. 18 Rossner W. Sex steroids and the free hormone hypothesis. *Cell* 2006; 124: 455–6. 19 Handelsman DJ. Update in andrology. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4505–11.
- Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Gronholdt ML, Grande P, et al. Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation* 2007;115(7):861-71.

- Kent KC, Zwolak RM, Jaff MR, Hollenbeck ST, Thompson RW, et al. Society for Vascular Surgery, American Association of Vascular Surgery, Society for Vascular Medicine and Biology. Screening for abdominal aortic aneurysm: a consensus statement. *J Vasc Surg* 2004; 39: 267–9.
- Khan NS & Malhorta S. Effect of Hormone replacement therapy on cardiovascular disease: current opinion. *Expert Opin. Pharmacother.* 2003; 4,667-674
- Khaw KT, Dowsett M, Folkard E, Bingham S, Wareham N, et al. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men. European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) prospective population study. *Circulation* 2007; 116: 2694–701.
- Klos KL, Boerwinkle E, Ferrell RE, Turner ST, Morrison AC. ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study. *J Lipid Res* 2008;49(8):1701-6.
- Kim KH, Bender JR. Rapid, estrogen receptor-mediated signaling: why is the endothelium so special? *Sci STKE* 2005;288:pe28
- Kinoshita Y & Chen S. 2003 Induction of aromatase (CYP19) expression in breast cancer cells through a nongenomic action of estrogen receptor alpha. *Cancer Research* 63 3546-3555
- Koh KK, Jin DK, Yang SH, Lee SK, Hwang HY, Kang MH, Kim W, Kim DS, Choi IS, Shin EK, *Circulation* 2001 ;103 :1961
- Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM & Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997 95 1768–1772.
- Lamou-Fava S, Asztalos BF, Howard TD, Reboussin DM, Horvath KV, Schaefer EJ, et al. Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2010;72(2):169-75.
- Lapauw B, Goemaere S, Zmierzak H, Van Pottelbergh I, Mahmoud A, et al. The decline of serum testosterone levels in community-dwelling men over 70 years of age: descriptive data and predictors of longitudinal changes. *Eur J Endocrinol* 2008; 159: 459–68.
- Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 68–75.
- Lawlor DA, Timpson N, Ebrahim S, Day IN, Smith GD. The association of oestrogen receptor alpha-haplotypes with cardiovascular risk factors in the British Women's Heart and Health Study. *Eur Heart J* 2006;27(13):1597-604.

- Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, Vittinghoff E, Hanes V, et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3791–7.
- Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951–1959
- Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4807–4812.
- Li L, Hisamoto K, Kim KH, Haynes MP, Bauer PM, Sanjay A, et al. Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16468–16473.
- Liao CH, Li HY, Chung SD, Chiang HS, Yu HJ. Significant association between serum dihydrotestosterone level and prostate volume among Taiwanese men aged 40–79 years. *Aging Male* 2012; 15: 28–33.
- Liu PY, Beilin J, Meier C, Nguyen TV, Center JR, et al. Age-related changes in serum testosterone and sex hormone binding globulin in Australian men: longitudinal analyses of two geographically separate cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3599–603.
- Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115: 459–67
- Lo JC, Zhao X, Scuteri A, Brockwell S, Sowers MR. The association of genetic polymorphisms in sex hormone biosynthesis and action with insulin sensitivity and diabetes mellitus in women at midlife. *Am J Med* 2006;119(9 Suppl 1):S69-78.
- Maggio M, Cattabiani C, Lauretani F, Artoni A, Bandinelli S, et al. The relationship between sex hormones, sex hormone binding globulin and peripheral artery disease in older persons. *Atherosclerosis* 2012; 225: 469–74.
- Maggio M, Lauretani F, Ceda GP, Bandinelli S, Ling SM, et al. Relationship between low levels of anabolic hormones and 6-year mortality in older men: the aging in the Chianti Area (InCHIANTI) study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 2249–54.
- Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3313–8. Jones TH, Saad F. The effects of testosterone on risk factors for, and the mediators of, the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 2009; 207: 318–27

- Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Kerry KE, Jones RD, et al. Testosterone replacement in hypogonadal men with angina improves ischaemic threshold and quality of life. *Heart* 2004; 90: 871–6.
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.*2003; 349:523-534
- Mansur Ade P, Nogueira CC, Strunz CM, Aldrighi JM, Ramires JA. Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease. *Arch Med Res* 2005;36(5):511-7.
- Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3006-12.
- Matthews DR HJ, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985 28(7):412-9.
- Mendelsohn ME & Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N.Engl.J.Med.*1999; 340:1801-18011
- Menke A, Guallar E, Rohrmann S, Nelson WG, Rifai N, et al. Sex steroid concentrations and risk of death in US men. *Am J Epidemiol* 2010; 171: 583–92.
- Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER. *Biochem. J* 1998; 330:1097
- Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 2006;147:5557–5563.
- Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. *Circulation* 1999; 99:1726
- Mueck AO, Seeger H, Kabpohl-Butz S, Teichann AT, Lippert TH. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1996;104:392
- Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. *Menopause* 2002; 9:273
- [Mueck AO, Seeger H. Estrogens acting as cardiovascular agents: direct vascular actions. \*Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents\*. 2004 Jan;2\(1\):35-42.](#)
- Muller M, den Tonkelaar I, Thijssen JH, Grobbee DE, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones in men aged 40–80 years. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 583–9. 16 Yeap BB, Almeida OP, Hyde Z, Norman PE, Chubb SA, et al. In men older than 70 years, total testosterone remains stable while free testosterone declines with age. *The Health in Men Study. Eur J Endocrinol* 2007; 156: 585–94

- Muller M, van den Beld AW, Bots ML, Grobbee DE, Lamberts SW, et al. Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. *Circulation* 2004; 109: 2074–9.
- Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease. *Circ Res* 2011; 109: 687–696.
- Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3589–93.
- Nilsson M, Dahlman I, Rydén M, et al. 2007 Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *International Journal of Obesity (Lond)* 31 900-907
- Norman P, Le M, Pearce C, Jamrozik K. Infrarenal aortic diameter predicts all-cause mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1278–82.
- Ohlsson C, Barrett-Connor E, Bhasin S, Orwoll E, Labrie F, et al. High serum testosterone is associated with reduced risk of cardiovascular events in elderly men. The MrOS (Osteoporotic Fractures in Men) study in Sweden. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 1674–81.
- Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Ohta S & Shimotaka H. 2003 Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* 27 1020-1027
- O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and the generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1281–1296.
- Orwoll E, Lambert LC, Marshall LM, Phipps K, Blank J, et al. Testosterone and estradiol among older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1336–44.
- Otsuki M, Gao H, Dahlman-Wright K, Ohlsson C, Eguchi N, Urade Y & Gustafsson JA. Specific regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a mouse heart by estrogen receptor  $\beta$ . *Mol. Endocrinol.*2003; 17:1844-1855
- Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 2002;90:1087–1092.
- Park CJ, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Lazic M, Chambon P, Krust A, Weiss J, Clegg DJ, Dunaif A, Jameson JL, Levine JE. 2011. Genetic rescue of nonclassical ER $\alpha$  signaling normalizes energy balance in obese ER $\alpha$ -null mutant mice. *J Clin Invest* 121:604–612

- Pitrou I, Boutron I, Ahmad N, Ravaud P. Reporting of safety results in published reports of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2009; 169: 1756–61.
- Ponikowska B, Jankowska EA, Maj J, Wegrzynowska-Teodorczyk K, Biel B, et al. Gonadal and adrenal androgen deficiencies as independent predictors of increased cardiovascular mortality in men with type II diabetes and stable coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2010; 143: 343–8.
- Price JF, Lee AJ, Fowkes FG. Steroid sex hormones and peripheral arterial disease in the Edinburgh Artery Study. *Steroids* 1997; 62: 789–94.
- Purnell JQ, Bland LB, Garzotto M, Lemmon D, Wersinger EM, Ryan CW, Brunzell JD, Beer TM. Effects of transdermal estrogen on levels of lipids, lipase activity, and inflammatory markers in men with prostate cancer. *J Lipid Res.* 2006 Feb;47(2):349-55. Epub 2005 Nov 20.
- Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor  $\alpha$  at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 2003;23:1633–1646
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 2004;18:2854–2865.
- Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 236–242.
- Ribas V, Drew BG, Le JA, Soleymani T, Daraei P, Sitz D, Mohammad L, Henstridge DC, Febbraio MA, Hewitt SC, Korach KS, Bensinger SJ, Hevener AL. 2011. Myeloid-specific estrogen receptor  $\alpha$  deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16457–16462
- Rohrmann S, Platz EA, Selvin E, Shiels MS, Joshi CE, et al. The prevalence of low sex steroid hormone concentrations in men in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Clin Endocrinol* 2011; 75: 232–9
- Ropero AB, Soria B, Nadal A. A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol Endocrinol* 2002;16:497–505.
- Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, et al. Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 99: 1666–70.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999 340 115–125. 9 Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J & Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal

results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 2002 288 321–333.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321–333
- Saijo K, Collier JG, Li AC, Katzenellenbogen JA, Glass CK. 2011. An ADIOL-ER $\beta$ -CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation. *Cell* 145:584–595
- Sartorius G, Spasevska S, Idan A, Turner L, Forbes E, et al. Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 755–63.
- Sakka C, Efstathiadou ZA, Polyzos SA, Goutou M, Stakias N, Koukoulis GN. Associations of estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms with sex steroid levels and body fat content in men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012;120(3):154-9
- Scarabin-Carre V, Canonico M, Brailly-Tabard S, et al. High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. *J Am Heart Assoc* 2012; 1: e001388.
- Schuit SCE, de Jong FH, Stolk L et al. 2005 Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women *European Journal of Endocrinology* 153 327-334
- Secomb TW, Alberding JP, Hsu R, et al. Angiogenesis: an adaptive dynamic biological patterning problem. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: e1002983.
- Shanle EK, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 6–19.
- Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ et al. 2006 Estrogen receptor  $\alpha$  gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts *Circulation Research* 98 590-592
- Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1660–5.
- Sieveking DP, Lim P, Chow RW, Dunn LL, Bao S, et al. A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *J Exp Med* 2010; 207: 345–52
- Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA, et al. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5928–36.



- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000;407:538–541. [PubMed: 11029009]
- Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: the Tromso Study. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 236–44.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB & Korach KS. 1994 Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New England Journal of Medicine* 331 1056-1061
- Smith GD, Ben-Shlomo Y, Beswick A, Yarnell J, Lightman S, et al. Cortisol, testosterone, and coronary heart disease: prospective evidence from the Caerphilly Study. *Circulation* 2005; 112: 332–40.
- Södergård R, Bäckström T, Shanbhag V & Carstensen H. 1982 Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 beta to human plasma proteins at body temperature. *Journal of Steroid Biochemistry* 16 801-10.
- Soisson V, Brailly-Tabard S, Empana JP, Feart C, Ryan J, et al. Low plasma testosterone and elevated carotid intima-media thickness: importance of low-grade inflammation in elderly men. *Atherosclerosis* 2012; 223: 244–9.
- Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor  $\alpha$  to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2076–2081. [PubMed: 14764897]
- Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER $\alpha$ -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 2002;16:116–127.
- Sowers MR, Jannausch ML, McConnel DS, Kardia SR & Randolph JF. 2006 Endogenous estradiol and its association with estrogen receptor gene polymorphisms. *American Journal of Medicine* 119 S16-22
- Sowers MR, Symons JP, Jannausch ML, Chu J, Kardia SR. Sex steroid hormone polymorphisms, high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein A-1 from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Am J Med* 2006;119(9 Suppl 1):S61-8.
- Spitzer M, Huang G, Basaria S, Travison TG, Bhasin S. Risks and benefits of testosterone therapy in older men. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 414–24.
- Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, et al. Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of

life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 639–50.

- Srivastava N, Chowdhury PR, Averna M, et al. Estrogen increases hepatic lipase levels in inbred strains of mice: a possible mechanism for estrogen-dependent lowering of high density lipoprotein. *Mol Cell Biochem*. 2001; 220: 87–93.
- Stork S, Baumann K, von Schacky C, Angerer P. *Cardiovasc. Res.* 2002; 53:642
- Sullivan TR Jr, Karas RH, Aronovitz M, Faller GT, Ziar JP, Smith JJ, O'Donnell TF Jr, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest*. 1995;96:2482-2488
- Thompson LP, Pinkas G & Weiner CP. Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation* 2000 102 445–451
- Tiano JP, Delghingaro-Augusto V, Le May C, Liu S, Kaw MK, Khuder SS, Latour MG, Bhatt SA, Korach KS, Najjar SM, Prentki M, Mauvais-Jarvis F. 2011. Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents  $\beta$  cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 121:3331–3342
- Tivesten A, Mellstrom D, Jutberger H, Fagerberg B, Lernfeldt B, et al. Low serum testosterone and high serum estradiol associate with lower extremity peripheral arterial disease in elderly men. The MrOS Study in Sweden. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1070–6
- Tivesten A, Vandenput L, Labrie F, Karlsson MK, Ljunggren O, et al. Low serum testosterone and estradiol predict mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2482–8.
- Tobias JH, Steer CD, Vilarino-Güell C & Brown MA. 2007 Effect of an estrogen receptor-alpha intron 4 polymorphism on fat mass in 11-year-old children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 2286-2291
- Travison TG, Basaria S, Storer TW, Jette AM, Miciek R, et al. Clinical meaningfulness of the changes in muscle performance and physical function associated with testosterone administration in older men with mobility limitation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66A: 1090–9
- Travison TG, Nguyen AH, Naganathan V, Stanaway FF, Blyth FM, et al. Changes in reproductive hormone concentrations predict the prevalence and progression of the frailty syndrome in older men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 2464–74.
- Tsujimura A, Yamamoto R, Okuda H, Yamamoto K, Fukuhara S, et al. Low serum free testosterone level is associated with carotid intima-media thickness in middle-aged Japanese men. *Endocr J* 2012; 59: 809–15

- Tsutsumi S, Zhang X, Takata K, et al. Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2. *J Endocrinol* 2008; 199: 267–273. Liao WX, Magness RR, Chen DB. Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in the pregnant ovine uterine artery endothelial cells in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2005; 72: 530–537.
- Ushio-Fukai M. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 226–235.
- van den Beld AW, Bots ML, Janssen JA, Pols HA, Lamberts SW, et al. Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 25–31. Makinen J, Jarvisalo MJ, Pollanen P, Perheentupa A, Irjala K, et al. Increased carotid atherosclerosis in andropausal middle-aged men. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1603–8. Svartberg J, von Muhlen D, Mathiesen E, Joakimsen O, Bonna KH, et al. Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men. *J Intern Med* 2006; 259: 576–82
- Van den Beld AW, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA & Lamberts SW. 2000 Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** 3276-82.
- Van Uytffanghe K, Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer A & Thienpont LM. 2005 Validation of 5 routine assays for serum free testosterone with a candidate reference measurement procedure based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* **38** 253-61.
- Vehkaavara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Hovatta O et al. *Thromb.Haemost* 2001 ;85 :619
- Vermeulen A, Verdonck L & Kaufman JM. 1999 A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 3666-3672.
- Vermuellen A. 2002 Ageing, hormones, body composition, metabolic effects. *World Journal of Urology* **20** 23-27
- Vikan T, Johnsen SH, Schirmer H, Njolstad I, Svartberg J. Endogenous testosterone and the prospective association with carotid atherosclerosis in men: the Tromso study. *Eur J Epidemiol* 2009; 24: 289–95.
- Vikan T, Schirmer H, Njolstad I, Svartberg J. Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromso study. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 435–42.

- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14: 2123–2133.
- Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 534–43
- Webb CM, Elkington AG, Kraidly MM, Keenan N, Pennell DJ, et al. Effects of oral testosterone treatment on myocardial perfusion and vascular function in men with low plasma testosterone and coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2008; 101: 618–24
- Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, et al. 2001 Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor  $\beta$  gene are associated with androgen levels in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 2562-2568
- Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14783–14788
- Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, et al. EMAS Group. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med* 2010; 363: 123–35. 33 Meier C, Nguyen TV, Handelsman DJ, Schindler C, Kushnir MM, et al. Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Arch Intern Med* 2008; 168: 47–54.
- Wu FC, von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 2003; 24: 183–217.
- Xu L, Freeman G, Cowling BJ, Schooling CM. Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *BMC Med* 2013; 11: 108.
- Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE, Zhang X, Zou F, Gent LM, Hahner LD, Khan SA, Elias CF, Elmquist JK, Clegg DJ. 2011. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* 14:453–465
- Yaron M, Greenman Y, Rosenfeld JB, Izhakov E, Limor R, et al. Effect of testosterone replacement therapy on arterial stiffness in older hypogonadal men. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 839–46.
- Yeap BB, Alfonso H, Chubb SA, Handelsman DJ, Hankey GJ, et al. Lower plasma testosterone or dihydrotestosterone, but not estradiol, are associated with symptoms of intermittent claudication in older men. *Clin Endocrinol* 2013; 79: 725–32.
- Yeap BB, Alfonso H, Chubb SA, Handelsman DJ, Hankey GJ, et al. Reference ranges and determinants of testosterone, dihydrotestosterone and estradiol levels measured using

liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a population-based cohort of older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 4030–9

- Yeap BB, Araujo AB, Wittert GA. Do low testosterone levels contribute to ill-health during male ageing? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2012; 49: 168–82.
- Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, Norman PE, Chubb SA, et al. Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2353–9.
- Yeap BB. Androgens and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 269–76.
- Zachary I, Glikli G. Signal transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568–581. 26 Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 165–197.
- Zanger D, Yang BK, Ardans J, Waclawia MA, Csako G, Wahl LM, Cannon RO. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 1797
- Zhang K, Lu J, Mori T, et al. Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activating the ERR {alpha} /PGC-1 {alpha} pathway. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 426–435.
- Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51–60.