



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΤΜΗΜΑ ΠΑΙΔΙΚΗΣ & ΕΦΗΒΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΗΣ
ΑΜΗΝΟΡΡΟΙΑΣ: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ
ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΤΡΑΝΟΥΛΗΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΛΙΝΑ ΜΙΧΑΛΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΣΟΛΔΑΤΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

**ΤΜΗΜΑ ΠΑΙΔΙΚΗΣ & ΕΦΗΒΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΙΚΗΣ ΑΜΗΝΟΡΡΟΙΑΣ:
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΤΡΑΝΟΥΛΗΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΛΙΝΑ ΜΙΧΑΛΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΣΟΛΔΑΤΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
ΛΙΝΑ ΜΙΧΑΛΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΣΟΛΔΑΤΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΛΑΧΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΕΤΡΟΣ ΔΡΑΚΑΚΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΠΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΘΕΟΔΩΡΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

Στην κόρη μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Παιδικής & Εφηβικής Γυναικολογίας, στο Εργαστήριο Γενετικής και στο Εργαστήριο Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής του ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου προς όλες τις γυναίκες που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην παρούσα έρευνα και χάρη σε αυτές αυτή η μελέτη μπόρεσε να πραγματοποιηθεί και να έρθει σε πέρας.

Αισθάνομαι ιδιαίτερη υποχρέωση να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην Κα Λίνα Μιχαλά, Επίκουρο Καθηγήτρια Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής του ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ και υπεύθυνη του τμήματος Παιδικής & Εφηβικής Γυναικολογίας, που με τίμησε με την ανάθεση του θέματος αυτής της μελέτης. Οι πολύτιμες υποδείξεις και εξειδικευμένες επισημάνσεις της, βασισμένες πάνω στη σε βάθος επιστημονική της γνώση και εμπειρία, σε συνδυασμό με την αμέριστη διάθεση για βοήθεια σε όλα τα στάδια της παρούσας έρευνας, συνέβαλαν αποφασιστικά στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση του έργου μου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Διευθυντή της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής του ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, Καθηγητή Κ. Δημήτριο Λουτράδη, ο οποίος μου άνοιξε τον δρόμο και μου επέτρεψε να βρεθώ μέσα σε μια αστείρευτη πηγή γνώσης και εμπειρίας. Επίσης τον ευχαριστώ γιατί μου μετέδωσε το αμέριστο πάθος του για την έρευνα .

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Αλεξάνδρα Σολδάτου, Επίκουρο Καθηγήτρια της Β' Παιδιατρικής Κλινικής Ε.Κ.Π.Α., Γενικό Νοσοκομείο Παίδων Αθηνών 'Π. & Α. Κυριακού' για τις πολύτιμες συμβουλές της σχετικά με τη συγγραφή των επιστημονικών κειμένων και εργασιών που σχετίζονται με αυτή τη διατριβή.

Θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Δέσποινα Μαυρογιάννη, Ε.ΔΙ.Π. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Μοριακή Βιολόγο του Εργαστηρίου Υποβοηθούμενης αναπαραγωγής της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής του ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, για όλη την

γνώση που μου μετέφερε κατά τη διάρκεια του πειραματικού και του συγγραφικού μέρους της διατριβής και για τη συναίνεση στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της έρευνας στο εν λόγω εργαστήριο.

Η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συνεργασία του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής. Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα να μεταφέρω στον Δρ. Ανδρέα Πάμπανο και στη Δρ. Θεώνη Λεοτσάκου, Μοριακούς Βιολόγους, για την πολύτιμη βοήθειά τους όσον αφορά την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα και για την πολύτιμη γνώση που μου μετέδωσαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υποστήριξη, καθώς και όλους τους φίλους που ήταν εκεί σε όλη αυτή τη διαδικασία.

Σας ευχαριστώ θερμά όλους

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

IYY: Ιδιοπαθής Υπογοναδοτροπικός Υπογοναδισμός

ΛΥΑ: Λειτουργική Υποθαλαμική Αμηνόρροια

ΝΑ: Νευρογενής Ανορεξία

A4 (Androstendione): ανδροστενδιόνη

AgRP (agouti-related protein): πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το agouti

AIS-8 (Athens Insomnia Scale): Κλίμακα Αϋπνίας Αθηνών

AMH (Anti-Mullerian hormone): αντιμυλλέριος ορμόνη

BMP- 6 (bone morphogenetic protein 6): οστική μορφογενετική πρωτεΐνη - 6

CRH (Cortisol Releasing Hormone): εκλυτική ορμόνη της κορτιζόλης

DHEA-S (Dehydroepiandrosteron sulfate): θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη

E2 (Estradiol): οιστραδιόλη

EAT-26 (Eating Attitudes Test): ερωτηματολόγιο διαιτητικών συνηθειών

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

FFM (Fat-Free Mass): άλιπος μάζα

FGF-8 (fibroblast growth factor): αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών - 8

FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1): υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών - 1

FSH (Follicle Stimulating Hormone): θυλακιοτρόπος ορμόνη

GABA (Gamma-Aminobutyric Acid): γ-αμινο-βουτυρικό οξύ

GH (Growth Hormone): αυξητική ορμόνη

GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone): εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών

IGF-1 (Insulin-like growth factor): ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας

IL-1 (Interleukin-1): ιντερλευκίνη 1

IL-6 (Interleukin-6): ιντερλευκίνη 6

IL17RD (Interleukin-17 receptor D): υποδοχέας D ιντερλευκίνης 17

IPAQ (International Physical Activity Questionnaire): ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας

KNDy neurons (kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons) : νευρώνες κισσπεπτίνης, νευροκινίνης και δυνορφίνης

KISS1 (kisspeptin 1): κισσπεπτίνη 1

KISS1R (Kisspeptin receptor 1) : υποδοχέας κισσπεπτίνης 1

LH (Luteinising Stimulating Hormone): ωχρινοτρόπος ορμόνη

M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) : παράγοντας αύξησης των αποικιών των μακροφάγων

MAO-A (monoamine oxidase A): μονοαμινική οξειδάση A

MAO-B (monoamine oxidase B): μονοαμινική οξειδάση B

MBSRQ (Multi-dimensional Body-Self Relation Questionnaire): ερωτηματολόγιο εκτίμησης εικόνας σώματος

NO (Nitric Oxide): νιτρικό οξείδιο

NPY (Neuropeptide Y): νευροπεπτίδιο Y

OPG (Osteoprotegerin): οστεοπροτεγερίνη

P4 (progesterone): προγεστερόνη

PRL (Prolactin): προλακτίνη

PCR (polymerase chain reaction): αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

POMC (proopiomelanocortin): προ-οπιομελανοκορτίνη

PROK2 (prokineticin 2): προκινετισίνη 2

PROKR2 (prokineticin receptor 2): υποδοχέας προκινετισίνης 2

PYY (peptide YY): πεπτίδιο YY

RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand): υποδοχέας οστεοκλαστογενετικού παράγοντα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κ B

SERT (serotonin reuptake transporter): μεταφορέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης

SEMA3A (semaphoring-3A): σεμαφορίνη 3A

SOX10 (SRY-Box Transcription Factor 10): μεταφραστικός παράγοντας 10 της πρωτεΐνης σχετιζόμενης με τον καθορισμό του φύλου στην περιοχή Y

STAI (State-Trait Anxiety Inventory): ερωτηματολόγιο αξιολόγησης του άγχους

T3 (triiodothyronine): τριδοθυρονίνη

T4 (thyroxine): θυροξίνη

TAC3 (tachykinin precursor 3): ταχυκινίνη 3

TAC3R (tachykinin precursor receptor 3): υποδοχέας ταχυκινίνης 3

Testo (testosterone): τεστοστερόνη

TNF- α (tumour necrosis factor- α) : παράγοντας νέκρωσης όγκων α

TGF- β (transforming growth factor beta): τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας- β

TSH (Thyroid Stimulating Hormone): θυρεοειδοτρόπος ορμόνη

17OHP (17-hydroxyprogesterone): 17-υδροξυ-προγεστερόνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
B. ABSTRACT	5
Γ. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
Δ. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	12
1. Ορισμός – Επιδημιολογία	12
2. Διαφορική διάγνωση	13
3. Αιτιοπαθογένεια	22
3.1. Εμμηνορυσιακός κύκλος και ο άξονας ‘Υποθάλαμος – Υπόφυση - Ωοθήκες’	22
3.2. Λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια σχετιζόμενη με την έλλειψη ενέργειας	24
3.2.1. Ενεργειακή κατανάλωση σε ανάπαυση	30
3.2.2. Τριιωδοθυρονίνη (T3)	32
3.2.3. Γκρελίνη και Νευροπεπτίδιο ΥΥ	34
3.2.4. Λεπτίνη και Αντιπυονεκτίνη	37
3.2.5. Αυξητική ορμόνη και Ινσουλινόμορφος αυγητικός παράγοντας	41
3.3. Λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια σχετιζόμενη με το στρες	44
3.3.1. Παθογένεση	44
3.3.2. Η επίδραση των στρεσογόνων παραγόντων στην αναπαραγωγική λειτουργία	48
3.3.3. Διατροφικές διαταραχές	50
4. Γενετικό υπόβαθρο λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας	53
4.1. Το γονίδιο PROKR2	58
5. Επιπτώσεις λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας	60
5.1. Αναπαραγωγή	60
5.2. Οστικός μεταβολισμός	62
5.3. Καρδιαγγειακό σύστημα	65
5.4. Ψυχική και σεξουαλική υγεία	67
6. Θεραπεία	69

Ε. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	72
1. Σκοπός της μελέτης	72
2. Δείγμα	72
2.1. Διάγνωση λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας	73
2.2. Διαδικασία αξιολόγησης	73
2.2.1. Ερευνητικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν	73
2.2.2. Μέθοδος συλλογής δεδομένων	74
2.2.3. Περιγραφή ερευνητικών εργαλείων	75
2.3. Μελέτη του γονιδίου PROKR2	82
2.3.1. Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα	82
2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	87
2.3.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	97
2.3.4. Καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης	98
2.3.5. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων του DNA	99
3. Στατιστική ανάλυση	103
ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
1. Ψυχοσωματικές μετρήσεις	105
1.1. Γενική περιγραφή δείγματος	105
1.2. Διαταραγμένες διατροφικές συμπεριφορές	106
1.3. Διαταραχές του ύπνου	107
1.4. Άγχος και ανησυχία για πρόσληψη βάρους	107
1.5. Φυσική δραστηριότητα	110
1.6. Συσχέτιση των διατροφικών διαταραχών με προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες	111
1.7. Συσχέτιση των διαταραχών του ύπνου με άλλους προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες	115
2. Μοριακός έλεγχος του γονιδίου PROKR2	118
Ζ. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	120
Η. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	137
Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139
Ι. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	182

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παθοφυσιολογία της λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας (ΛΥΑ) είναι πολύπλοκη και δεν χαρακτηρίζεται απλά ως μια μεμονωμένη απορρύθμιση της κατά ώσεις έκκρισης της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH). Έχει συσχετιστεί με συναισθηματικούς, συμπεριφορολογικούς και ψυχοσωματικούς παράγοντες που μεμονωμένα ή συνεργικά οδηγούν σε απορρύθμιση του υποθαλάμου. Προηγούμενες μελέτες υπογράμμισαν τον ρόλο των ψυχοσωματικών παραγόντων στην παθογένεση της ΛΥΑ, ωστόσο ο κομβικός ρόλος των διαταραχών του ύπνου σε αυτούς τους πληθυσμούς δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Επιπροσθέτως, παραμένει ασαφές το πιθανό γενετικό υπόβαθρο της νόσου. Είναι γνωστή η συσχέτιση των μεταλλάξεων της προκινετισίνης 2 (PROK2) και του υποδοχέα της (PROR2) με την παθογένεση του ιδιοπαθούς υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού (IYY). Δύο απενεργοποιητικές μεταλλάξεις (loss-of-function mutations) (g. 254 G>A and g. 518 T>G) του γονιδίου του PROKR2 έχουν αναφερθεί σε γυναίκες με ΛΥΑ.

Δεδομένου ότι οι αγχώδεις διαταραχές και οι διαταραχές του ύπνου συχνά συνυπάρχουν, υποθέσαμε ότι η επίπτωση των διαταραχών του ύπνου θα είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΛΥΑ. Στόχος της παρούσας έρευνας, ήταν η μελέτη των διαταραχών του ύπνου σε Ελληνίδες έφηβες και νέες γυναίκες με

ΛΥΑ και της πιθανής αλληλοσυσχέτισης τους με γνωστούς ψυχοσωματικούς προδιαθεσικούς παράγοντες.

Επίσης, η παρούσα μελέτη ανέλυσε τον ρόλο του γονιδίου του υποδοχέα της προκινετισίνης-2 (PROKR2) στην παθογένεση της ΛΥΑ.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη απο το Νοέμβριο του 2015 μέχρι τον Οκτώβριο του 2019. Κατά την ανωτέρω χρονική περίοδο, 56 έφηβες και νέες γυναίκες ηλικίας μεταξύ 15 και 22 ετών με επιβεβαιωμένη ΛΥΑ προσήλθαν στο ιατρείο Παιδικής και Εφηβικής Γυναικολογίας του Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα, 41 εκ των οποίων δέχθηκαν να ενταχθούν στο πρωτόκολλο. Επιπροσθέτως, 12 ασθενείς με ΙΥΥ, 1 ασθενής με σύνδρομο Kallman και 86 περιπτώσεις υγιών μαρτύρων συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Η αξιολόγηση των ψυχοσωματικών παραγόντων έγινε μέσω αυτοσυμπληρούμενων ερωτηματολογίων. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις αποτιμήθηκαν μετά τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης rho του Spearman. Τέλος, για την πολυπαραγοντική ανάλυση των διαφόρων διαταραχών χρησιμοποιήθηκε η λογαριθμική παλινδρόμηση. Επίσης, αναλύσαμε τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες των δύο εξονίων του PROKR2, καθώς επίσης και τις εγγείς περιοχές μεταξύ των εξονίων και των ενδονίων σε 41 γυναίκες με ΛΥΑ, 23 γυναίκες με ΙΥΥ και 20 υγιείς μάρτυρες αντιστοίχως.

Εικοσιπέντε από τις 41 (61%) ασθενείς με ΛΥΑ και 21 από τις 86 (24.4%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν διαταραχές του ύπνου. Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στις τιμές του ερωτηματολογίου της κλίμακας αϋπνίας Αθηνών (Athens Insomnia Scale, AIS-8) ($p=0.004$) ανάμεσα

στις δύο ομάδες. Στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του σκορ του ερωτηματολογίου AIS-8 και των υψηλών επιπέδων άγχους ($\rho=0.79$, $p<0.0001$). Στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ των υψηλών επιπέδων άγχους και των υποκλιμάκων της έλευσης του ύπνου ($\rho=0.53$, $p=0.0004$), της αφύπνισης ($\rho=0.6$, $p<0.0001$), της συνολικής διάρκειας του ύπνου ($\rho=0.64$, $p<0.0001$), της ποιότητας του ύπνου ($\rho=0.63$, $p<0.0001$), της διάθεσης κατά τη διάρκεια της ημέρας ($\rho=0.34$, $p=0.03$) και της ημερήσιας υπνηλίας ($\rho=0.51$, $p=0.007$) αντίστοιχα. Τέλος, η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα άγχους σχετίζονταν με 2.83 φορές υψηλότερη πιθανότητα για την ανάπτυξη διαταραχών του ύπνου ($p=0.04$).

Είκοσι από τις 41 (48.8%) ασθενείς με ΛΥΑ και 10 από τις 86 (11.6%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν διαταραγμένη διατροφική συμπεριφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στις τιμές του ερωτηματολογίου διαιτητικών συνηθειών (EAT-26) ($p<0.0001$) ανάμεσα στις δύο ομάδες, καθώς επίσης και στις υποκλίμακες της δίαιτας ($p=0.03$) και της βουλημίας ($p<0.001$). Στατιστικά σημαντική αρνητική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του σκορ του ερωτηματολογίου EAT-26 και του δείκτη μάζας σώματος ($\rho=-0.36$, $p=0.02$), ενώ επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του σκόρ του ερωτηματολογίου EAT-26 και του άγχους ($\rho=0.26$, $p=0.04$), της εικόνας σώματος ($\rho=0.79$, $p<0.0001$) και της φυσικής δραστηριότητας ($\rho=0.35$, $p=0.03$) αντίστοιχα. Η διενέργεια πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι η ανησυχία για την εικόνα

σώματος σχετιζόταν με 12.2 φορές υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης δυσλειτουργικών διατροφικών διαταραχών ($p=0.0008$), ενώ τα υψηλά επίπεδα άγχους με 4.3 φορές υψηλότερη πιθανότητα ($p=0.04$) αντίστοιχα.

Οκτώ νέες μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2 βρέθηκαν σε πέντε από τις 41 γυναίκες με ΛΥΑ: g. 241 G>C, g. 296 G>T, g. 375 A>G, g. 404 A>G, g. 404 C>G, g. 410 C>A, g. 421 G>A, and g. 475 G>T. Επίσης, τρεις νέες μεταλλάξεις βρέθηκαν σε τρεις από τις 23 γυναίκες με ΙΥΥ: g. 246 C>T, g. 252 C>T and g. 259 G>C. Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στην κοόρτη των υγιών μαρτύρων.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι γυναίκες με ΛΥΑ παρουσιάζουν σε μεγαλύτερη επίπτωση διαιτητικών διαταραχών σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Οι αγχώδεις διαταραχές και έντονη ανησυχία για την εικόνα σώματος συχνά συνυπάρχουν και συμβάλλουν στην παθογένεση και συντήρηση τόσο της ΛΥΑ όσο και των διαιτητικών διαταραχών. Επίσης, οι γυναίκες με ΛΥΑ φαίνεται να είναι περισσότερο ευπαθείς στις διαταραχές του ύπνου, ενώ εκείνες με τέτοιες διαταραχές παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα άγχους. Τέλος, κατόπιν μοριακής ανάλυσης του γονιδίου PROKR2 ανιχνεύτηκαν νέες μεταλλάξεις, οι οποίες ενδέχεται να σχετίζονται με την ευαισθησία των γυναικών με υποθαλαμική αμηνόρροια στις λειτουργικές διαταραχές της έκκρισης της GnRH. Η ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΛΥΑ ενδέχεται να ανοίξει νέους ορίζοντες σχετικά με την παθοφυσιολογία και διάγνωση της διαταραχής, καθώς επίσης να οδηγήσει σε καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

B. ABSTRACT

An analysis of the pathophysiology of functional hypothalamic amenorrhoea: a correlation with psycho-physiological factors and prokineticin receptor 2 (PROKR2) mutations

Although the proximate cause of functional hypothalamic amenorrhoea (FHA) is the abnormal gonadotropic-releasing hormone (GnRH) secretion, it is seemingly more than an isolated desynchronisation of the GnRH axis. There is fair evidence to support the association of FHA with behavioural, emotional, cognitive and psychological factors. Previous studies underscored the psychological FHA correlates; notwithstanding, the pivotal role of sleep disorders (SleD) has not been elucidated thus far. Moreover, it remains uncertain, whether this variability is also attributable to a genetic predisposition. The Prokineticin 2 (PROK2) and Prokineticin receptor 2 (PROKR2) singling pathway is implicated in the cause of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). Two heterozygous PROKR2 mutations (g. 254 G>A and g. 518 T>G) have also been identified amongst patients with FHA. The latter were found to be loss-of-function mutations.

We hypothesised that FHA women suffer from SleD. We aimed to ascertain the anxiety levels (AL) role on FHA pathophysiology and to identify plausible associations with other known FHA predisposing factors. We also aimed to identify any possible mutations in PROKR2 gene in subjects with FHA.

We conducted a prospective case-control study spanning the period January 2016 to October 2019. We recruited forty-one FHA women and 86 healthy controls. We assessed SleD and other FHA predisposing factors via self-reported questionnaires. The Spearman's correlation coefficient (ρ) was used to examine possible correlations among the different variables. Multivariate logistic regression analysis was conducted to identify independent factors.

We also analysed the coding sequence of PROKR2 in 84 women: 41 with FHA, 23 with IHH, and 20 healthy controls respectively. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA. PCR was performed using primers designed to amplify the two coding exons and the exon-intron boundaries. The amplified PCR products were sequenced using the ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems. Variants were validated using the sequencing Analysis v 5.2 software.

Women with FHA reported having higher SleD ($p=0.004$). There was a significant positive correlation between SleD and AL ($\rho=0.879$, $p<0.0001$). Significant correlation was also found between AL and several AIS-8 constituents, including sleep induction ($\rho=0.529$, $p=0.0004$), awakenings during the night ($\rho=0.603$, $p<0.0001$), final awakening ($\rho=0.421$, $p=0.0061$), total sleep duration ($\rho=0.638$, $p<0.0001$), quality of sleep ($\rho=0.629$, $p<0.0001$), well-being during the day ($\rho=0.34$, $p=0.029$) and

sleepiness during the day ($\rho=0.51$, $p=0.007$). High AL were correlated with 2.83-fold increased SleD risk ($p=0.04$).

Mean scores on Eating Attitudes Test-26 (EAT-26) were significantly higher in females with FHA ($p<0.0001$). Women with FHA were characterised by significantly higher scores at the sub-scale items of dieting ($p=0.03$) and bulimia & food preoccupation ($p<0.001$) compared to healthy controls. Significant difference was also observed between the mean scores of the two groups in all other questionnaires: State-Trait-Anxiety-Inventory (STAI) ($p<0.0001$), Multidimensional Body-Self-Relations Questionnaire (MBSRQ) ($p<0.0001$) and International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) ($p=0.004$). EAT-26 scores were positively correlated with scores on STAI ($\rho=0.26$, $p=0.04$), MBSRQ ($\rho=0.79$, $p<0.0001$) and IPAQ ($\rho=0.35$, $p=0.03$). High scores on IPAQ and STAI were correlated with a 12.2-fold ($p=0.008$) and 4.3-fold ($p=0.04$) increased risk for high scores on EAT-26, respectively.

Eight novel PROKR2 mutations were identified in five of the 41 women with FHA, either in heterozygous state (two cases) or in homozygous or compound heterozygous state (three cases) : g. 241 G>C, g. 296 G>T, g. 375 A>G, g. 404 A>G, g. 404 C>G, g. 410 C>A, g. 421 G>A, and g. 475 G>T. Furthermore, three PROKR2 heterozygous mutations were identified in three of 23 women with IHH: g. 246 C>T, g. 252 C>T and g. 259 G>C. No mutations were found in the cohort of 20 controls with normal menstrual cycles.

Disordered eating behaviours (DEBs) may occur in FHA populations at a higher frequency compared to the general population. Anxiety and overweight

preoccupation may underlie and independently contribute to development and maintenance of both DEBs and FHA. Furthermore, FHA women are seemingly more prone to SleD and those with SleD suffer from higher AL. In view of this evidence, the potential rationale of adding psychological and SleD evaluation to their clinical care is highlighted. Finally, novel mutations in PROKR2 gene were found in women with FHA, suggesting that these variants may contribute to an extent to the variable vulnerability of women to functional changes in GnRH secretion. Identification of gene mutations underlying FHA may lead to new pathophysiology insights, improved diagnostics, and novel treatment approaches. Further research to ascertain the functional impact of these variants is warranted. Differences in the genetic backgrounds of various ethnic populations should also be considered.

Η λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (ΛΥΑ) αποτελεί μια μορφή υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, η οποία εκδηλώνεται κλινικά ως αμηνόρροια λόγω της χρόνιας ανωθυλακιορρυξίας. Χαρακτηρίζεται από την απουσία οργανικής βλάβης και αποτελεί διάγνωση εξ αποκλεισμού. Αποτελεί τη συχνότερη μορφή δευτεροπαθούς αμηνόρροιας, ενώ σπανιότερα εκδηλώνεται ως πρωτοπαθής αμηνόρροια. Χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια του άξονα ‘υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη’ να υποστηρίξει τη διαδικασία ανάπτυξης και ωρίμανσης των ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα, η κατά ώσεις έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin Releasing Hormone – GnRH) είναι αργή έως μηδενική και ως εκ τούτου ανεπαρκής να υποστηρίξει την έκκριση της θυλακιοτρόπου (Follicle Stimulating Hormone – FSH) και της ωχρινότροπου ορμόνης (Luteinising Hormone – LH) από την πρόσθια υπόφυση. Ακολούθως, τα χαμηλά επίπεδα οιστραδιόλης (Estradiol – E2) και προγεστερόνης (Progesterone – P4) οδηγούν σε απουσία ανάπτυξης του ενδομητρίου και συνεπώς σε αμηνόρροια. Ο όρος ‘λειτουργική’ υποδηλώνει ότι η διαταραχή αυτή είναι αναστρέψιμη και ότι η απορρύθμιση της έκκρισης της GnRH σχετίζεται με παράγοντες οι οποίοι παρουσιάζουν άμεση ή έμμεση επίδραση στον άξονα ‘υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη’.

Η παθοφυσιολογία της ΛΥΑ είναι πολύπλοκη και δεν χαρακτηρίζεται απλά ως μια μεμονωμένη απορρύθμιση της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH. Σύμφωνα με ένα μοντέλο που έχει προταθεί για να ερμηνεύσει την παθοφυσιολογία της, μεταβολικοί και ψυχοκοινωνικοί παράγοντες οδηγούν από κοινού στην

ανάπτυξη της υποθαλαμικής αμηνόρροιας, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με συναισθηματικούς, συμπεριφορολογικούς και ψυχοσωματικούς παράγοντες που μεμονωμένα ή συνεργικά οδηγούν σε απορρύθμιση του υποθαλάμου. Προηγούμενες μελέτες υπογράμμισαν τον ρόλο των ψυχοσωματικών παραγόντων στην παθογένεση της ΛΥΑ, ωστόσο ο κομβικός ρόλος των διαταραχών του ύπνου σε αυτούς τους πληθυσμούς δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Επιπροσθέτως, ενώ η γενετική βάση του ιδιοπαθούς υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού (ΙΥΥ) και του συνδρόμου Kallmann έχει διερευνηθεί και αποσαφηνιστεί σε σημαντικό βαθμό, δεν ισχύει το ίδιο και στην περίπτωση της ΛΥΑ. Γενικά, η ακριβής αιτιολογία της παραμένει μέχρι σήμερα σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη, φαίνεται ωστόσο ότι είναι πολυπαραγοντική, ενώ προηγούμενη μελέτη υποστηρίζει την ύπαρξη κάποιας γενετικής βάσης.

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης ψυχοσωματικών παραγόντων καθώς επίσης και του γονοτύπου στην εκδήλωση της ΛΥΑ. Πρόκειται για μια μελέτη παρατήρησης, η οποία περιλαμβάνει δύο σκέλη. Το πρώτο σκέλος αφορά μια μελέτη επιπολασμού, η οποία στοχεύει να εντοπίσει τα αίτια της ΛΥΑ σε έφηβες και νέες γυναίκες μέσω λήψης ιστορικού και συμπλήρωσης ερωτηματολογίων. Το δεύτερο σκέλος αφορά μια μελέτη ασθενή μάρτυρα, όπου η αλληλουχία του γονιδίου PROKR2 των ασθενών μελετάται έναντι μαρτύρων και ασθενών με ΙΥΥ. Αποτελεί μέχρι σήμερα την πρώτη μοριακή μελέτη της ΛΥΑ στην Ελλάδα και την πρώτη μελέτη των διαταραχών του ύπνου σε αυτούς τους πληθυσμούς παγκοσμίως. Όλες οι ασθενείς παρακολουθούνταν στο τμήμα Παιδικής και

Εφηβικής Γυναικολογίας της Α' Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Όλα τα πειράματα μοριακής βιολογίας πραγματοποιήθηκαν στην Μονάδα Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και το Εργαστήριο Γενετικής της Α' Μαιευτικής - Γυναικολογικής κλινικής του ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ.

Δ. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1. Ορισμός - Επιδημιολογία

Η ΛΥΑ αποτελεί μια μορφή υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, η οποία εκδηλώνεται κλινικά ως αμηνόρροια λόγω της χρόνιας ανωοθυλακιορρηξίας. Χαρακτηρίζεται από την απουσία οργανικής βλάβης και αποτελεί διάγνωση αποκλεισμού (Berga SL et al, 1989, Berga SL et al, 1997). Εκδηλώνεται κλινικώς ως δευτεροπαθής αμηνόρροια για χρονικό διάστημα άνω των 6 μηνών και σπανιότερα ως πρωτοπαθής αμηνόρροια. Η επίπτωση της υπολογίζεται μεταξύ 2% - 7% και αποτελεί τη συχνότερη μορφή δευτεροπαθούς αμηνόρροιας (Kaplan JR et al, 2004). Η βασική αιτία της ανωοθυλακιορρηξίας είναι η ανεπάρκεια του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη' να υποστηρίξει τη διαδικασία ανάπτυξης και ωρίμανσης των ωοθυλακίων. Συγκεκριμένα, η κατά ώσεις έκκριση της GnRH είναι αργή έως μηδενική και ως εκ τούτου ανεπαρκής να υποστηρίξει την έκκριση της FSH και της LH από την πρόσθια υπόφυση, οι οποίες απαιτούνται για την έναρξη και διατήρηση των διαδικασιών ανάπτυξης και ωρίμανσης των ωοθυλακίων (Berga SL et al, 1989, Berga SL et al, 1997). Ακολούθως, τα χαμηλά επίπεδα E2 και P4 οδηγούν σε απουσία ανάπτυξης του ενδομητρίου και συνεπώς σε αμηνόρροια. Ο όρος 'λειτουργική' υποδηλώνει ότι η διαταραχή αυτή είναι αναστρέψιμη και ότι η διαταραχή της έκκρισης της GnRH σχετίζεται με παράγοντες οι οποίοι επιδρούν άμεσα ή έμμεσα στον άξονα (Berga SL et al, 1989, Berga SL et al, 2007).

2. Διαφορική διάγνωση

Η διάγνωση της ΛΥΑ είναι όπως αναφέρθηκε διάγνωση εξ αποκλεισμού. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς αμηνόρροιας: 1. Μυλλεριανές και άλλες συγγενείς ανωμαλίες συμπεριλαμβανομένων της κολπικής αγενεσίας, ατρησία του παρθενικού υμένα και το σύνδρομο Asherman 2. Ωοθηκικά αίτια ανωοθυλακιορρηξίας, όπως αγενεσία των γονάδων, σύνδρομο Turner (45, XO), σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. 3. Άλλες ενδοκρινολογικές διαταραχές όπως υποθυρεοειδισμός, υπερθυρεοειδισμός, υπερπρολακτιναιμία, σύνδρομο Cushing και υποφυσιακά αδενώματα. 4. Κεντρικά οργανικά αίτια, άλλοι όγκοι της περιοχής του υποθαλάμου-υπόφυσης και σύνδρομο Kallmann (Gordon CM et al., 2017). Ο πίνακας 1 παρουσιάζει τις ενδοκρινικές διαταραχές των συχνότερων αιτιών αμηνόρροιας λόγω ανωοθυλακιορρηξίας (Gordon CM et al, 2017).

Πίνακας 1. Διαφορική διάγνωση αμηνόρροιας

Κληρονομικές δυσμορφίες
Σύνδρομο Morsier
Ολοπροσεγκεφαλία
Εγκεφαλοκήλη

Ιδιοπαθής καθυστέρηση της ήβης

Γενετικές διαταραχές

Κληρονομική ανεπάρκεια του υποθαλάμου ή της υπόφυσης

Μονογονιδιακές μεταλλάξεις (υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός)

Υπερπρολακτιναιμία

Βλάβη της υπόφυσης ή του τουρκικού εφιππίου

Όγκοι και κύστες (ορμονοεκκριτικοί όγκοι, κρανιοφαρυγγίωμα, κύστη Rathke, άλλες κύστες και όγκοι)

Αυτοάνοση υποφυσίτιδα

Σαρκοείδωση

Αιμοχρωμάτωση

Φυματίωση

Ιστιοκύτωση Langerhans

IgG4 υποφυσίτιδα

Ακτινοβολία

Σύνδρομο Sheehan

Χειρουργείο

Τραύμα

Άλλες διαταραχές

Διατροφικές διαταραχές

Έντονη σωματική δραστηριότητα

Χρόνια νόσος

Διαταραχές διάθεσης

Στρες ή ψυχιατρική νόσος

Φάρμακα

Θυρεοειδής

Υποθυρεοειδισμός ή υπερθυρεοειδισμός

Επινεφρίδια

Συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων

Σύνδρομο Cushing

Νόσος Addison

Ανδρογονοεκκριτικοί όγκοι

Ωοθήκες
Γοναδική αγενεσία ή συσγενεσία
Ωοθηκική ανεπάρκεια
Αυτοάνοση ωοφορίτις
Ακτινοβολία ή χειρουργείο
Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
Οιστογονοεκκριτικοί όγκοι
Μήτρα (ευγοναδισμός)
Μυλλεριανές ανωμαλίες
Σύνδρομο Asherman
Κύηση
Λοιμώξεις (πχ φυματιώδης ενδομητρίτιδα)
Αγενεσία (μήτρα ή τράχηλος)
Κόλπος (ευγοναδισμός)
Αγενεσία
Διαφράγματα
Ατρησία παρθενικού υμένα (ευγοναδισμός)

Ο έλεγχος της ανατομίας του κατώτερου γεννητικού συστήματος αποτελεί το πρώτο βήμα στον αποκλεισμό ανατομικών αιτιών, κυρίως στις περιπτώσεις πρωτοπαθούς αμηνόρροιας. Οι συγγενείς ανωμαλίες συσχετίζονται κατά κανόνα με πρωτοπαθή αμηνόρροια και σε τέτοιες περιπτώσεις η φυσική εξέταση και η απεικόνιση του ουρογεννητικού συστήματος με υπερηχογράφημα ή/και μαγνητική τομογραφία είναι απαραίτητα για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό συγγενών ανωμαλιών. Το σύνδρομο Asherman

εκδηλώνεται ως δευτεροπαθής αμηνόρροια λόγω του τραυματισμού της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου, η οποία είναι απαραίτητη για την αναγέννηση του. Τα ευρήματα ενδέχεται να περιλαμβάνουν ουλώδη ενδομητρικό ιστό ή/και συμφύσεις. Ιστορικό ενδομητρικής απόξεσης για αποβολή, κατακράτηση προϊόντων κύησης ή αιμορραγία υστεροτοκίας ή/και πυελικής φλεγμονής αυξάνει την υποψία για την παρουσία ενδομητρικών συμφύσεων, ενώ η υστεροσκόπηση αποτελεί το 'gold standard' για την διάγνωση του συνδρόμου. Καρυότυπος απαιτείται για τη διάγνωση της γοναδικής δυσγενεσίας και του συνδρόμου Turner, ενώ σε αρκετές των περιπτώσεων τα τυπικά στίγματα του συνδρόμου είναι παρόντα. Σε περίπτωση 46 XY καρυοτύπου, η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνει την Μυλλεριανή αγενεσία λόγω ανεπάρκειας της 5-α ρεδουκτάσης ή του συνδρόμου υπαισθησίας στα ανδρογόνα. Και οι δύο περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από απουσία μήτρας και οι γονάδες είναι όρχεις που εντοπίζονται στην πύελο ή στους βουβώνες.

Στις περιπτώσεις δευτεροπαθούς αμηνόρροιας, το ιστορικό είναι εξαιρετικά σημαντικό και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει την ηλικία αδρεναρχής και θηλαρχής, όπως επίσης το ιστορικό πρόσληψης ή απώλειας βάρους, διαιτητικές συνήθειες και την εβδομαδιαία σωματική άσκηση. Το ιστορικό θα πρέπει να συμπληρώνεται με ορμονολογικό έλεγχο. Ο τελευταίος θα πρέπει να περιλαμβάνει έλεγχο των επιπέδων των: FSH, LH, E2, P4, θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (Thyroid Stimulating Hormone – TSH), θυροξίνης (T4 – Thyroxin), προλακτίνης (prolactin – PRL) και ανδροστενδιόνης

(androstendione – A4). Το μοτίβο των ορμονικών επιπέδων είναι σημαντικότερο από τις απόλυτες τιμές των ορμονών.

Στη ΛΥΑ, οι τιμές των γοναδοτροπινών είναι χαμηλές (< 10IU/L), με την FSH να είναι συνήθως ελαφρώς υψηλότερη από την LH, ενώ οι τιμές της E2 είναι επίσης χαμηλές (<50 pg/mL). Πολύ χαμηλές τιμές γοναδοτροπινών υποδηλώνουν οργανική υποθαλαμική αμηνόρροια λόγω γενετικών μεταλλάξεων που επηρεάζουν την παραγωγή και λειτουργία της GnRH ή όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος και της υπόφυσης.

Η παρουσία υποσμίας ή ανοσμίας υποδηλώνουν την παρουσία του συνδρόμου Kallmann, το οποίο χαρακτηρίζεται από απουσία μετανάστευσης των νευρώνων της GnRH από την οσφρητική πλάκα στον υποθάλαμο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι οσφρητικοί βολβοί, άλλωστε, δεν σχηματίζονται ή έχουν υποπλασία, το οποίο οδηγεί σε ανοσμία ή υποσμία.

Στη ΛΥΑ, η A4 και η τεστοστερόνη (testosterone – testo) βρίσκονται τυπικά στα κατώτερα φυσιολογικά όρια, ενώ η TSH και η T4 επίσης βρίσκονται στα κατώτερα φυσιολογικά όρια υποδηλώνοντας υποθαλαμικό υποθυρεοειδισμό ή σύνδρομο νοσούντος ευθυρεοειδισμού. Η PRL επίσης ανιχνεύεται στα κατώτερα φυσιολογικά όρια. Είναι εξαιρετικά σημαντικός ο αποκλεισμός χρόνιων διαταραχών που ενδεχομένως να ευθύνονται για τη μειωμένη πρόσληψη θερμίδων, όπως οι τροφικές αλλεργίες και η δυσανεξία στη γλουτένη.

Σε περιπτώσεις χαμηλών επιπέδων TSH και υψηλής T4, η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη νόσο Grave's. Παρομοίως, εάν η

FSH βρίσκεται στα ανώτερα φυσιολογικά όρια και η T4 στα κατώτερα φυσιολογικά όρια αντιστοίχως, τότε η ασθενής θα πρέπει να διερευνάται για αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα και η μέτρηση των επιπέδων των αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων (αντιθυρεοειδικά αντισώματα έναντι της θυρεοσφαιρίνης, αντιθυρεοειδικά αντισώματα έναντι της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης και αντιθυρεοειδικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του θυρεοειδοτρόπου ορμόνης) είναι απαραίτητη.

Σε περίπτωση υπερπρολακτιναιμίας απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Τα επίπεδα PRL αυξάνονται από πληθώρα παραγόντων συμπεριλαμβανομένων του στρες, του ύπνου, της άσκησης, της συνουσίας, της διέγερσης της θηλής του μαστού, και της λήψης φαρμάκων.

Η ακρομεγαλία ενδέχεται να οδηγήσει σε ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια και με αυξημένα επίπεδα ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα (Insuline-like Growth Factor - 1, IGF-1). Ο σακχαρώδης διαβήτης ενδέχεται να προκαλεί ολιγομηνόρροια ή αμηνόρροια ως αποτέλεσμα της διαταραχής του άξονα 'υποθάλαμος - υπόφυση - ωοθήκη'. Παρόμοια διαταραχή του άξονα ενδέχεται να προκαλείται και στις περιπτώσεις του συνδρόμου Cushing και επί υποψίας του, διενεργούνται ειδικές δοκιμασίες, όπως ο έλεγχος κορτιζόλης ούρων 24ώρου.

Παρόλο που το στρες αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ενέχονται στην παθοφυσιολογία της ΛΥΑ, τα επίπεδα κορτιζόλης είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά που παρατηρούνται στις περιπτώσεις συνδρόμου Cushing, ενώ ο χαρακτηριστικός κερκάρδιος ρυθμός διατηρείται. Συνεπώς, τα επίπεδα

κορτιζόλης είναι υψηλότερα κατά την διάρκεια της νύχτας και τις πρώτες πρωινές ώρες (Berga SL et al, 1989, Michopoulos V et al, 2013).

Σπανιότερα, η δευτεροπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια δύναται να εκδηλωθεί με τη μορφή κόπωσης και αμηνόρροιας. Τα επίπεδα της θειικής διυδρο-ανδροστερόνης (Dehydroepiandrosteron sulfate, DHEA-S) αναμένεται να βρίσκονται στα κατώτερα φυσιολογικά όρια. Η διαφορική διάγνωση των χαμηλών επιπέδων DHEA-S περιλαμβάνει το σύνδρομο Sheehan, το οποίο χαρακτηρίζεται από μερική ή πλήρη νέκρωση της υπόφυσης. Η υπολειτουργία της υπόφυσης ως αποτέλεσμα τραύματος, όγκου, αυτοάνοσης υποφυσίτιδας ή άλλων παθήσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος μπορεί να διερευνηθεί με έλεγχο διέγερσης. Η μαγνητική τομογραφία υπόφυσης και εγκεφάλου είναι απαραίτητη στη διαφορική διάγνωση, καθώς μπορεί να επιβεβαιώσει ή να αποκλείσει την παρουσία σοβαρών διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος (Lowry DW et al, 1996).

Η χρόνια χρήση φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών δύναται να προκαλέσει διαταραχή της ορθής λειτουργίας του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη' ή άλλες ενδοκρινικές διαταραχές. Η διερεύνηση ψυχιατρικών διαταραχών, όπως η νευρογενής ανορεξία (NA), η κατάθλιψη και οι διαταραχές προσωπικότητας είναι ιδιαίτερας σημαντική για τη διαφορική διάγνωση και σε περίπτωση υποψίας τους, καλό είναι να υπάρξει ψυχιατρική εκτίμηση. Οι ψυχιατρικές διαταραχές συνδέονται με την ενεργοποίηση του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' και η ενδεικνυόμενη θεραπεία ενδέχεται να αντιστρέψει την καταστολή έκκρισης της GnRH. Παραδόξως, το στρες

συχνά ωθεί τις ασθενείς στη λήψη φαρμακευτικών ουσιών, οι οποίες ενδέχονται ανεξαρτήτως της παρουσίας του στρες να καταστείλλουν τον άξονα. Η λήψη οπιοειδών σχετίζεται κλινικά με την καταστολή του άξονα ‘υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες’ και την εμφάνιση υποθαλαμικού υπογοναδισμού (Daniell HW et al, 2008). Επιπροσθέτως, διάφορα ψυχοτρόπα φάρμακα προκαλούν υπερπρολακτιναιμία, η οποία δευτεροπαθώς καταστέλλει την έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο (Ajmal A et al, 2014). Η χρήση μαριχουάνας και αλκοόλης έχει επίσης συσχετιστεί με την καταστολή της υποθαλαμικής έκκρισης GnRH (Rettori V et al, 2010).

Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τις κυριότερες αιτίες ανωοθυλακιορρηξίας και τις ορμονικές μεταβολές που τις χαρακτηρίζουν.

Πίνακας 2. Ορμονικές μεταβολές κυριότερων αιτιών ανωοθυλακιορρηξίας.

	LH (IU/ L)	FSH (IU/ L)	LH/FSH	E2 (pg/ mL)	P4 (ng/ mL)	AMH (ng/ mL)	PRL (ng/ mL)	TSH (mIU/ mL)	T4 (mg/ dL)	DHEA- S (mg/ dL)	17- OHP (ng/ dL)	Testo (ng/ dL)
Λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια	<10	<10	~1	<50	<1	>1	κφο	κφο	κφο	κφ	κφ	κφο

Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια	>15	>15	FSH>L H	<50	<1	<0.5	κφ	κφ ή (+)	κφ ή (-)	κφ	κφ	κφο
Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών	<15	<10	LH>FS H	<50	<1	κφ ή (+)	αφο	κφ	κφ	αφο	κφ	αφο ή (+)
Μη κλασικός τύπος υπαισθησίας στα ανδρογόνα	<15	<10	LH>FS H	<50	≤1	κφ	κφ	κφ	κφ	αφο	(+)	(+)
Υπερπρολακτιναι μία	<10	<10	LH<FS H	<50	<1	κφ	(+)	κφ ή (+)	κφ	κφ ή αφο	κφ	κφ

LH (Luteinising Stimulating Hormone): ωχρινοτρόπος ορμόνη, FSH (Follicle Stimulating Hormone): θυλακιοτρόπος ορμόνη, E2 (estradiol): οιστραδιόλη, P4 (progesterone): προγεστερόνη, AMH (Anti-Mullerian hormone): αντιμυλλέριος ορμόνη, TSH (Thyroid Stimulating Hormone): θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, T4 (Thyroxin): θυροξίνη, DHEA-S (Dehydroepiandrosteron sulfate): θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη, 17OHP (17-hydroxyprogesterone): 17-υδροξυ-προγεστερόνη, testo (testosterone): τεστοστερόνη, κφ: κατά φύση, αφο: ανώτερα φυσιολογικά όρια, κφο: κατώτερα φυσιολογικά όρια, (+): αυξημένη, (-): μειωμένη.

3. Αιτιοπαθογένεια

Η ΛΥΑ αποτελεί μια πολυσύνθετη διαταραχή, η οποία έχει συσχετισθεί με πληθώρα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, οι οποίοι διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκη'. Οι Berga et al πρότειναν ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο μεταβολικοί παράγοντες, όπως

η έντονη σωματική άσκηση, η μειωμένη πρόσληψη θερμίδων και ψυχογενείς παράγοντες συμπεριλαμβανόμενης της πίεσης για υψηλή απόδοση, των μη ρεαλιστικών στόχων και της τελειομανίας παρουσιάζουν συνεργικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την παθογένεση της ΛΥΑ (Berga SL et al, 2007).

3.1. Εμμηνορρυσιακός κύκλος και ο άξονας ‘Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Ωοθηκών’

Ως εμμηνορρυσιακός κύκλος ορίζεται η χρονική περίοδος μεταξύ της πρώτης μέρας της εμμήνου ρύσεως και της ημέρας πριν την έναρξη της επομένης (Yen SS et al, 1999). Ως φυσιολογικός εμμηνορρυσιακός κύκλος ορίζεται ο κύκλος διάρκειας 21-35 ημερών, ενώ η μέση διάρκεια του είναι 28 ημέρες (Nattiv A et al, 2007, Harlow SD et al, 2000). Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος χωρίζεται σε δύο φάσεις: τη θυλακική και την ωχρινική (Yen SS et al, 1999, Mihm M et al, 2011). Η ωοθυλακιορρυξία αφορά στο μέσο του κύκλου και αποτελεί το γεγονός το οποίο διαχωρίζει τις δύο επιμέρους φάσεις του. Συγκεκριμένα, η θυλακική φάση ξεκινά με την έναρξη της εμμήνου ρύσεως, ενώ η ωχρινική με την ημέρα της ωοθυλακιορρυξίας (Yen SS et al, 1999). Η μέση διάρκεια της θυλακικής φάσης είναι 14.6 ημέρες, ενώ της ωχρινικής 13.6 ημέρες (Ecochard R et al, 2000). Η διάρκεια της εμμήνου ρύσεως διαρκεί κατά μέσο όρο από 3 έως 6 ημέρες στο 80% των εμμηνορρυσιακών κύκλων, ενώ η

μεγαλύτερη εμμηνορρυσιακή ροή παρατηρείται συνήθως τη δεύτερη μέρα του κύκλου (Mihm M et al, 2011). Κατά τη διάρκεια της εμμηνορρυσίας η μέση απώλεια αίματος είναι 43.4 ml (Knobil E, 1999).

Ο νευροενδοκρινικός έλεγχος της εμμήνου ρύσεως ξεκινά με την έκκριση της GnRH από τα κύτταρα των πυρήνων του πρόσθιου υποθαλάμου καθώς επίσης και από τα κύτταρα του τοξοειδούς πυρήνα (Knobil E, 1999). Οι γοναδοτροπίνες εκκρίνονται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης υπό την επίδραση της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH (Tsutsumi R et al, 2009), η οποία συμβαίνει σε χρονικά μεσοδιαστήματα της τάξεως των 60-90 λεπτών (Knobil E, 1999, Tsutsumi R et al, 2009, Jones EE et al, 2012).

Κατά τη διάρκεια του κύκλου οι γοναδοτροπίνες εκκρίνονται κατά ώσεις, οι οποίες είναι ανάλογες της έκκρισης της GnRH. Η έκκριση αυτή είναι περισσότερο έκδηλη στη θυλακική φάση σε σύγκριση με την ωχρινική με εξαίρεση την αιχμή της LH κατά την ωοθυλακιορρηξία. Η συχνότητα ώσεων της LH κυμαίνεται μεταξύ 94 λεπτών στην αρχή της ωοθυλακιορρηξίας και 216 λεπτά στο τέλος της ωχρινικής φάσης (Knobil E, 1999, Tsutsumi R et al, 2009, Jones EE et al, 2012). Συνοπτικά, η FSH και τα οιστρογόνα χαρακτηρίζουν την θυλακική φάση, η LH εμφανίζει τη χαρακτηριστική αιχμή της στην ωοθυλακιορρηξία, ενώ οι υψηλές τιμές της P4 χαρακτηρίζουν την ωχρινική φάση (Knobil E, 1999, Tsutsumi R et al, 2009, Jones EE et al, 2012).

3.2. Λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια σχετιζόμενη με την έλλειψη ενέργειας

Η αιτιοπαθογένεια της ΛΥΑ σχετιζόμενης με την έντονη σωματική άσκηση και τη μειωμένη πρόσληψη θερμίδων είναι δευτεροπαθής, ως αποτέλεσμα της ενεργειακής ανεπάρκειας ή/και του υποσιτισμού, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ψυχογενούς ανορεξίας (De Souza MJ et al, 2004, Gordon CM et al, 2010). Η ανάπτυξη αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου αποτελεί κομβικό παράγοντα, ο οποίος εμπλέκεται στην διαταραχή του μεταβολισμού και της έκκρισης των ορμονών αναπαραγωγής. Οι Wade et al ανέπτυξαν την θεωρία της 'διαθεσιμότητας ενέργειας', σύμφωνα με την οποία η προσλαμβανόμενη ενέργεια χρησιμοποιείται με σκοπό τη διεκπεραίωση των πέντε βασικών φυσιολογικών διαδικασιών: θερμορύθμιση, κίνηση, διατήρηση των κυττάρων, ανάπτυξη και αναπαραγωγή (Wade GN et al, 1996). Το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς διατήρησης ενέργειας μέσω μείωσης της ενεργειακής δαπάνης ανάπαυσης (De Souza MJ et al, 2007, De Souza MJ et al, 2004, Loucks AB et al, 2003, O'Brian JT et al, 1980, Myerson M et al, 1991), της ολικής τριιωδοθυρονίνης (T3) (De Souza MJ et al, 2007, Myerson M et al, 1991, Loucks AB et al, 2003), του IGF-1 (Laughlin GA et al, 1996, Laughlin GA et al, 1998), της λεπτίνης (Laughlin GA et al, 1997), της ινσουλίνης (Laughlin GA et al, 1996, Laughlin GA et al, 1998), καθώς επίσης και μέσω αύξησης της κορτιζόλης (Laughlin GA et al, 1998, De Souza MJ et al, 1991, Loucks AB et al, 1989), της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone –

GH) (Laughlin GA et al, 1996, Laughlin GA et al, 1998), του πεπτιδίου YY (Peptide YY – PYY) (Scheid JL et al, 2009) και της γκρελίνης (De Souza MJ, Leidy HJ et al, 2004).

Οι ανωτέρω μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των μηχανισμών καταμερισμού της ενέργειας. Λόγω του αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου, ένα μικρό ποσοστό της διαθέσιμης ενέργειας διατίθεται για τις διαδικασίες της ανάπτυξης και αναπαραγωγής προς όφελος της επιβίωσης του οργανισμού. Ως εκ τούτου, η ενεργειακή ανεπάρκεια οδηγεί σε διαταραχές της εμμήνου ρύσεως και συνήθως σε αμηνόρροια, ως αποτέλεσμα της διαταραχής έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο και την ανεπαρκή υποστήριξη της ωοθυλακιορρηξίας (Yen SS et al, 1999).

Η αργή κατά ώσεις έκκριση της GnRH είναι χαρακτηριστική της ΛΥΑ. Η διαταραγμένη αυτή έκκριση επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την έκκριση της LH σε σχέση με αυτή της FSH, και ως εκ τούτου την ωοθηκική λειτουργία. Το μοτίβο έκκρισης της LH σε ασθενείς με ΛΥΑ χαρακτηρίζεται, είτε από χαμηλού εύρους κατά ώσεις έκκριση, είτε από ανώμαλη έκκριση με αυξημένου εύρους ώσεις κατά τη διάρκεια της νύχτας η οποία προσομοιάζει το μοτίβο έκκρισης που παρατηρείται κατά τα πρώτα έτη της εφηβείας (Boyar RM et al, 1974, Veldhuis JD et al, 1985). Η ανταπόκριση του υποθαλάμου στην εξωγενή έκκριση GnRH παραμένει ανεπηρέαστη, το οποίο επιβεβαιώνει την υποθαλαμική προέλευση της αμηνόρροιας (Boyar RM et al, 1974, Veldhuis JD et al, 1985, Loucks AB et al, 1994).

Η έκκριση της GnRH και κατ' επέκταση η αναπαραγωγή φαίνεται να συνδέονται με τις διαιτητικές και μεταβολικές διαταραχές μέσω ποικίλων μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και διάφοροι παράγοντες σχετιζόμενοι με τη διαδικασία ανάπτυξης (Watanabe M et al, 2014). Συγκεκριμένα, KNDy νευρώνες (Kisspeptin/Neurokinin B/dynorphin neurons - Νευρώνες Κισσπεπτίνης/Νευροκινίνης B/Δυνορφίνης), GABA (Gamma-Aminobutyric Acid, γ-αμινο-βουτυρικό οξύ) νευρώνες και η λεπτίνη αλληλεπιδρούν με τον υποθάλαμο επηρεάζοντας την υποθαλαμική έκκριση της GnRH. Οι KNDy νευρώνες σχετίζονται με την έκκριση της κισσπεπτίνης, νευροκινίνης B και των δυνορφινών (Skorupskaite K et al, 2014, Watanabe M et al, 2014, Donoso AO et al, 1994, Goodman RL et al, 2007, Hrabovszky E et al, 1984, Leranth C et al, 1985). Η ενεργειακή ανεπάρκεια, ως αποτέλεσμα της έντονης σωματικής άσκησης ή/και της μειωμένης πρόσληψης θερμίδων, διαταράσσει την ομαλή έκκριση της GnRH, με την λεπτίνη κυρίως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή την ενδορρύθμιση (Skorupskaite K et al, 2014). Χαρακτηριστικά, υπογοναδισμός παρατηρείται σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης ή του υποδοχέα της (Farooqi IS et al, 2009). Επιπροσθέτως, η μακρά περίοδος νηστείας μειώνει τη συχνότητα έκκρισης της LH από την υπόφυση, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει το εύρος έκκρισής της (Loucks AB et al, 1998, Schneider JE et al, 2004). Σε ασθενείς πάσχουσες από λειτουργική ΛΥΑ, η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας των εκκριτικών ώσεων της LH (Welt CK et al, 2004). Η μεταβολική δράση της λεπτίνης στον άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες' διενεργείται μέσω των

υποδοχέων λεπτίνης στους KNDy και GABA νευρώνες, οι οποίοι αλληλοεπιδρούν με τους GnRH νευρώνες, στους οποίους οι υποδοχείς λεπτίνης απουσιάζουν (Christian CA et al, 2007, Curran-Rauhut MA et al, 2002, Fernandez-Fernandez R et al, 2006, Quennell JH et al, 2009, Smith JT et al, 2005). Επιπροσθέτως, οιστρογονικοί υποδοχείς εντοπίζονται στους KNDy, GABA και GnRH νευρώνες αντιστοίχως (Christian CA et al, 2007, Curran-Rauhut MA et al, 2002). Η παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων στους ανωτέρω νευρώνες υποδηλώνει την άμεση επίδραση της E2 στην υποθαλαμική έκκριση της GnRH μέσω των GnRH νευρώνων, καθώς και την έμμεση επίδραση αυτής μέσω της μείωσης των νευροδιαβιβαστικών μηνυμάτων από τους GABA και KNDy νευρώνες αντιστοίχως (Christian CA et al, 2010, Pinilla L et al, 2012). Η κισσπεπτίνη συνδεόμενη στους GnRH νευρώνες αυξάνει την έκκριση των γοναδοτροπινών και ιδιαιτέρως της LH (Chan YM et al, 2012, Dhillo WS et al, 2007, George JT et al, 2012, Jayasena CN et al, 2014). Σε περιπτώσεις ΛΥΑ σχετιζόμενης με ενεργειακή ανεπάρκεια, εκτός της χαρακτηριστικής μειωμένης έκκρισης της GnRH, επίσης παρατηρείται σημαντική μείωση στην έκκριση της κισσπεπτίνης (Jayasena CN et al, 2010, Jayasena CN et al, 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι η εξωγενής χορήγηση κισσπεπτίνης-54 σε ασθενείς με ΛΥΑ αυξάνει τη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH (Jayasena CN et al, 2010, Jayasena CN et al, 2009).

Η επίδραση της ενεργειακής ανεπάρκειας στην έκκριση της LH έχει διερευνηθεί σε μοντέλα με ενεργειακή ανεπάρκεια ως αποτέλεσμα της

μειωμένης πρόσληψης θερμίδων ή/και έντονης σωματικής άσκησης. Οι Loucks et al, έδειξαν ότι η μειωμένη χορήγηση θερμίδων (≤ 20 kcal/kg FFM/d) για 5 ημέρες σε προηγουμένως ευμηνορροϊκές γυναίκες, οδήγησε σε μείωση της συχνότητας και αύξηση του εύρους των εκκριτικών ώσεων της LH σε σχέση με γυναίκες με επαρκή ενεργειακή πρόσληψη (45 kcal/kg FFM/d) (Loucks AB et al, 2003). Παρομοίως, οι Williams et al, παρατήρησαν σημαντική μείωση στη συχνότητα των ώσεων της LH σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μείωση της προσλαμβανόμενης ενέργειας κατά 60% για μία χρονική περίοδο 7 ημερών σε συνδυασμό με αύξηση της έντασης της σωματικής άσκησης για μία χρονική περίοδο 3 ημερών, αντιστοίχως (Williams NI et al, 1995). Τέλος, οι Scheid et al, διεξήγαγαν μια μελέτη διάρκειας 3 μηνών, παρατηρώντας το μοτίβο έκκρισης της LH κατόπιν μείωσης της ενεργειακής πρόσληψης κατά 30% έως 60% για μια χρονική περίοδο 3 μηνών σε συνδυασμό αερόβιο άσκηση (70% - 80% των ανώτερων καρδιακών παλμών) για 5 ημέρες ανά εβδομάδα. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συχνότητας των ώσεων της LH σε σχέση με αυτή, προ της ανωτέρω παρέμβασης, καθώς επίσης και σε σχέση με ευμηνορροϊκές γυναίκες χωρίς την εν λόγω παρέμβαση (Scheid JL et al, 2013).

Χαμηλότερες τιμές FSH έχουν παρατηρηθεί κυρίως κατά τη χρονική φάση μετάβασης από τη θυλακική στην ωχρινική φάση σε γυναίκες με ΛΥΑ σχετιζόμενη με μειωμένη πρόσληψη θερμίδων ή έντονη σωματική άσκηση (De Souza MJ et al, 1998). Η μείωση αυτή οδηγεί σε διαταραχή της επιστράτευσης των ωοθυλακίων, καθώς επίσης και της επιλογής του επικρατούντος

ωοθυλακίου, και ως εκ τούτου σε μείωση των επιπέδων E2 μεταξύ των ημερών 6-12 του εμμηνορυσιακού κύκλου σε γυναίκες με διαταραγμένο ενεργειακό ισοζύγιο (De Souza MJ et al, 1998). Ωστόσο, οι Loucks et al, δεν παρατήρησαν μεταβολή στα επίπεδα FSH σε γυναίκες με σημαντική μείωση των προσλαμβανόμενων θερμίδων (≤ 20 kcal/kg FFM/d) παρά τη μεταβολή στα επίπεδα των LH και E2, υποδηλώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο ότι η έκκριση της FSH επηρεάζεται διαφορετικά σε περιπτώσεις οξείας και χρόνιας ενεργειακής ανεπάρκειας (Loucks AB et al, 2003). Οι μεταβολές ωστόσο στο μοτίβο έκκρισης της LH συμβάλλουν στη μείωση της εκκρινόμενης P4 από τα κύτταρα θήκης (De Souza MJ et al, 2010, Scheid JL et al, 2011). Το ορμονικό προφίλ των γυναικών με ΛΥΑ χαρακτηρίζεται από χρόνια μείωση των επιπέδων E2 και P4 με χαρακτηριστική απουσία των αιχμών αυτών. Συνεπώς η διαταραχή της εμμήνου ρύσεως, σχετιζόμενης με την μειωμένη πρόσληψη θερμίδων ή και την έντονη σωματική άσκηση είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς τροποποιήσεων του μεταβολικού και ορμονικού προφίλ που επηρεάζουν τους άξονες 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες' και 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' αντιστοίχως.

3.2.1. Ενεργειακή κατανάλωση σε ανάπαυση

Η ενεργειακή κατανάλωση σε ανάπαυση αποτελεί το 60% έως 75% της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας (Poehlman ET, 1989). Πρόκειται για την

απαιτούμενη ενέργεια για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας και ομοιόστασης του οργανισμού (Poehlman ET, 1989). Όπως αναφέρθηκε, σε περίπτωση αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου, μια σειρά από μηχανισμούς διατήρησης της ενέργειας λαμβάνουν χώρα συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης ενεργειακής κατανάλωσης σε ανάπαυση με συνοδές προσαρμογές στην έκκριση των μεταβολικών ορμονών (De Souza MJ et al, 2004, De Souza MJ et al, 2007, Loucks AB et al, 2003, O'Brian JT et al, 1980). Συνεπώς, η ενεργειακή κατανάλωση σε ανάπαυση αποτελεί βασικό παράγοντα του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού, ενώ είναι μειωμένη σε περιπτώσεις ΛΥΑ (De Souza MJ et al, 2007, De Souza MJ et al, 2008). Χαρακτηριστικά, οι De Souza et al, παρατήρησαν σημαντική μείωση της ενεργειακής κατανάλωσης ενέργειας σε ανάπαυση σε συνάρτηση με τον δείκτη μάζας σώματος σε ασθενείς με ΛΥΑ σε σύγκριση με ευμηνορροϊκές γυναίκες (De Souza MJ et al, 2007). Η μείωση αυτή βρέθηκε να συσχετίζεται με μεταβολές σε τρεις μεταβολικές ορμόνες: T3, γκρελίνη και λεπτίνη (De Souza MJ et al, 2007). Μειωμένη ενεργειακή κατανάλωση σε ανάπαυση εντοπίζεται επίσης σε περιπτώσεις ΝΑ, ωστόσο η μείωση αυτή είναι χαρακτηριστικά μεγαλύτερου βαθμού συγκρινόμενη με αυτή που παρατηρείται σε περιπτώσεις ΛΥΑ λόγω έντονης σωματικής άσκησης (Kosmiski L et al, 2014, Obarzanek E et al, 1994, Polito A et al, 2000).

Ο λόγος της ενέργειας κατανάλωσης σε ανάπαυση προς την υπολογιζόμενη κατανάλωση ενέργειας σε ανάπαυση κατά Harris-Benedict παρέχει μια σχετικά ακριβή εκτίμηση της ενεργειακής ανεπάρκειας σχετιζόμενης με μειωμένη

πρόσληψη θερμίδων (De Souza MJ et al, 2008, Kosmiski L et al, 2014, Obarzanek E et al, 1994, Polito A et al, 2000, Konrad KK et al, 2007). Σε ασθενείς με ΝΑ, όταν το σωματικό βάρος είναι χαμηλό και πριν την επανέναρξη σίτισης, ο ανωτέρω λόγος είναι μειωμένος, μεταξύ 0.60 και 0.80 (Polito A et al, 2000, Konrad KK et al, 2007). Το όριο του 0.79 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στον καθορισμό του ενεργειακού ισοζυγίου, και κατ' επέκταση στην πιθανότητα εκδήλωσης αμηνόρροιας (Polito A et al, 2000, Konrad KK et al, 2007). Τέλος, σε περιπτώσεις ΛΥΑ λόγω έντονης σωματικής άσκησης, ο ανωτέρω δείκτης κυμαίνεται μεταξύ 0.8 και 0.88, και είναι σαφέστατα υψηλότερος συγκρινόμενος με τις τιμές που παρατηρούνται σε περιπτώσεις ψυχογενούς ανορεξίας (Polito A et al, 2000, Konrad KK et al, 2007).

3.2.2. Τριδοθυρονίνη (T3)

Η T3 αποτελεί τη δραστικότερη των θυρεοειδικών ορμονών και παράγεται κυρίως μέσω περιφερικής μετατροπής της T4 (Barrett EJ, 2012). Διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η σωματική ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η θερμορρύθμιση και η καρδιακή λειτουργία, ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από την T3. Είναι γνωστή η άμεση επίδραση του ενεργειακού

ισοζυγίου και της πρόσληψης θερμίδων στις θυρεοειδικές ορμόνες, και εμμέσως, στην ενεργειακή κατανάλωση κατά την ανάπαυση (Berger AG et al, 1980, Rosenbaum M et al, 2000, Wimpfheimer C et al, 1979). Σε περιπτώσεις χαμηλής πρόσληψης θερμίδων παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της T3, ενώ κατά την αύξηση της προσλαμβανόμενης ενέργειας, παρατηρείται αντίστοιχα και αύξησή της (Loucks AB et al, 1993). Χαρακτηριστικά, οι Loucks et al παρατήρησαν μείωση στη συγκέντρωση της T3, όταν οι προσλαμβανόμενες θερμίδες μειώθηκαν μεταξύ 19 και 25 kcal/kg σε προηγουμένως ευμνηορροϊκές γυναίκες (Loucks AB et al, 1994). Συνεπώς, η T3 αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη του ενεργειακού ισοζυγίου σχετιζόμενου είτε με τη μειωμένη πρόσληψη θερμίδων είτε την έντονη σωματική άσκηση (Loucks AB et al, 1993, Loucks AB et al, 1994). Τέλος, σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της T3 έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΛΥΑ σχετιζόμενης με ψυχογενή ανορεξία (Miyai K et al, 1975, Moshang T et al, 1975, Moshang T et al, 1973). Επιπροσθέτως, ασθενείς με ψυχογενή ανορεξία, οι οποίες ανέκτησαν σωματικό βάρος, παρουσίασαν συνακόλουθη αύξηση της ολικής T3 με συνοδό αύξηση της ενεργειακής κατανάλωσης σε ανάπαυση (Onur S et al, 2005). Τα χαμηλά επίπεδα της ολικής T3 έχουν συνδεθεί επίσης με τις διαταραχές της εμμήνου ρύσεως σε ασθενείς με ΛΥΑ σχετιζόμενης με έντονη σωματική άσκηση (Loucks AB et al, 1992) και ψυχογενή ανορεξία (Bannai C et al, 1988). Τέλος, σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση T3 παρατηρείται σε αμνηορροϊκές αθλήτριες σε σχέση με αυτή ευμνηορροϊκών αθλητριών (De Souza MJ et al, 2007, Loucks AB et al, 1992).

Συνεπώς, οι διαταραχές της εμμήνου ρύσεως σχετίζονται με μηχανισμούς διατήρησης του ενεργειακού ισοζυγίου που ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις ενεργειακής ανεπάρκειας. Σημαντικοί παράγοντες της ρύθμισης του ενεργειακού ισοζυγίου αποτελούν η κατανάλωση ενέργειας σε ανάπαυση και η ολική T3 (De Souza MJ et al, 2007, Loucks AB et al, 1992). Οι αλλαγές που παρατηρούνται στους ανωτέρω ρυθμιστές είναι ευθέως ανάλογες των διαταραχών της εμμήνου ρύσεως (De Souza MJ et al, 2007). Παρομοίως, η αποκατάσταση της εμμήνου ρύσεως σχετίζεται με την επαρκή ενεργειακή πρόσληψη, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της ολικής T3 και της ενεργειακής κατανάλωσης σε ανάπαυση (Williams NI et al, 2001).

3.2.3. Γκρελίνη και νευροπεπτίδιο YY

Η γκρελίνη και το PYY αποτελούν πεπτίδια του γαστρεντερικού συστήματος τα οποία απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία και επηρεάζουν τους μηχανισμούς ρύθμισης της ενεργειακής ομοιόστασης (Huda MS et al, 2006) και της αναπαραγωγικής λειτουργίας (Fernandez-Fernandez R et al, 2005, Kluge M et al, 2007, Lanfranco F et al, 2008, Messinis CI et al, 2009, Navarro VM et al, 2013, Vulliemoz NR et al, 2004) στο επίπεδο του υποθαλάμου. Αμφότερα ρυθμίζουν τη δράση του νευροπεπτιδίου Y (NPY) και της πρωτεΐνης

σχετιζόνης με το agouti (agouti-related protein -AgRP) (Navarro VM et al, 2013), καθώς και των νευροπεπτιδίων εκκρινόμενων από τους νευρώνες προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC) (Navarro VM et al, 2013). Τα νευροπεπτίδια εκκρινόμενα από τους POMC νευρώνες ασκούν σημαντική ανορεξιογόνο δράση, σε αντίθεση με την ορεξιογόνο δράση του NPY (Navarro VM et al, 2013).

Η γκρελίνη εκκρίνεται κατά κύριο λόγο από τους οξυντικούς αδένες του θόλου του στομάχου και από εκεί απελευθερώνεται στη συστηματική κυκλοφορία (Vulliamoz NR et al, 2003, Kojima M et al, 1999, Nakazato M et al, 2001). Παρουσιάζει ορεξιογόνο δράση και η αύξηση της συγκέντρωσης της στην κυκλοφορία συνδέεται με την αύξηση του αισθήματος της πείνας (Nakazato M et al, 2001, Cummings DE et al, 2001, Cummings DE et al, 2004, St-Pierre DH et al, 2006, Tschöp M et al, 2001). Επιπροσθέτως, η γκρελίνη αποτελεί ισχυρό διεγέρτη για την έκκριση της GH (Alvarez-Castro P et al, 2004, Arvat E et al, 2001). Η δράση της αυτή φαίνεται ότι εξασκείται μέσω ενεργοποίησης των NPY/AgRP και καταστολής των POMC νευρώνων στον τοξοειδή πυρήνα του εγκεφάλου (Dickson SL et al, 1997, Guan XM et al, 1997, Kamegai J et al, 2001, Willesen MG et al, 1999). Οι μεταβολές στη συγκέντρωση της γκρελίνης δρουν ως μεταβολικά σήματα στους NPY/AgRP και POMC νευρώνες, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο το αίσθημα πείνας, και κατ' επέκταση, την πρόσληψη τροφής (Cummings DE et al, 2001).

Το PYY αποτελεί μια αναγνωρισμένη ανορεξιογόνο ορμόνη (Wren AM et al, 2007), η οποία δρα μέσω ενεργοποίησης των POMC νευρώνων και

καταστολής των NPY/AgRP νευρώνων αντιστοίχως (Hill JW et al, 2008). Η δράση του PYY στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της προσλαμβανόμενης ενέργειας, η οποία ενδέχεται να οδηγήσει σε ακόλουθη μείωση του σωματικού βάρους (Hill JW et al, 2008). Τόσο η γκρελίνη όσο και το PYY φαίνεται να εμπλέκονται στις διαταραχές της εμμήνου ρύσεως που συνοδεύουν τη σημαντική (νευρογενής ανορεξία) και τη μέτρια (σωματική άσκηση) μείωση του σωματικού βάρους (De Souza MJ et al, 2004, Scheld JL et al, 2009).

Η γκρελίνη συνδέεται με την ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη (St-Pierre DH et al, 2006). Η ενδοφλέβια χορήγησή της σε γυναίκες και άντρες με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος σχετίζεται με σημαντική αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης (Wren AM et al, 2007). Επιπροσθέτως, αυξημένα επίπεδα γκρελίνης νηστείας έχουν παρατηρηθεί σε γυναίκες με ψυχογενή ανορεξία (Misra M et al, 2005, Tanaka M et al, 2003, Tolle V et al, 2003) και ΛΥΑ σχετιζόμενη με έντονη σωματική άσκηση (De Souza MJ et al, 2004, Scheld JL et al, 2009). Χαρακτηριστικά, σε γυναίκες με ψυχογενή ανορεξία δεν παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης γκρελίνης μετά τη λήψη τροφής (Misra M et al, 2005, Tolle V et al, 2003, Misra M et al, 2006).

Σε γυναίκες με ΛΥΑ σχετιζόμενη με έντονη σωματική άσκηση, οι συγκεντρώσεις της γκρελίνης είναι αυξημένες έως και 85% σε σχέση με ευμνηορροϊκές γυναίκες (De Souza MJ et al, 2004). Επιπροσθέτως, γυναίκες με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος κατόπιν δίαιτας και σωματικής άσκησης διάρκειας 3 μηνών, παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων γκρελίνης

24-ώρου καθώς επίσης και σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων νηστείας και των νυχτερινών αιχμών γκρελίνης (Leidy HJ et al, 2007). Τέλος, έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων νηστείας του PYY και της κατανάλωσης ενέργειας σε ανάπαυση, υποδηλώνοντας μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των ορμονών που ρυθμίζουν το αίσθημα της πείνας και των μηχανισμών διατήρησης της ενέργειας, που ενδέχεται να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις διαιτητικές συνήθειες σε αυτούς τους πληθυσμούς (Misra M et al, 2006, Scheld JL et al, 2009).

Σημαντική μείωση των συγκεντρώσεων γκρελίνης έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις αερόβιας άσκησης (King JA et al, 2010, King NA et al, 2009, MartinsC et al, 2007). Αυτή η μείωση της γκρελίνης, σε συνδυασμό με τη συνοδό αύξηση του PYY φαίνεται ότι οδηγούν σε διαιτητικές συμπεριφορές που έχουν ως αποτέλεσμα τη χρόνια ενεργειακή ανεπάρκεια (King NA et al, 2009, MartinsC et al, 2007). Συνεπώς, τα μειωμένα επίπεδα γκρελίνης και η αυξημένη συγκέντρωση PYY αποτελούν το ανορεξιογενές ορμονικό προφίλ που χαρακτηρίζει την ΛΥΑ σχετιζόμενη με το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο. Σε περιπτώσεις που αυτή η ανισορροπία μεταξύ πρόσληψης θερμίδων και κατανάλωσης ενέργειας μέσω της έντονης σωματικής άσκησης διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, δύναται να οδηγήσει σε χρόνια ενεργειακή ανεπάρκεια (Loucks AB et al, 2011). Η γκρελίνη παρουσιάζει άμεση και έμμεση επίδραση στην έκκριση της GnRH και σχετίζεται με τη διαταραχή των εκκρινικών ώσεων της LH (Fernandez-Fernandez R et al, 2004, Hill JW et al, 2008, Budok E et al, 2006, Misra M et al, 2005). Οι Scheid et al, μελέτησαν

την επίδραση της απώλειας σωματικού βάρους, ως αποτέλεσμα δίαιτας ή/και σωματικής άσκησης, και παρατήρησαν μειωμένη συχνότητα των εκκριτικών ώσεων της LH, καθώς επίσης και αυξημένη συγκέντρωση γκρελίνης 24-ώρου και των προγευματικών αιχμών της (Scheid JL et al, 2013). Παρομοίως, σε περιπτώσεις NA, τα αυξημένα επίπεδα γκρελίνης σχετίζονται με μειωμένη συγκέντρωση της πρωινής LH νηστείας, ωστόσο οι μεταβολές στη συχνότητα έκκρισής της μένουν να διερευνηθούν (Misra M et al, 2005).

3.2.4 Λεπτίνη και Αντιπονεκτίνη

Οι αντιποκίνες, λεπτίνη και αντιπονεκτίνη, αποτελούν δύο επιπλέον παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται στην ορμονική ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας και της ενεργειακής ομοιόστασης. Η λεπτίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob* και ρυθμίζει την ενεργειακή πρόσληψη, συμπεριλαμβανομένης της όρεξης, της πείνας, του μεταβολισμού και της συμπεριφοράς (Zhang Y et al, 1994). Η συγκέντρωση της λεπτίνης σχετίζεται ανάλογα με το σωματικό λίπος (Considine RV et al, 1996, Chan JL et al, 2005). Η αντιπονεκτίνη αποτελεί επίσης μια ορμόνη του λευκού λιπώδους ιστού, η οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση σε υγιείς πληθυσμούς (Scherer PE et al, 1995, Maeda K et al, 1996, Hu E et al, 1996, Nakano Y et al, 1996) και δρα αυξάνοντας την περιφερική ευαισθησία στην ινσουλίνη (Yang WS et al, 2001, Berg AH et al, 2001, Combs TP et al, 2001). Οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας αντιπονεκτίνης είναι αντιστρόφως

ανάλογες του σωματικού λίπους (Yang WS et al, 2001, Misra M et al, 2007, Cambuli VM et al, 2008, Pannacciulli N et al, 2003, Pannacciulli N et al, 2006).

Η λεπτίνη αποτελεί ορμόνη κορεσμού και παρουσιάζει δράση αντίθετη με αυτή της γκρελίνης (Tolle V et al, 2003). Δρα συνεπώς μέσω καταστολής των νευρώνων NPY/AgRP και ενεργοποίησης των νευρώνων POMC, με σκοπό τη μείωση της πρόσληψης τροφής (Morton GJ et al, 2001). Επιπροσθέτως, φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας σε συνάρτηση με τη μεταβολική ενεργειακή διαθεσιμότητα (Evans JJ et al, 2012). Οι υποδοχείς λεπτίνης εντοπίζονται στον υποθάλαμο (Woods AJ et al, 1996, Bates SH et al, 2003), στην πρόσθια υπόφυση (Jin L et al, 2001), στις ωοθήκες (Karlsson C et al, 1997) και στο ενδομήτριο (Kitawaki J et al, 2000). Η περιφερική συγκέντρωση λεπτίνης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο. Μείωση της συγκέντρωσης λεπτίνης κατά 10% - 30% σε σχέση με τα βασικά επίπεδα έχει παρατηρηθεί 2-3 μέρες κατόπιν σημαντικής μείωσης της πρόσληψης θερμίδων, και πριν τη σημαντική απώλεια σωματικού λίπους και βάρους (Boden G et al, 1996, Chan JL et al, 2003). Επιπλέον, η μείωση του σωματικού βάρους οδηγεί σε μείωση των κυκλοφορούντων επιπέδων της λεπτίνης (Maffei M et al, 1995). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων λεπτίνης στον υποθάλαμο οδηγεί σε μεταβολή της έκφρασης υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων και συνεπώς σε μεταβολή της ενεργειακής ομοιόστασης (Woods AJ et al, 1996, Bates SH et al, 2003).

Τα χαμηλά επίπεδα λεπτίνης σηματοδοτούν την παρουσία ενεργειακής ανεπάρκειας στον υποθάλαμο (Ahima RS et al, 1996, Chan JL et al, 2003).

Επίσης, χαμηλά επίπεδα λεπτίνης παρατηρούνται σε περιπτώσεις ΛΥΑ σχετιζόμενης με έντονη σωματική άσκηση και ΝΑ (Corr M et al, 2011, Miller KK et al, 1998). Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει μια θετική συσχέτιση των συγκεντρώσεων της λεπτίνης με την έκκριση της LH (Ackerman KE et al, 2012). Με βάση τα ανωτέρω, φαίνεται ότι η συγκέντρωση της κυκλοφορούσας λεπτίνης λειτουργεί ως μεταβολικός παράγοντας, ο οποίος σηματοδοτεί την παρουσία ενεργειακής ανεπάρκειας στον υποθάλαμο. Το τελευταίο ενισχύεται από το γεγονός ότι η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης σε γυναίκες με ΛΥΑ οδηγεί σε αύξηση του αριθμού και μεγέθους των ωοθυλακίων, αλλά ταυτόχρονα και σε μείωση του σωματικού λίπους και βάρους λόγω της μειωμένης πρόσληψης τροφής (Chou SH et al, 2011). Συνεπώς, η χορήγηση εξωγενούς λεπτίνης λόγω της επίδρασής της στο σωματικό λίπος και βάρος δεν αποτελεί θεραπευτική επιλογή για τις γυναίκες με ΛΥΑ, λόγω του ήδη χαμηλού δείκτη μάζας σώματός τους.

Η αντιπυονεκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και της ενεργειακής ομοιόστασης (Rajala MW et al, 2003, Trayhurn P et al, 2005). Η αντιπυονεκτίνη μειώνει τα μετα-γευματικά επίπεδα των λιπαρών οξέων και γλυκόζης, ενώ τα μειωμένα επίπεδα αυτής σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση αθηροσκλήρωσης (Berg AH et al, 2002, Kawano T et al, 2005). Τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης είναι αυξημένα σε περιπτώσεις ΝΑ (Dostalova I et al, 2007), και μειωμένα σε σοβαρές περιπτώσεις της νόσου (Tagami T et al, 2004). Αντιθέτως, δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις αντιπυονεκτίνης μεταξύ ευμνηορροϊκών και αμνηορροϊκών

αθλητριών (Russell M et al, 2009). Σε νέες γυναίκες, ηλικίας 18 έως 35 ετών, η λογαριθμική συγκέντρωση αντιπυονεκτίνης του λιπώδους ιστού είναι σημαντικά υψηλότερη σε περιπτώσεις ΛΥΑ λόγω έντονης σωματικής άσκησης, σε σχέση με αυτή των ευμηνορροϊκών γυναικών (O'Donnell E et al, 2011).

Η επίδραση της αντιπυονεκτίνης στην έκκριση της GnRH έχει ερευνηθεί σε θήλεις επίμυες (Klenke U et al, 2014). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μειωμένη δραστηριότητα των νευρώνων GnRH (Klenke U et al, 2014), όπως και μειωμένη έκκριση της LH σε επίμυες με αυξημένα επίπεδα αντιπυονεκτίνης (Rodriguez-Pacheco F et al, 2007). Οι υποδοχείς αντιπυονεκτίνης εντοπίζονται επίσης σε περιφερικούς αναπαραγωγικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών και του ενδομητρίου (Caminos JE et al, 2005, Michalakis KG et al, 2010). Ωστόσο, ο ρόλος της αντιπυονεκτίνης στους περιφερικούς αναπαραγωγικούς ιστούς μένει να διερευνηθεί. Ο ρόλος της αντιπυονεκτίνης στις ωοθήκες ενδέχεται να περιλαμβάνει την ρύθμιση της στεροειδογένεσης στα κοκκιοκυτταρικά και κύτταρα θήκης (Chabrolle C et al, 2007, Chabrolle C et al, 2008, Chabrolle C et al, 2009, Lagaly DV et al, 2008, Ledoux S et al, 2006, Maillard V et al, 2010, Pierre P et al, 2009). Εκτός αυτού, η αντιπυονεκτίνη εμπλέκεται στην ενεργοποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, και ως εκ τούτου ενδέχεται να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα της οστικής πυκνότητας σε ασθενείς με ΛΥΑ στα πλαίσια ΝΑ και έντονης σωματικής άσκησης (Luo XH et al, 2005, Luo XH et al, 2006).

3.2.5.Αυξητική ορμόνη και ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας

Η GH και ο IGF-1 αποτελούν κομβικούς μεταβολικούς παράγοντες (Davidson MB, 1987, Casanueva FF, 1992, Angelin B et al, 1994, De Feo P, 1996), οι οποίοι αλληλοεπιδρούν με άλλες μεταβολικές και περιφερικές ορμόνες (Eckert ED et al, 1998, Davidson MB, 1987, Casanueva FF, 1992, De Feo P, 1996, Grinspoon S et al, 1996, Pombo M et al, 1999). Το ενεργειακό ισοζύγιο επηρεάζει την έκκριση των GH και IGF-1 στο επίπεδο της υπόφυσης (Postel-Vinay MC et al, 1995, Ross RJ et al, 1995, Thissen JP et al, 1994, Zapf J, 1995). Οι συγκεντρώσεις της GH είναι υψηλότερες σε έφηβες και νέες γυναίκες με ΝΑ και ΛΥΑ σχετιζόμενη με έντονη σωματική άσκηση, ενώ οι ασθενείς με το χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος παρουσίαζαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις GH (Stoving RK et al, 1999, Misra M et al, 2003). Οι Laughlin et al, παρατήρησαν αύξηση της συχνότητας έκκρισης της GH, με αυξημένη περιφερική συγκέντρωση μεταξύ των αιχμών, χωρίς μεταβολή, ωστόσο, του εύρους των εκκριτικών αιχμών αυτής σε αμηνorroϊκές αθλήτριες (Laughlin GA et al, 1996). Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες, όπου αυξημένη βασική συγκέντρωση και συχνότητα έκκρισης της GH βρέθηκε σε ασθενείς με ΝΑ (Stoving RK et al, 1999, Misra M et al, 2003). Η έκκριση της GH φαίνεται να επηρεάζεται επίσης από τη δράση της λεπτίνης, γκρελίνης και NPY (Nakazato M et al, 2001, Eckert ED et al, 1998, Grinspoon S et al, 1996, Pombo M et al, 1999, Asakawa A et al, 2001). Επομένως, η σημασία της ρύθμισης ενδοκρινολογικών και μεταβολικών παραγόντων από

τις τρεις αυτές ορμόνες σε συνάρτηση με το ενεργειακό ισοζύγιο είναι μεγάλη (Pombo M et al, 1999).

Η χρόνια ενεργειακή ανεπάρκεια μεταβάλλει την ενεργοποίηση και λειτουργία των υποδοχέων της GH (Baumann G et al, 1994), οδηγώντας σε σέ περιφερική αντίσταση στην GH, η οποία εξηγεί και τη μειωμένη σύνθεση IGF-1 (Ross RJ et al, 1995, Thissen JP et al, 1994, Stoving RK et al, 1999, Misra M et al, 2003, Counts DR et al, 1992, Hochberg Z et al, 1992). Η μειωμένη περιφερική συγκέντρωση του IGF-1 οφείλεται στη μειωμένη ηπατική παραγωγή, λόγω της ενεργειακής ανεπάρκειας και της συνακόλουθης περιφερικής αντίστασης στην GH (Ross RJ et al, 1995, Thissen JP et al, 1994, Stoving RK et al, 1999, Ho KY et al, 1988, Stoving RK et al, 1999). Τα χαμηλά επίπεδα IGF-1 σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση γκρελίνης διεγείρουν την έκκριση GH (Misra M et al, 2003), ενώ η εξωγενής χορήγηση GH, ακόμα και για 12 εβδομάδες, δεν δύναται να αυξήσει τη συγκέντρωση του IGF-1 (Fazeli PK et al, 2010). Αυτές οι μεταβολές στην έκκριση του IGF-1 υποδηλώνουν αντίσταση στην GH σχετιζόμενη με το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (Fazeli PK et al, 2010). Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις ΛΥΑ, η αυξημένη έκκριση της GH σχετίζεται με την ανάγκη διατήρησης της ευγλυκαιμίας, παρά τη μειωμένη πρόσληψη θερμίδων (Misra M et al, 2014). Η GH συμβάλλει στη γλυκονεογένεση μέσω λιπόλυσης (Fazeli PK et al, 2014, Zhao TJ et al, 2010). Η επίδραση της GH στη διαδικασία της λιπόλυσης δεν ρυθμίζεται από τον IGF-1 και συνεπώς συμβάλλει στη διατήρηση της ευγλυκαιμίας σε ασθενείς με ΛΥΑ (Fazeli PK et al, 2014, Zhao TJ et al, 2010).

Η GH φαίνεται ότι επηρεάζει την αναπαραγωγική λειτουργία μέσω άμεσης και έμμεσης δράσης στο επίπεδο του υποθαλάμου, αλλά και της πρόσθιας υπόφυσης και των ωοθηκών, τροποποιώντας την δράση της GnRH και των γοναδοτροπινών (Hull KL et al, 2014). Τα γοναδοτρόπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης εκφράζουν υποδοχείς GH και η έκκριση των FSH/LH έχει παρατηρηθεί μειωμένη σε επίμυες με περιφερική αντίσταση στην GH (Hull KL et al, 2002). Στο επίπεδο των ωοθηκών, η GH φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκκρισης E2 και P4 στα κοκκιοκύτταρα και κύτταρα θήκης αντιστοίχως, και αυτή η δράση ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο του εμμηνορυσιακού κύκλου (Gregoraszczuk EL et al, 2005, Doldi N et al, 1996, Gregoraszczuk EL et al, 2004, Karamouti M et al, 2008, Sirotkin AV et al, 1996, Sirotkin AV et al, 2000). Επίσης, η GH είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και επιβίωση των ωοθυλακίων (Bachelot A et al, 2002, Slot KA et al, 2006). Τέλος, τα ωοθυλάκια εκφράζουν υποδοχείς IGF-1 (Zhou J et al, 1991, Zhou J et al, 1993), ενώ ο IGF-1 φαίνεται να ενισχύει την δράση των γοναδοτροπινών στη στεροειδογένεση (Veldhuis JD et al, 1987, Akashi EY et al, 1988, McArdle CA et al, 1991, Poretsky L et al, 1996).

3.3. Λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια σχετιζόμενη με το στρες

3.3.1. Παθογένεση της λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας σχετιζόμενης με το στρες

Το χαρακτηριστικό βιοχημικό στοιχείο το οποίο συσχετίζει το στρες στην αιτιοπαθογένεια της ΛΥΑ είναι τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σε γυναίκες με ΙΥΥ χωρίς την παρουσία κάποιου οργανικού αιτίου σε σχέση με ευμηνορροϊκές γυναίκες (Berga SL et al, 1989). Αντιστρόφως ανάλογη σχέση έχει παρατηρηθεί μεταξύ του βαθμού διαταραχής της εμμήνου ρύσεως και των επιπέδων κορτιζόλης σε αθλήτριες (Loucks AB et al, 1989). Ενώ, οι ευμηνορροϊκές αθλήτριες παρουσιάζουν χαμηλότερη συχνότητα εκκριτικών ώσεων της LH, χαμηλότερα επίπεδα P4 και υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης σε σχέση με άλλες ευμηνορροϊκές γυναίκες (Loucks AB et al, 1989). Τέλος, οι αμηνορροϊκές αθλήτριες παρουσιάζουν εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα έκκρισης της LH και πολύ υψηλά επίπεδα κορτιζόλης σε σχέση με τις ευμηνορροϊκές γυναίκες (Loucks AB et al, 1989; Berga SL et al, 1989).

Οι γυναίκες με ΛΥΑ σχετιζόμενη με το στρες παρουσιάζουν διάφορες νευροενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές σε συνάρτηση με την ενεργοποίηση του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' και την καταστολή του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες', το οποίο αντανakλά τη νευροανατομική και νευροφυσιολογική αλληλεπίδραση των νευρονικών δικτύων που συγχρονίζουν την υποθαλαμική λειτουργία (Berga SL et al, 1988; Berga SL et al, 1989). Σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης, οι γυναίκες με ΛΥΑ σχετιζόμενη με το στρες παρουσιάζουν και υποθαλαμικό

υποθυρεοειδισμό με διατήρηση των επιπέδων της TSH παρά τα μειωμένα επίπεδα της T3 και T4. Επίσης, όπως αναφέρθηκε, μεταβολές στην έκκριση της GH, PRL και μελατονίνης είναι επίσης παρούσες. Οι ανωτέρω μεταβολές αντανakλούν μεταβολές στους μηχανισμούς παλίνδρομης ρύθμισης του υποθαλάμου από την E2, κορτιζόλη και T4 (Berga SL et al, 1988; Berga SL et al, 1989).

Η αύξηση του σωματικού βάρους σε ασθενείς με ΛΥΑ σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων λεπτίνης και μείωση αυτών της κορτιζόλης (Michopoulos V et al, 2013). Τα επίπεδα της CRH (Cortisol Releasing Hormone – Εκλυτική ορμόνη της φλοιοτρόπου ορμόνης) είναι αυξημένα κατά 30% στο περιφερικό αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό γυναικών με ΛΥΑ, σε αντίθεση με αυτά γυναικών με αμηνόρροια άλλης αιτιοπαθογένειας (Berga SL et al, 1997; Brundu B et al, 2006). Η παρουσία υψηλών επιπέδων CRH σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης αντανakλά την απουσία αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης του άξονα ‘υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια από την κορτιζόλη, ως αποτέλεσμα του χρόνιου στρες. Συνεπώς, η ΛΥΑ δεν αποτελεί απλά μια μεμονωμένη καταστολή του άξονα ‘υποθάλαμου-υπόφυση-ωοθήκες’, αλλά χαρακτηρίζεται από ποικίλες νευροενδοκρινικές μεταβολές, οι οποίες επηρεάζουν τις νευροδιαβιβάσεις στο επίπεδο του υποθαλάμου με σκοπό την ανάπτυξη μιας αλλοστατικής κατάστασης (Berga SL et al, 1989).

Στην παθοφυσιολογία της ΛΥΑ από στρες, φαίνεται να εμπλέκονται και ντοπαμινεργικοί και οποιοιδήποτε νευροδιαβιβαστές. Συγκεκριμένα, η χορήγηση ναλοξόνης, η οποία αποτελεί αναστολέα των οποιοειδών, οδηγεί σε αύξηση

των εκκριτικών ώσεων της LH, σε σημαντικό αριθμό γυναικών με αμηνόρροια σχετιζόμενη με το στρες (Wildt L et al, 1987). Αντιστοίχως, η χορήγηση μετροκλοπραμίδης, ενός αναστολέα του υποδοχέα της ντοπαμίνης, αύξησε τη συχνότητα έκκρισης της LH σε ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (Berga SL et al, 1991). Ως εκ των ανωτέρω, φαίνεται ότι σε ασθενείς με αμηνόρροια σχετιζόμενη με το στρες, υπάρχει ποικίλου βαθμού ντοπαμινεργική ή/και οποιοσδήποτε καταστολή της έκκρισης της GnRH.

Επιπροσθέτως, κεντρικώς δρώντες σεροτονικοί νευροδιαβιβαστές, φαίνεται να συμβάλλουν στην έναρξη και διατήρηση της ΛΥΑ. Η χορήγηση μη εκλεκτικών αγωνιστών της σεροτονίνης, όπως η φενφλουραμίνη, σε πύθους με υψηλά επίπεδα στρες οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης, χωρίς ιδιαίτερες μεταβολές στα επίπεδα PRL, υποδηλώνοντας έτσι μειωμένο σεροτονικό τόνο στους πύθους με αυξημένη ευαισθησία στο στρες σε σχέση με εκείνους με ανθεκτικότητα (Bethea CL et al, 2005). Επίσης, οι σεροτονικοί νευρώνες, οι οποίοι εκφράζουν υποδοχείς λεπτίνης, απολήγουν στους GnRH νευρώνες. Η σεροτονίνη φαίνεται να επιδρά στο αίσθημα κορεσμού με παρόμοιο τρόπο με την λεπτίνη, και ίσως να ρυθμίζει σε κάποιο βαθμό την ανταπόκριση του οργανισμού σε ορεξιγενή και ανορεξιγενή ερεθίσματα. Η χορήγηση λεπτίνης ή φλουοξετίνης— ενός εκλεκτικού αναστολέα της επαναπρόσληψης σεροτονίνης — συνέβαλαν στην πρόληψη διαταραχών του κύκλου σε επίμυες σε νηστεία, σε αντίθεση με τη χορήγηση μετεργολίνης (ανταγωνιστής του υποδοχέα της σεροτονίνης) (Sullivan SD et al, 2002).

Ο ρόλος του σεροτονικού συστήματος στη ρύθμιση του άξονα 'υποθάλαμος- υπόφυση-επινεφρίδια' μέσω της παλίνδρομης δράσης της κορτιζόλης σε καταστάσεις στρες έχει επίσης διερευνηθεί. Η πρωτεΐνη SERT (serotonin reuptake transporter) είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της σεροτονίνης από τη συναπτική σχισμή στο νεύρο στόχο. Ο μεταφορέας αυτός δρα ως ένας ρυθμιστής των επιπέδων σεροτονίνης, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο SERT (μακρά και σύντομη μορφή) έχουνδειχθεί να διαταράσσουν την πρόσληψη σεροτονίνης. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της SERT φαίνεται επίσης να σχετίζονται με τη ρύθμιση του βαθμού επίδρασης των στρεσογόνων γεγονότων στην ανάπτυξη κατάθλιψης (Scholz CJ et al, 2014). Πίθηκοι με αυξημένα επίπεδα στρες βρέθηκε να παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του mRNA της SERT και της MAO-A (monoamine oxidase A - μονοαμινική οξειδάση A) σε σχέση με φυσιολογικούς πιθήκους, ενώ δεν βρέθηκε διαφορά στα επίπεδα του mRNA του υποδοχέα 1A της σεροτονίνης και στα επίπεδα της MAO-B (monoamine oxidase B - μονοαμινική οξειδάση B) (Jarrell H et al, 2008).

Η χορήγηση αλπραζολάμης, ενός αγωνιστή του GABA υποδοχέα, φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα κορτιζόλης και να αυξάνει την συχνότητα έκκρισης της LH από 0.8 σε 2.0 ώσεις/ 8 ώρες σε γυναίκες με ΛΥΑ σχετιζόμενη με το στρες (Judd SJ et al, 1995). Τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν τον ρόλο των GABA νευρώνων στη νευρορύθμιση της έκκρισης της GnRH σε ασθενείς με ΛΥΑ. Με βάση τα ευρήματα αυτά, φαίνεται ότι η νευροχημεία της ΛΥΑ λόγω

στρες είναι πολύπλοκη με ποικίλλους μηχανισμούς να εμπλέκονται στη παθοφυσιολογία της.

3.3.2. Η επίδραση των στρεσογόνων παραγόντων στην αναπαραγωγική λειτουργία

Ποικίλες συμπεριφορές και άλλοι ψυχογενείς παράγοντες, όπως η έντονη σωματική άσκηση, η μεγάλη απώλεια σωματικού βάρους, οι διατροφικές διαταραχές, τα χαρακτηριστικά προσωπικότητας, ενδογενείς και εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες σχετίζονται με τη ΛΥΑ. Συνήθως, πρόκειται για πολλαπλούς στρεσογόνους παράγοντες όπως για παράδειγμα συνδυασμός εργασιακού ή ακαδημαϊκού στρες, διαιτητικών διαταραχών και αυξημένης κατανάλωσης ενέργειας (Giles DE et al, 1993; Marcus MD et al, 2001; Berga SL et al, 1989). Η ΛΥΑ σχετίζεται μια διαταραγμένη ψυχολογική ισορροπία, όπως αποδεικνύεται μέσω ερωτηματολογίων, τα οποία αφορούν μη ρεαλιστικές προσδοκίες και μη λειτουργικές συμπεριφορές (Berga SL, 1997). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΛΥΑ συχνά παρουσιάζουν τελειομανία και ανάγκη για κοινωνική αποδοχή (Giles DE et al, 1993) με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια εσωτερική στρεσογόνος κατάσταση, για την οποία η ασθενής δεν διαθέτει τις απαραίτητες ικανότητες προσαρμογής και επίλυσης (Berga SL et al, 2007). Επιπλέον, ένας αριθμός γυναικών με ΛΥΑ παρουσιάζει

δυσκολία να χαλαρώσει και να διασκεδάσει, το οποίο ενδέχεται να σχετίζεται με την τελειομανία και την υψηλή απόδοση και να συμβάλλει στην ενίσχυση της εσωτερικής στρεσογόνου κατάσταση της ασθενούς (Berga SL et al, 2007). Συχνά οι ασθενείς με ΛΥΑ παρουσιάζουν διαταραγμένες διαιτητικές συμπεριφορές απότοκες της ανάγκης για καλλίγραμμη εικόνα, για αισθητικούς λόγους αλλά και λόγω επιταγών αθλητικής δραστηριότητας. Αυτό που διαχωρίζει τις ασθενείς με ΛΥΑ από εκείνες με διατροφικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης και της ΝΑ, είναι ο βαθμός της διαταραχής, συμπεριλαμβανομένου του περιορισμού της τροφής, της βουλιμίας, της απώλειας σωματικού βάρους και της τελομανείας. Το κλειδί για την αναστροφή της ΛΥΑ αποτελεί η άρση των δυσλειτουργικών συμπεριφορών, οι οποίες προκαλούν και συντηρούν την διαταραχή του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες'. Γενικά, στη παθοφυσιολογία της ΛΥΑ συνήθως ενέχονται πολλαπλοί ελάσσονες ψυχογενείς και μεταβολικοί στρεσογόνοι παράγοντες (Williams NI et al, 2007). Συνεπώς, χρειάζεται ένα εύλογο χρονικό διάστημα για την αποκατάσταση του ενεργειακού ισοζυγίου και της ψυχολογικής ισορροπίας και συνεπώς της υποθαλαμικής αλλόστασης και ωοθηκικής λειτουργίας (Berga SL et al, 2013; Michopoulos V et al, 2013).

3.3.3. Διατροφικές διαταραχές

Οι διαταραχές λήψης τροφής περιλαμβάνουν την Νευρογενή Ανορεξία – ΝΑ (Anorexia Nervosa), την Νευρογενή Βουλιμία (Bulimia Nervosa), το σύνδρομο ανεξέλεγκτης υπερφαγίας (Binge Eating Disorder) και διάφορες άλλες αποκλίσεις της διατροφικής συμπεριφοράς περισσότερο ή λιγότερο προσδιορισμένες.

- **Νευρογενής Ανορεξία (ΝΑ)**

Η ΝΑ συνίσταται στην προσπάθεια διατήρησης απόλυτου ελέγχου όσον αφορά την πρόσληψη τροφής και στην υπερβολική μείωση του σωματικού βάρους, υποκινούμενη από μια άνευ όρων αναζήτηση της κομψότητας. Διακρίνονται δύο τύποι ΝΑ:

➤ Περιοριστικός τύπος (restrictive type): Κατά τη διάρκεια του τρέχοντος επεισοδίου ΝΑ το άτομο δεν έχει τακτικά επεισόδια αδηφαγίας ή συμπεριφορές κάθαρσης (αυτοπροκαλούμενοι έμετοι ή χρήση καθαρτικών, υποκλυσμών ή διουρητικών).

➤ Αδηφαγικός/Καθαρτικός τύπος (binge eating/purging type): Κατά τη διάρκεια του τρέχοντος επεισοδίου ΝΑ το άτομο έχει τακτικά επεισόδια αδηφαγίας ή καταφεύγει τακτικά σε συμπεριφορές κάθαρσης (αυτοπροκαλούμενοι έμετοι ή χρήση καθαρτικών, υποκλυσμών ή διουρητικών).

Διαγνωστικά κριτήρια ΝΑ (DSM-V, American Psychiatric Association, 2013):

- Άρνηση διατήρησης του σωματικού βάρους στο επίπεδο ή πάνω από το επίπεδο του ελάχιστα φυσιολογικού για το ύψος και την ηλικία του.
- Έντονος φόβος αύξησης του σωματικού βάρους παρόλο που το άτομο είναι λιποβαρές.
- Διαταραγμένη εικόνα σώματος και επίμονη άρνηση πρόσληψης τροφής.

- ***Νευρογενής Βουλιμία***

Η νευρογενής βουλιμία χαρακτηρίζεται από συχνά εκδηλούμενα αδηφαγικά επεισόδια τα οποία ακολουθούνται από αντισταθμιστικές συμπεριφορές με προεξέχουσα αυτής της πρόκλησης έμετου, με σκοπό την αποφυγή της αύξησης του σωματικού βάρους. Διακρίνονται δύο τύποι νευρογενούς βουλιμίας:

- **Καθαρτικός τύπος:** Κατά τη διάρκεια του τρέχοντος επεισοδίου νευρογενούς βουλιμίας, το άτομο καταφεύγει τακτικά σε αυτοπροκαλούμενους έμετους ή σε κακή χρήση καθαρτικών, διουρητικών ή υποκλυσμών.
- **Μη καθαρτικός τύπος:** Κατά τη διάρκεια του τρέχοντος επεισοδίου νευρογενούς βουλιμίας, το άτομο έχει χρησιμοποιήσει άλλες απρόσφορες αντισταθμιστικές συμπεριφορές, όπως η νηστεία ή η υπερβολική σωματική άσκηση, αλλά δεν καταφεύγει σε αυτοπροκαλούμενους έμετους ή σε καθαρτικών, διουρητικών ή υποκλυσμών.

Διαγνωστικά κριτήρια νευρογενούς βουλιμίας (DSM-V, American Psychiatric Association, 2013):

- Επαναλαμβανόμενα επεισόδια αδηφαγίας
- Επανειλημμένη απρόσφορη αντισταθμιστική συμπεριφορά
- Επεισόδια αδηφαγίας σε συνδυασμό με αντισταθμιστική συμπεριφορά λαμβάνει χώρα για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα για 3 μήνες)
- Η εικόνα σώματος και το βάρος επηρεάζουν υπέρμετρα την αυτοεκτίμηση
- Η διαταραχή δεν εμφανίζεται αποκλειστικά στα πλαίσια περιστατικού νευρογενούς ανορεξίας.

4. Γενετικό υπόβαθρο λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας

Ο ΙΥΥ οδηγεί σε καθυστέρηση ήβης. Η συνοδός παρουσία υποσμίας ή ανοσμίας, χαρακτηρίζει το σύνδρομο Kallman, το οποίο σχετίζεται με την ανεπαρκή ή απύουσα εμβρυονική μετανάστευση των GnRH νευρώνων. Ο ΙΥΥ χαρακτηρίζεται από γενετική ετερογένεια και σχετίζεται με μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την ανάπτυξη των GnRH νευρώνων καθώς επίσης και για την ορθή έκκριση και λειτουργία

της GnRH (Boehm U et al, 2015). Η κλινική ετερογένεια που παρατηρείται στις περιπτώσεις ΙΥΥ αντανakλά την πιθανή εμπλοκή πολλαπλών γονιδιακών μεταλλάξεων ή και την επίδραση διαφόρων επιγενετικών παραγόντων (Boehm U et al, 2015).

Η κατανόηση της γενετικής βάσης του ΙΥΥ έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία 20 χρόνια, μετά την ανακάλυψη της συσχέτισης του συνδρόμου Kallmann με μεταλλάξεις του γονιδίου KAL1 (Franco B et al, 1991). Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 25 γονίδια έχουν συσχετιστεί με την παθογένεση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann: KAL1, FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), FGF8, CHD7, HS6ST1 (heparan-sulphate 6-O-sulphotransferase 1), SOX10, SEMA3A (semaphoring-3A), WDR11 (WD repeat-containing protein 11), IL17RD (interleukin-17 receptor D), PROK2/PROKR2, FEZF1, GNRH, GNRHR, KISS1/KISS1R, TAC3/TAC3R (Boehm U et al, 2015).

Η ανοσμήνη-1, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο KAL1 επιδρά στη μετανάστευση των GnRH κυττάρων και τον τρόπο δράσης της μέσω δέσμευσης στην επιφάνεια των νευρικών κυττάρων με τις πρωτεογλυκάνες HSPG (heparin sulphate proteoglycans) (Cariboni A et al, 2004). Η μεταλλαγμένη ανοσμήνη-1 χάνει τις χημειοτακτικές της ιδιότητες και τον έλεγχο της μετανάστευσης των νευρικών κυττάρων (Cariboni A et al, 2004).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου KAL1 αφορούν στο 6-10% περίπου του συνόλου των ασθενών με σύνδρομο Kallmann, ενώ αναγνωρίζονται μόνο στο 5-6% των σποραδικών περιστατικών του συνδρόμου Kallmann και στο 2-4% του συνόλου των περιστατικών ΙΥΥ. Ωστόσο στις περιπτώσεις φυλοσύνδετης

κληρονομικότητας, το 50% των μεταλλάξεων αφορούν στο γονίδιο KAL1 (Oliveira LM et al, 2001, Bhagavath B et al, 2007, Georgopoulos NA et al, 1997). Τα είδη των μεταλλάξεων, που έχουν περιγραφεί, αφορούν σε σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης, προσθήκης ή έλλειψης βάσης και σε ελλείψεις εξονίων, έλλειψη ολόκληρου του γονιδίου KAL1 ή και ταυτόχρονες ελλείψεις του KAL1 και γειτονικών στο KAL1 γονιδίων (contiguous gene syndrome) (Oliveira LM et al, 2001, Legouis R et al, 1991, Pedersen-White JR et al, 2008, Zhang S et al, 2011).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) οι οποίες κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα, ευθύνονται για άλλο ένα 10% των περιστατικών συνδρόμου Kallmann (Dode C et al, 2003, Bianco SD et al, 2009). Το γονίδιο του FGFR1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 8 και αποτελείται από 18 εξόνια. Ο FGFR1 είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, η οποία αποτελείται από τους FGFR1-4 (Dode C et al, 2003, Bianco SD et al, 2009). Οι συνδέτες των FGFRs είναι 22 διαφορετικοί FGFs μέσω των οποίων επιτελούνται πολλαπλοί ρόλοι, όπως η διαφοροποίηση ιστών και οργάνων κατά την εμβρυογένεση. Ο FGFR1 είναι απαραίτητος παράγοντας για το σχηματισμό των οσφρητικών βολβών, όπως αποδείχθηκε σε πειραματική μελέτη σε επίμυες (Hebert JM et al, 2003). Η προαναφερθείσα μελέτη επεσήμανε επιπλέον τη σπουδαιότητα της επίδρασης του παράγοντα FGF8, μέσω της σύνδεσής του με τον FGFR1, στην καθοδήγηση των νευρώνων κατά την προσθιοπίσθια ανάπτυξη του

εγκεφάλου και στη δημιουργία των οσφρητικών βολβών σε έμβρυα επίμυων (Hebert JM et al, 2003).

Το γονίδιο HS6ST1 (heparin sulfate 6-O- sulfotranferase 1) κωδικοποιεί ένα ένζυμο το οποίο τροποποιεί ομάδες σακχάρων θειικής ηπαράνης, μιας πρωτεΐνης του εξωκυττάριου στρώματος. Μεταλλάξεις του HS6ST1 οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με σύνδρομο Kallmann, επιβεβαιώθηκε πειραματικά ότι μειώνουν τη δραστικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου σε πειραματόζωα. Το γεγονός αυτό φαίνεται να επηρεάζει, την μέσω των πρωτεογλυκανών αλληλεπίδραση, της ανοσμίνης-1 με τους FGFR/FGF HSPGs, με αποτέλεσμα διαταραχή της δράσης τους, στους ιστούς όπου εκφράζονται (Tornberg J et al, 2011).

Ανεξάρτητα του είδους της γενετικής μετάλλαξης, η οποία οδηγεί στο σύνδρομο Kallmann, παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια στους φαινότυπους των ασθενών, ακόμη και μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας, γεγονός το οποίο μαρτυρά επίδραση και άλλων παραγόντων, επιγενετικών ρυθμίσεων και τροποποιητικών γονιδίων στη διεισδυτικότητα και την έκφραση του συνδρόμου. Τα παραπάνω ενισχύονται από το γεγονός ότι μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί γονίδια στα οποία οφείλεται μόνο το 30% των περιστατικών της νόσου, καθώς και περιπτώσεις ασθενών στους οποίους έχουν αναγνωριστεί ταυτόχρονα περισσότερα του ενός μεταλλαγμένα γονίδια (Dode C et al, 2009, Bonomi M et al, 2012, Pitteloud N et al, 2007). Διαφορετική διεισδυτικότητα και έκφραση της ίδιας γενετικής βλάβης έχει περιγραφεί σε πληθώρα οικογενών περιστατικών της νόσου, τόσο σε

περιπτώσεις φυλοσύνδετης, όσο και αυτοσωματικής κληρονόμησης, με διαβαθμίσεις στη σοβαρότητα του υπογοναδισμού και στην εμφάνιση των συνοδών ανωμαλιών (Dode C et al, 2009, Bonomi M et al, 2012, Pitteloud N et al, 2007). Τα τελευταία χρόνια εξετάστηκε το ενδεχόμενο το σύνδρομο Kallmann και ο ΙΥΥ να μην ακολουθούν την απλή μορφή κληρονομικότητας κατά Mendel, αλλά να παρουσιάζουν διγονιδιακά ή ολιγογονιδιακά χαρακτηριστικά κληρονομικότητας (Quaynor SD et al, 2011).

Ενώ η γενετική βάση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann έχει διερευνηθεί και αποσαφηνιστεί σε σημαντικό βαθμό, δεν ισχύει το ίδιο και στην περίπτωση της ΛΥΑ. Οι Caronia et al, υπέθεσαν ότι τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann ενδέχεται να διαδραματίζουν επίσης σημαντικό προδιαθεσικό ρόλο στις γυναίκες με ΛΥΑ (Caronia LM et al, 2011). Ανέλυσαν τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες των εξονίων και τις εγγύς αλληλουχίες εσωνίων σε επτά γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann: KAL1, GNRHR, GPR54, FGFR1, FGF8, PROK2 και PROKR2. Η ανωτέρω μελέτη συμπεριέλαβε 55 ασθενείς με ΛΥΑ, 160 ασθενείς με ΙΥΥ και 422 γυναίκες με φυσιολογική έμμηνο ρύση. Τα ευρήματα συμπεριέλαβαν έξι ετερογενείς μεταλλάξεις σε επτά απο τις πενήντα πέντε ασθενείς με ΛΥΑ, που αφορούσαν τα γονίδια: FGFR1 (G260E, R756H), PROKR2 (R85H, L173R), GNRHR (R262Q) και KAL1 (V371I). Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν in vitro μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι αποτελούσαν απενεργοποιητικές μεταλλάξεις (loss-of-function mutations). Μεταλλάξεις ανερεύθηκαν επίσης σε οκτώ απο τις

160 ασθενείς με ΙΥΥ που αφορούσαν τα γονίδια PROKR2 και GNRHR. Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στις γυναίκες με φυσιολογική έμμηνο ρύση. Η ανεύρεση των ανωτέρω μεταλλάξεων οδηγεί στην υπόθεση της εξελικτικής επίδρασης των γονιδίων αυτών με την καταστολή της αναπαραγωγής σε δυσμενείς περιόδους.

4.1. Το γονίδιο PROKR2

Ο υποδοχέας 2 της προκινετισίνης (PROKR2) κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο του χρωμοσώματος 20. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην οικογένεια των G-πρωτεϊνών και εκφράζεται σε ιστούς, όπως οι όρχεις και το κεντρικό νευρικό σύστημα, με την υψηλότερη συγκέντρωση του να ανευρίσκεται στο εμβρυικό εγκέφαλο (Lin DC et al, 2002, Soga T et al, 2002). Η προκινετισίνη 2 και ο υποδοχέας της διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση και την επιβίωση των GnRH νευρώνων, καθώς και στη λειτουργική σύνδεση του άξονα της αναπαραγωγής με υποθαλαμικά κέντρα που καθορίζουν τους ορμονικούς ρυθμούς με βάση τους κύκλους φωτός και σκότους (Lin DC et al, 2002, Soga T et al, 2002). Τα mRNAs υποδοχέων PROKR1 και PROKR2 εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην οσφρητική ταινία και την υπερκοιλιακή ζώνη (SVZ). Η έκφραση του PROKR1

έχει παρατηρηθεί σε αυτές τις περιοχές, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με αυτή του PROKR2 (Ng et al, 2005). Αντιθέτως, PROK1 mRNAs δεν ανιχνεύονται στις ανωτέρω περιοχές του εγκεφάλου (Ng et al, 2005).

Οι Matsumoto et al, εντόπισαν τον υποδοχέα PROKR2 στους οσφρητικούς λοβούς επίμυων και μελέτησαν το αποτέλεσμα της έλλειψης του γονιδίου του πειραματικά. Οι επίμυες στους οποίους το γονίδιο δεν εκφραζόταν παρουσίαζαν ατροφία των γεννητικών οργάνων και των οσφρητικών λοβών, καθώς και έλλειψη των GnRH νευρώνων στον υποθάλαμο (Matsumoto S et al, 2006).

Οι Dode et al, υποθέτοντας ότι το γονίδιο του PROKR2 καθώς και του συνδέτη του PROK2, μπορούν να αποτελούν υποψήφια γονίδια για το σύνδρομο Kallmann, προχώρησαν σε ανάλυση της ακολουθίας των εξονίων σε 192 ασθενείς με σύνδρομο Kallmann και ανακάλυψαν την ύπαρξη 10 διαφορετικών μεταλλάξεων. Οι ασθενείς οι οποίοι έφεραν αυτές τις μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια, παρουσίαζαν ανωμαλίες στο οσφρητικό και αναπαραγωγικό σύστημα (Dode C et al, 2006).

Συνολικά, έως σήμερα είναι γνωστές 24 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2, οι οποίες οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργίας του υποδοχέα της προκινετρίνης 2 (Code C et al, 2006, Cole LW et al, 2008, Chan YM et al, 2009, Abreu AP et al, 2010, Sarfati J et al, 2010) σε ασθενείς με σύνδρομο Kallmann και ΙΥΥ. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών σχετίζεται με διαταραχή της ενδοκυττάριας απελευθέρωσης ασβεστίου κατόπιν συνδέσεως του υποδοχέα με την προκινετρίνη-2, διαταραχή της σύνδεσης αυτής καθ'

αυτής ή με απουσία έκφρασης του υποδοχέα (Cole LW et al, 2008, Abreu AP et al, 2012, Raivio T et al, 2012).

Ασθενείς με μεταλλάξεις στο ζεύγος υποδοχέα-συνδέτη PROK2-PROKR2, παρουσιάζουν επίσης φαινοτυπική ετερογένεια και εμφανίζουν ασυνήθη χαρακτηριστικά σε σχέση με αυτά των προαναφερόμενων μεταλλάξεων. Έτσι οι ασθενείς αυτοί είτε δεν εμφανίζουν σημεία υπογοναδισμού είτε παρουσιάζουν υπογοναδισμό, ανοσμία, παχυσαρκία και διαταραχές του ύπνου. Μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε 55 ασθενείς με μεταλλάξεις των γονιδίων PROK2 ή PROKR2 έδειξε ότι οι ασθενείς με διγονιδιακές μεταλλάξεις εμφάνιζαν σοβαρού βαθμού υπογοναδισμό σε σύγκριση με αυτούς με μονογονιδιακές μεταλλάξεις. Επιπλέον χαρακτηριστικά τα οποία αναφέρονται είναι: διαταραχές των οδόντων, ανωμαλίες της υπερώας, βλεφαρόπτωση, νυσταγμός, κώφωση, διαταραχές των δακτύλων, συνκνησία των άκρων, κατάθλιψη και καρδιακές ανωμαλίες (Sarfati J et al, 2010).

5. Επιπτώσεις λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας

5.1. Αναπαραγωγή

Οι νευροενδοκρινικές διαταραχές της ΛΥΑ σχετίζονται με βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπλοκές της αναπαραγωγικής υγείας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαταραχή του άξονα 'υποθάλαμου-υπόφυσης-ωοθήκες' οδηγεί

σε ανωοθυλακιορρηξία και υπο-οιστρογοναιμία. Η απουσία των κυκλικών μεταβολών στα επίπεδα της E2 και της P4, οδηγεί σε διαταραχή των φυσιολογικών κυκλικών μεταβολών του ενδομητρίου, το οποίο βρίσκεται επί μακρώ στην παραγωγική φάση. Οι διαταραχή της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH, οδηγεί σε διαταραγμένη έκκριση των γοναδοτροπινών και ακολούθως σε υπο-οιστρογοναιμία και ανωοθυλακιορρηξία (Hind K et al, 2008). Σε περίπτωση που οι διαταραχές αυτές εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της εφηβείας, οι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως πρωτοπαθή αμηνόρροια. Αντιθέτως, εκδηλώνονται ως δευτεροπαθή αμηνόρροια σε μετεφηβικές γυναίκες.

Λόγω της υποκείμενης υπο-οιστρογοναιμίας, οι γυναίκες που πάσχουν από ΛΥΑ είναι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αδύνατο να επιτύχουν αυτόματη σύλληψη (Juul A et al, 2012). Επιπροσθέτως, ένα σημαντικό ζήτημα είναι το κατά πόσο η μακροχρόνια αθεράπευτη ΛΥΑ επηρεάζει την αναπαραγωγική υγεία σε βάθος χρόνου (Juul A et al, 2012). Η καθυστερημένη εμμηναρχή και η καθυστέρηση στην ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου αποτελούν σημαντικά εμπόδια στην αναπαραγωγική υγεία των γυναικών, οι οποίες ανέπτυξαν ΛΥΑ κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Τέλος, σε ενήλικες πάσχουσες, είναι πιθανή η ανάπτυξη ατροφικών αλλαγών στους ουρογεννητικούς βλεννογόνους και στο μυομήτριο (Juul A et al, 2012).

Γυναίκες με ΛΥΑ ή με ιστορικό της διαταραχής, οι οποίες επιτυγχάνουν κύηση, είτε αυτόματα είτε με την βοήθεια τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, απαιτούν αυξημένη παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της κύησης λόγω της

αυξημένης πιθανότητας αποβολής ή πρόωρου τοκετού (Easter A et al, 2001). Επίσης, η πιθανότητα περι-γεννητικών και μαιευτικών επιπλοκών φαίνεται να είναι αυξημένη σε σχέση με αυτή του γενικού πληθυσμού, και κυρίως εκείνη της υπολειπόμενης ανάπτυξης του εμβρύου (Becker AE et al, 1999).

5.2. Οστικός μεταβολισμός

Η ΛΥΑ, μέσω της υπο-οιστρογοναιμίας που χαρακτηρίζει τις ασθενείς, ασκεί αρνητική επίδραση στο μυοσκελετικό σύστημα, καθώς σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αδυναμία επίτευξης κορυφαίας οστικής μάζας (Juul A et al, 2012). Η πλειοψηφία των ατόμων φτάνει στη κορυφαία οστική μάζα μέχρι την ηλικία των 30 ετών, ωστόσο περίπου το 40%-50% αυτής σχηματίζεται κατά την περίοδο της εφηβείας (Juul A et al, 2012). Ορμονικοί, διατροφικοί και γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην διαδικασία επίτευξης της (Seeman E et al, 2002). Τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, η αυξητική GH και ο IGF-1 αποτελούν τις σημαντικότερες ορμόνες, οι οποίες ασκούν θετική επίδραση στην επίτευξη κορυφαίας οστικής μάζας (Seeman E et al, 2002). Σε νέες γυναίκες τα οιστρογόνα διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στον οστικό μεταβολισμό (Meczekalski B et al, 2010). Η δράση αυτή επιτελείται σε δύο κατευθύνσεις: ενεργοποίηση της οστικής δόμησης και καταστολή της οστικής λύσης (Khosla S et al, 2012).

Τα οιστρογόνα ενεργοποιούν τους κύριους παράγοντες οστικής δόμησης συμπεριλαμβανομένων του IGF-1, του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα-β (transforming growth factor beta, TGF-β) και της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης-6 (bone morphogenetic protein 6, BMP-6) (Taes Y et al, 2009). Σχετίζονται επίσης με την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της καλσιτριόλης (1,25(OH)D3) και της οστεοπροτεγερίνης (OPG), όπως επίσης και με την καταστολή του οστεοκλαστογενετικού παράγοντα RANKL (receptor activator of nuclear factor κB ligand) (Taes Y et al, 2009). Τέλος, είναι υπεύθυνα για την μείωση της σύνθεσης κυτοκινών όπως της ιντερλευκίνης-1 (interleukin-1, IL-1), της ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6, IL-6), του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumour necrosis factor α, TNF-α) και του παράγοντα αύξησης των αποικιών των μακροφάγων (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF) (Mircea CN et al, 2007). Τα κατώτερα επίπεδα E2 που απαιτούνται ώστε να υπάρχει θετική επίδραση αυτών στο μεταβολισμό των οστών είναι 40–50 pg/ml (Crandall CJ et al, 2013). Ωστόσο τα επίπεδα E2 που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΛΥΑ είναι συνήθως χαμηλότερα από 20 pg/ml (Shen ZQ et al, 2013). Συνεπώς, η μακροχρόνια υπο-οιστρογοναιμία που χαρακτηρίζει τη ΛΥΑ σχετίζεται με την πρόκληση οστεοπενίας και την αυξημένη πιθανότητας ανάπτυξης οστεοπόρωσης.

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του οστού, είναι η κακή διατροφή (μειωμένη πρόσληψη ασβεστίου και καλσιτριόλης), η μειωμένη πρόσληψη θερμίδων και η έντονη σωματική άσκηση (De Souza MJ et al, 2004). Η έντονη σωματική άσκηση που οδηγεί στην εκδήλωση της

διαταραχής δεν βελτιώνει την οστική πυκνότητα, αλλά αντιθέτως οδηγεί σε οστεοπενία και αυξάνει τον κίνδυνο οστικού κατάγματος (Warren MP et al, 2002). Άλλοι ορμονικοί παράγοντες πλύν της υπο-οιστρογοναιμίας, οι οποίοι ενέχονται στη μείωση της οστικής πυκνότητας σε γυναίκες με ΛΥΑ είναι: χαμηλά επίπεδα IGF-1 και ινσουλίνης, καθώς και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, τα οποία ουσιαστικά συντηρούν την οστεοπενία σε περιπτώσεις θεραπείας με οιστρογόνα (Tayes Y et al, 2009). Γενικά, ο βαθμός οστεοπενίας που παρατηρείται σε ασθενείς με ΛΥΑ είναι μικρότερος από εκείνο που παρατηρείται ανάμεσα σε ασθενείς με ΝΑ (Lawson EA et al, 2009, Guo LJ et al, 2013).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι γυναίκες είναι περισσότερο επιρρεπείς στην ανάπτυξη οστεοπενίας ή/και οστεοπόρωσης διότι η κορυφαία οστική μάζα που επιτυγχάνεται είναι κατά 25%-30% χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη των ανδρών (Davies JH et al, 2005). Επιπρόσθετη μείωση της οστικής πυκνότητας κατά τη διάρκεια της εφηβείας, της αναπαραγωγικής ή/και πέρι-εμμηνοπαυσιακής περιόδου λόγω της υποθαλαμικής διαταραχής αυξάνει σε σημαντικό βαθμό την πιθανότητα οστικού κατάγματος (Meczekalski B et al, 2010). Παρ' όλη την μειωμένη οστική πυκνότητα και τα χαμηλά επίπεδα οστικών μεταλλικών στοιχείων, δεν παρατηρείται σημαντική μείωση της οστικής ισχύος (Podfigurna-Stopa A et al, 2012).

Η αμνηρροία σχετιζόμενη με υπο-οιστρογοναιμία διάρκειας > 6 μηνών αποτελεί απόλυτη ένδειξη για την διενέργεια μέτρησης της οστικής πυκνότητας της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (Gordon CM et al, 2008). Το

τελευταίο έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, καθώς η ΛΥΑ αποτελεί την κυριότερη αιτία οστεοπενίας σε έφηβες και νέες γυναίκες (Misra M, 2008).

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στη ΛΥΑ σχετιζόμενη με την έντονη σωματική άσκηση. Για την πλειοψηφία των νέων γυναικών, η σωματική άσκηση έχει ευεργετική επίδραση στην υγεία. Ωστόσο, ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις είναι δυνατό να εμφανιστούν σε περιπτώσεις μεγάλης ανισσοροπίας μεταξύ της κατανάλωση και πρόσληψης ενέργειας. Αθλητικές δραστηριότητες όπως το μπαλέτο, η ρυθμική γυμναστική ή το τρέξιμο συχνά συνδυάζονται με διαταραγμένες διαιτητικές συμπεριφορές οδηγώντας σε χαμηλά ενεργειακά επίπεδα. Τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα οστικής πυκνότητας και η αυξημένη συχνότητα παθολογικών καταγμάτων εκ κοπώσεως, που παρατηρούνται ανάμεσα σε αυτές τις αθλήτριες αποδίδονται στην πρώιμη απώλεια οστικού ιστού και στη διαταραχή της οστικής μικροαρχιτεκτονικής (Lambrinoudaki I et al, 2010).

5.3. Καρδιαγγειακό σύστημα

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες στις ανεπτυγμένες χώρες, και αναλογικά περισσότερες γυναίκες πεθαίνουν από την νόσο σε σχέση με τους άνδρες. Η υπο-οιστρογοναιμία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος ποικιλοτρόπως. Τα στεφανιαία και περιφερικά αγγεία εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων, μέσω

των οποίων η E2 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην αγγειακή λειτουργία. Τα οιστρογόνα προάγουν την σύνθεση του νιτρικού οξειδίου (Nitric Oxide, NO) οδηγώντας έτσι σε αυξημένη παραγωγή ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου και τελικά σε αγγειοδιαστολή (Mendelsohn ME, 2002).

Τα οιστρογόνα ασκούν θετική επίδραση στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος, μέσω της επίδρασής τους στην ενδοθηλιακή, μυοκαρδιακή και αγγειακή λειτουργία καθώς και σε διάφορους μεταβολικούς παράγοντες (Reckelhoff JF, 2005). Αντιθέτως, η υπο-οιστρογοναιμία μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, διαταραγμένη παραγωγή NO, διατάραξη της ορθής λειτουργίας του αυτόνομου νευρικού συστήματος, ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και σε μεταβολές του λιπιδικού προφίλ (Ouyang P et al, 2006).

Η συσχέτιση του οιστρογονικού προφίλ με την λειτουργία του ενδοθηλίου έχει υπογραμμιστεί σε διάφορες μελέτες (O'Donnell E et al, 2011). Έχει υποδειχθεί ότι η διαστολή της βραχιονίου αρτηρίας, η οποία σε μεγάλο βαθμό αντικατοπτρίζει αυτής των στεφανιαίων αρτηριών, είναι σημαντικά μειωμένη σε γυναίκες με ΛΥΑ (Gordon CM et al, 2008). Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO που παρατηρείται σε γυναίκες με ΛΥΑ αποδίδεται στη χρόνια υπο-οιστρογοναιμία που χαρακτηρίζει την διαταραχή. Η χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων φαίνεται να έχει προστατευτική δράση προς αυτή την κατεύθυνση. Συγκεκριμένα, η χορήγηση χαμηλής δόσης ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης (30 µg E2 και 150 µg λεβονογεστρέλη) οδήγησε σε σημαντική

μείωση της διαστολής της βραχιονίου αρτηρίας έπειτα απο εννέα μήνες θεραπεία (Rickenlund A et al, 2005).

Σημαντική συσχέτιση της συχνότητας προ-εμμηνοπαυσιακής στεφανιαίας νόσου και υποθαλαμικού υπογοναδισμού ανευρέθηκε στα πλαίσια της μελέτης WISE (Women's Ischemia Syndrome Evaluation) (Bailey Merz CN et al, 2003). Τέλος, νέες αθλήτριες με χρόνια υπο-οιστρογοναιμία παρουσιάζουν διαταραγμένη περιφερική αγγειακή λειτουργία, η οποία συνδυάζεται με χαμηλές τιμές αρτηριακής πίεσης και καρδιακού ρυθμού στην ανάπαυση και μειωμένη ανταπόκριση των αντιρροπιστικών μηχανισμών στη δοκιμασία ισχαιμικής πρόκλησης σε σχέση με ευμηνορροϊκές γυναίκες (O'Donnell E et al, 2007).

Η διαταραχή της καρδιαγγειακής λειτουργίας σε γυναίκες με ΛΥΑ αποδίδεται, κατά κύριο λόγο στην υπο-οιστρογοναιμία, αλλά φαίνεται να σχετίζεται επίσης με την παρουσία αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου και σε μεταβολικές διαταραχές. Οι ασθενείς με ΛΥΑ χαρακτηρίζονται απο διαταραγμένο προφίλ των λιπιδίων και της γλυκόζης. Ασθενείς με ΛΥΑ σχετιζόμενη με την έντονη σωματική άσκηση παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης, απολιποπρωτείνης-B και τριγλυκεριδίων σε σχέση με υγιείς γυναίκες (Friday KE et al, 1993, Rickenlund A et al, 2005). Επίσης, προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ΛΥΑ παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τέλος, η επίπτωση της στεφανιαίας νόσου είναι σημαντικά υψηλότερη σε γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη και υποθαλαμική

υπο-οιστρογοναιμία σε σχέση με εκείνη γυναικών με σακχαρώδη διαβήτη (Ahmed B et al, 2008).

5.4. Ψυχική και σεξουαλική υγεία

Η διάθεση στις γυναίκες σχετίζεται με τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών του φύλου και δη των οιστρογόνων (McEwen BS et al, 2012). Η υπο-οιστρογοναιμία σε νέες γυναίκες με ΛΥΑ σχετίζεται με τις μεταβολές της δράσης διαφόρων νευροπεπτιδίων, νευροδιαβιβαστών και νευροστεροειδών στο επίπεδο του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, οι μεταβολές στα επίπεδα της σεροτονίνης, ντοπαμίνης και της αλοπρεγνανολόνης μπορούν επηρεάσουν σημαντικά την διάθεση των γυναικών με αμηνόρροια (Kormos V et al, 2013).

Οι ασθενείς με ΛΥΑ παρουσιάζουν συγκεκριμένο ψυχολογικό προφίλ, καθώς παρουσιάζουν υψηλή επίπτωση δυσλειτουργικών συμπεριφορών, δυσκολίας να ανταποκριθούν στο καθημερινό στρες και τάσεις για υψηλή ενδοπροσωπική εξάρτηση σε σχέση με τις ευμηνορροϊκές γυναίκες (Giles DE et al, 1993). Η υπερκορτιζολαιμία αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά ορμονικά χαρακτηριστικά των γυναικών με ΛΥΑ. Τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης ορού σχετίζονται με την υψηλότερη επίπτωση αγχώδους διαταραχής και κατάθλιψης σε αυτούς τους πληθυσμούς γυναικών και θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές των διαταραχών της διάθεσης (Lawson EA et al, 2009). Γενικά, οι ασθενείς με ΛΥΑ παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο όσον αφορά την

ανάπτυξη διαταραχών λήψης τροφής, αγχώδους διαταραχής, κατάθλιψης και ψυχοσωματικών διαταραχών (Bomba M et al, 2007). Οι τελευταίες συνήθως αφορούν ζητήματα ωριμότητας, κοινωνική ανασφάλεια, εσωστρέφεια, τελειομανία, τάση για καταθλιπτικές συμπεριφορές, έντονη ανησυχία για την εικόνα σώματος και τάση ανάπτυξης διαταραχών διατροφής (Bomba M et al, 2013).

Η σεξουαλική υγεία αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό ζήτημα σε ασθενείς με ΛΥΑ, καθώς φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα σεξουαλικής δυσλειτουργίας (Dundon CM et al, 2010). Σε θεωρητικό επίπεδο, αυτές οι διαταραχές ενδέχεται να σχετίζονται με το διαταραγμένο ορμονικό και ψυχολογικό προφίλ των γυναικών αυτών. Συγκεκριμένα, η πιθανή παρουσία αγχώδους διαταραχής ή/και κατάθλιψης ενδέχεται να εξηγεί εν μέρει την παρουσία σεξουαλικών διαταραχών (Berga SL et al, 2006). Λόγω των αντικειμενικών δυσκολιών συσχέτισης του ορμονικού με το ψυχοσωματικό προφίλ, παραμένει αδιευκρίνιστο εάν μια τέτοια συσχέτιση αποτελεί αποτέλεσμα ενός κοινού νευροενδοκρινικού υποβάθρου. Επιπλέον, παραμένει ασαφές, εάν οι αγχώδεις ή/και οι καταθλιπτικές διαταραχές επηρεάζουν τη σεξουαλική λειτουργία των γυναικών με ΛΥΑ μέσω διαφορετικών μηχανισμών σε σχέση με τις καταθλιπτικές αλλά κατά τα άλλα ευμνηορροϊκές γυναίκες (Marcus MD et al, 2001).

6. Θεραπεία

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ενδοκρινολογικής Εταιρίας, εάν μια γυναίκα με ΛΥΑ επιθυμεί την επίτευξη εγκυμοσύνης, η διέγερση ωοθυλακιορρηξίας είναι δυνατό να επιτευθεί με εξωγενή χορήγηση γοναδοτροπινών ή κατά ώσεις χορήγηση εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) (Gordon CM et al, 2017). Η κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας αποτελεί την θεραπεία πρώτης εκλογής (Gordon CM et al, 2017). Οι Tranoulis et al, σε πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξαν ότι η κατά ώσεις εξωγενής χορήγηση GnRH σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά ωοθυλακιορρηξίας σε σχέση με την εξωγενή χορήγηση γοναδοτροπινών (Tranoulis et al, 2018). Επιπροσθέτως, σχετίζεται με μικρότερη πιθανότητα πολύδυμης κύησης και συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Tranoulis et al, 2018). Η κιτρική κλομιφαίνη αποτελεί μία άλλη επιλογή, αλλά ενδέχεται να είναι αποτελεσματική στην πρόκληση ωοθηλακιορρηξίας λόγω της δράσης της στο επίπεδο του υποθαλάμου και της διαταραγμένης παλίνδρομης ρύθμισης που παρατηρείται σε γυναίκες με ΛΥΑ. Η πρόκληση ωοθηλακιορρηξίας σε ασθενείς με εξαιρετικά χαμηλό δείκτη μάζα σώματος $<18 \text{ Kg/m}^2$ πρέπει να αποφεύγεται, ενώ σχετίζεται επίσης με αυξημένη πιθανότητα πρόωρου τοκετού και ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης (Gordon CM et al, 2017).

Σε ασθενείς οι οποίες δεν επιθυμούν άμεση τεκνοποίηση, η οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης αποτελεί μια δημοφιλή προσέγγιση, βασιζόμενη στην αρχή ότι η ανεπάρκεια των στεροειδών ορμονών του φύλου αποτελεί την

βασική διαταραχή σε γυναίκες με ΛΥΑ. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση παρουσιάζει ωστόσο μειονεκτήματα. Η ορμονική θεραπεία αποκατάστασης δεν δύναται να αναστρέψει στο μέγιστο βαθμό την διαδικασία της οστεοπενίας ή να παρέχει την απαραίτητη καρδιαγγειακή προφύλαξη λαμβάνοντας υπόψη την υποκείμενη συνυπάρχουσα υπερκορτιζολαιμία και τις μεταβολικές διαταραχές (Gordon CM et al, 2017). Επιπροσθέτως, η οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης δεν αντιστρέφει τον συνυπάρχοντα υποθαλαμικό υποθυρεοειδισμό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ΛΥΑ αποτελεί μια πολυσύνθετη διαταραχή, και όχι απλά μια μεμονωμένη απορρύθμιση της έκκρισης της GnRH. Συνεπώς, η οιστρογονική θεραπεία υποκατάστασης μπορεί να καλύψει και να καθυστερήσει τις αρνητικές επιπτώσεις της ορμονικής και μεταβολικής απορρύθμισης που χαρακτηρίζουν την διαταραχή, αλλά σε καμία περίπτωση να τις αναστρέψει πλήρως.

Οι θεραπείες συμπεριφοράς αποτελούν μέχρι σήμερα την καλύτερη προσέγγιση για την αντιστροφή της ΛΥΑ. Πρόκειται για τη θεραπευτική προσέγγιση, που εστιάζει στο παρόν σύμπτωμα μιας δυσλειτουργικής συμπεριφοράς με στόχο την τροποποίηση της παθολογικής αυτής συμπεριφοράς. Το άτομο εκπαιδεύεται σε νέους τρόπους διαχείρισης των δυσκολιών που τον αφορούν. Μέσω εκπαίδευσης σε νέες τεχνικές μαθαίνει να “σκέφτεται” διαφορετικά, και είτε διορθώνει τις συλλογιστικές που τον οδήγησαν σε προβληματικές συμπεριφορές, είτε μαθαίνει νέες τακτικές αντιμετώπισης από την αρχή. Αυτή η προσέγγιση είναι δυνατό να αντιστρέψει τις ψυχοσωματικές διαταραχές σχετιζόμενες με το στρες και τις διατροφικές

διαταραχές που συχνά συνοδεύουν την ΛΥΑ και συνεπώς να διευκολύνει την νευροενδοκρινή και μεταβολική ανάρρωση των ασθενών. Ένας επιπρόσθετος στόχος αυτής της θεραπείας είναι να βοηθήσει τις γυναίκες να αναγνωρίσουν και να αντιμετωπίσουν τους πιθανούς στρεσογόνους παράγοντες, να παρέχει συναισθηματική υποστήριξη και να παράγει μακροπρόθεσμα οφέλη, όσον αφορά την σωματική και ψυχική υγεία. Η χρήση των θεραπειών συμπεριφοράς έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην αποκατάσταση της εμμήνου ρύσεως σε ασθενείς με ΛΥΑ (Berga SL et al, 2006, Michopoulos V et al, 2013).

Ε. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης παραγόντων όπως η απώλεια βάρους, η σωματική άσκηση, το ψυχικό στρες καθώς και του γονοτύπου στην εκδήλωση ΛΥΑ. Πρόκειται για μια μελέτη παρατήρησης (observational), η οποία περιλαμβάνει δύο σκέλη. Το πρώτο σκέλος αφορά μια μελέτη επιπολασμού (crossectional), η οποία στοχεύει να εντοπίσει τα αίτια της ΛΥΑ σε έφηβες και νέες γυναίκες μέσω λήψης ιστορικού και συμπλήρωσης ερωτηματολογίων. Το δεύτερο σκέλος αφορά μια μελέτη ασθενή μάρτυρα (case-control), όπου η αλληλουχία του γονιδίου PROKR2 των ασθενών μελετάται έναντι μαρτύρων και ασθενών με ΙΥΥ.

2. Δείγμα

Η παρούσα μελέτη διαξήχθη από το Νοέμβριο του 2015 μέχρι τον Οκτώβριο του 2019. Κατά την ανωτέρω χρονική περίοδο, 56 έφηβες και νέες γυναίκες ηλικίας μεταξύ 15 και 22 ετών με επιβεβαιωμένη ΛΥΑ προσήλθαν στο ιατρείο Παιδικής και Εφηβικής Γυναικολογίας του Γ.Ν.Α. Αλεξάνδρα, 41 εκ των οποίων δέχθηκαν να ενταχθούν στο πρωτόκολλο. Επιπροσθέτως, 12 ασθενείς με ΙΥΥ,

1 ασθενής με σύνδρομο Kallman και 86 περιπτώσεις υγιών μαρτύρων έχουν συμπεριληφθούν στη μελέτη.

2.1. Διάγνωση λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας

Η επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου 'Αλεξάνδρα' ενέκρινε το ερευνητικό πρωτόκολλο, και όλες οι έφηβες και νέες γυναίκες που περιλήφθηκαν είχαν ενημερωθεί προφορικά και συγκατατέθηκαν ενυπόγραφα μέσω του Συμφωνητικού Εθελοντικής Συμμετοχής (Παράρτημα 1) πριν την συμπλήρωση των ερωτηματολογίων και τη λήψη περιφερικού αίματος.

2.2 Διαδικασία αξιολόγησης

2.2.1.Ερευνητικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν

- Φύλλο καταγραφής των προσωπικών στοιχείων της εθελόντριας (όνομα, ηλικία, δημογραφικά στοιχεία, βάρος, ύψος, απώλεια βάρους το τελευταίο έτος, ηλικία εμμηναρχής, τελευταία έμμηνος ρύση, μορφωτικό επίπεδο, ακαδημαϊκές επιδόσεις, φυσική και σεξουαλική δραστηριότητα)

- Ελληνική προσαρμογή του ερωτηματολογίου Διαιτητικών Συνηθειών (Eating Attitudes Test, EAT-26), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαιτητικών διαταραχών στις δύο ομάδες (Παράρτημα Ι).
- Ελληνική προσαρμογή του ερωτηματολογίου αξιολόγησης του άγχους-αυτοεκτίμησης (State-Trait Anxiety Inventory, STAI), με σκοπό την αξιολόγηση των επιπέδων άγχους στις δύο ομάδες (Παράρτημα ΙΙ).
- Ελληνική προσαρμογή του ερωτηματολογίου φυσικής δραστηριότητας (International Physical Activity Questionnaire - IPAQ), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των επιπέδων φυσικής δραστηριότητας στις δύο ομάδες (Παράρτημα ΙΙΙ).
- Ελληνική προσαρμογή του ερωτηματολογίου αϋπνίας Αθηνών (Athens Insomnia Scale, AIS-8), το οποίο αξιολογεί τις διαταραχές του ύπνου (Παράρτημα ΙV).
- Ελληνική προσαρμογή του ερωτηματολογίου εκτίμησης εικόνας σώματος (Multi-dimensional Body-Self Relation Questionnaire - MBSRQ) (Παράρτημα V).

2.2.2. Μέθοδος συλλογής δεδομένων

Πριν τη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων δόθηκαν όλες οι απαραίτητες οδηγίες για τη σωστή συμπλήρωση τους και δόθηκε η ευκαιρία σε όλες τις

συμμετέχουσες να λύσουν τυχόν απορίες τους ρωτώντας ελεύθερα για το σκοπό της έρευνας και των επιμέρους μετρήσεων. Οι συμμετέχουσες στην μελέτη βεβαιώθηκαν για το απόρρητο των απαντήσεών τους. Επιπροσθέτως, κάθε συμμετέχουσα είχε την δυνατότητα, εάν το επιθυμούσε, να ενημερωθεί για τα προσωπικά της αποτελέσματα σχετικά με τη διατροφική αξιολόγηση, τα ψυχολογικά τεστ και την μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου PROKR2.

2.2.3. Περιγραφή ερευνητικών εργαλείων

- **Ερωτηματολόγιο διαιτητικών συνηθειών (Eating Attitudes Test, EAT-26)**

Το EAT-26 αποτελεί ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιημένα, αξιόπιστα και τυποποιημένα εργαλεία για την αξιολόγηση των συμπτωμάτων, των συμπεριφορών και των σκέψεων που σχετίζονται με τα συμπτώματα των διαταραχών λήψης τροφής. Είναι ικανό να εντοπίσει τα άτομα που έχουν αυξημένη τάση για εμφάνιση διαταραχών λήψης τροφής. Περιλαμβάνει 26 προτάσεις-συμπεριφορές, για τις οποίες το άτομο καλείται να δηλώσει τη συχνότητα με την οποία του συμβαίνουν ή το απασχολούν μεταξύ έξι πιθανών διαβαθμίσεων (ποτέ, σπάνια, μερικές φορές, συχνά, συνήθως, πάντα). Οι 26 ερωτήσεις συγκροτούν, πέρα από το συνολικό ερωτηματολόγιο, τρεις ξεχωριστές υποκλίμακες (subscales), όπου κάθε πρόταση ανήκει σε μία και μόνο υποκλίμακα. Οι υποκλίμακες είναι οι εξής : «Ενασχόληση με δίαιτες

αδυνατίσματος» (dieting), «Βουλιμία και ενασχόληση με το φαγητό» (bulimia and food preoccupation) και «Έλεγχος της πράξης του τρώγειν» (oral control). Η βαθμολογία κάθε υποκλίμακας προκύπτει απλά αθροίζοντας τη βαθμολογία όλων των προτάσεων που την απαρτίζουν. Η υποκλίμακα «ενασχόληση με δίαιτες αδυνατίσματος» (dieting) περιλαμβάνει συμπεριφορές σχετικές με την αποφυγή «παχυντικών» τροφίμων και την ενασχόληση του ατόμου με το σώμα του, σε μια προσπάθεια να γίνει όλο και πιο αδύνατο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύντομο και αξιόπιστο υποκατάστατο του γενικού ερωτηματολογίου, όπου οι καταστάσεις το απαιτούν, όπως για παράδειγμα ως τμήμα ενός γενικού ερωτηματολογίου για την ανακύκλωση του βάρους. Η υποκλίμακα «βουλιμία και ενασχόληση με το φαγητό» (bulimia and food preoccupation) περιέχει προτάσεις που υποδηλώνουν έντονο ενδιαφέρον για το φαγητό και τα τρόφιμα καθώς και βουλιμική συμπεριφορά. Όπως και η προηγούμενη υποκλίμακα, σχετίζεται με παραμέτρους εικόνας σώματος, αλλά, αντίθετα με αυτήν, σχετίζεται επίσης και με τις βουλιμικές συμπεριφορές και υψηλότερα σωματικά βάρη. Τέλος, η υποκλίμακα «έλεγχος της πράξης του τρώγειν» (oral control) περιγράφει τον αυτοέλεγχο της πράξης του φαγητού και τις πιέσεις που αντιλαμβάνεται το άτομο από το περιβάλλον του. Ολική βαθμολογία στο ερωτηματολόγιο ίση ή μεγαλύτερη του 20 υποδεικνύει μη φυσιολογική διαιτητική συμπεριφορά, και εμφάνιση συμπτωμάτων διαταραχών λήψης τροφής. Αυτό δεν σημαίνει ότι το EAT-26 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο, αλλά αποτελεί αρκετά αποδοτικό εργαλείο για τον πρωταρχικό εντοπισμό περιπτώσεων με συμπτώματα μη φυσιολογικής διαιτητικής συμπεριφοράς. Άτομα με βαθμολογία ίση ή μεγαλύτερη του 20

μπορούν εύκολα και γρήγορα να εντοπιστούν ώστε, σε δεύτερο στάδιο, να ακολουθήσει κλινική εξέταση και συνέντευξη προκειμένου να διαγνωσθεί τελικά η ύπαρξη διαταραχής λήψης της τροφής. Συμπερασματικά, το EAT-26 θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως μέτρο αξιολόγησης της ενασχόλησης με το βάρος και το φαγητό, τέτοια προβλήματα ενασχόλησης εμφανίζονται σε αδύνατα, σε παχύσαρκα, σε φυσιολογικού βάρους άτομα καθώς και σε άτομα με ασταθές σωματικό βάρος. Το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί προσαρμογή του ερωτηματολογίου EAT-26. Η ελληνική προσαρμογή βασίστηκε σε 1.186 μαθητές Λυκείου από σχολεία της Θεσσαλονίκης (Yannakoulia M et al, 2004).

- **Ερωτηματολόγιο άγχους-αυτοεκτίμησης του Spielberger (State-Trait Anxiety Inventory)**

Το ερωτηματολόγιο αυτό αποτελεί εργαλείο αξιολόγησης του άγχους, παρά το γεγονός ότι ο ελληνικός τίτλος του είναι «Ερωτηματολόγιο Αυτοεκτίμησης», και αυτό γιατί, σύμφωνα με τον συγγραφέα, ο ερωτώμενος παραπλανιέται κατά κάποιο τρόπο και απαντά με μεγαλύτερη ειλικρίνεια όταν νομίζει ότι πρόκειται για ερωτηματολόγιο αυτοεκτίμησης και όχι άγχους. Συγγραφέας είναι ο Charles D. Spielberger, ο οποίος ξεκίνησε τη δημιουργία του το 1960, με πρώτη έκδοσή του το 1964. Το πλήρες όνομα του ερωτηματολογίου είναι State-Trait Anxiety Inventory (STAI) και με τη συμπλήρωσή του προκύπτει

ένας δείκτης άγχους. Προορίζεται σε άτομα άνω των 10 ετών, είναι αυτοσυμπληρούμενο και περιλαμβάνει 40 ερωτήσεις. Οι πρώτες 20 ερωτήσεις ζητούν απαντήσεις για το πώς αισθάνεται ο ερωτώμενος τη στιγμή της συμπλήρωσης (state anxiety— ο δείκτης αυτός μπορεί να κυμαίνεται από μέρα σε μέρα), ενώ οι επόμενες 20 αφορούν συνήθη συναισθήματα (trait anxiety — έχει σταθερή τιμή, η οποία δεν εμφανίζει διακυμάνσεις από μέρα σε μέρα). Το ερωτηματολόγιο έχει μεταφραστεί σε 66 γλώσσες και έχει χρησιμοποιηθεί σε πάνω από 20.000 δημοσιευμένες μελέτες. Έλεγχος αξιοπιστίας έχει γίνει σε δείγματα κοριτσιών και αγοριών, μαθητών λυκείου και κολλεγίου (σύνολο 6.800 ασθενείς). Περιλάμβανε την συμπλήρωση και επανασυμπλήρωση σε διαστήματα που κυμαίνονταν από μία ώρα έως 104 μέρες. Η αξιοπιστία μειώνεται όσο αυξάνεται και το διάστημα επανασυμπλήρωσης. Το ερωτηματολόγιο συστήνεται για ερευνητικούς σκοπούς. Η βαθμολογία προκύπτει με ειδικό κλειδί βαθμολόγησης και όσο πιο μεγάλο είναι το σκορ τόσο περισσότερο άγχος υφίσταται. Το ερωτηματολόγιο παρουσιάζει ικανοποιητική εγκυρότητα εννοιολογικής κατασκευής και εγκυρότητα κριτηρίου. Επιπλέον η αξιοπιστία εσωτερικής συνέπειας και η αξιοπιστία επαναληπτικών μετρήσεων κρίνονται ικανοποιητικές. Το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί προσαρμογή του ερωτηματολογίου. Η ελληνική προσαρμογή βασίστηκε σε δείγμα 73 τελειόφοιτων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Fountoulakis KN et al, 2006).

- **Ερωτηματολόγιο Εκτίμησης Εικόνας Σώματος (Multidimensional Body-self Relation Questionnaire)**

Το ερωτηματολόγιο εκτίμησης εικόνας σώματος αποτελεί ένα αυτοσυμπληρούμενο κατάλογο 69 ερωτήσεων οι οποίες είναι κατηγοροποιημένες σε 10 υποκλίμακες, που αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα που ακολουθεί παρακάτω. Προορίζεται για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς, της γνώμης και της στάσης της εξεταζόμενης απέναντι στο σώμα της. Η διαφορά του συγκεκριμένου ερωτηματολογίου σε σύγκριση με άλλα ομοειδή του, έγκειται στο ότι πραγματεύεται διαφορετικές κατευθύνσεις συμπεριφοράς, ως προς τρεις κυρίαρχους τομείς του σώματος: την εξωτερική εμφάνιση, τη φυσική κατάσταση και την υγεία. Κάθε υποκλίμακα βαθμολογείται μεμονωμένα από το άθροισμα των βαθμών που λαμβάνουν οι προτάσεις που ανήκουν σε αυτή. Σκορ ίσο ή μεγαλύτερο του 2,5 για κάθε υποκλίμακα, υποδηλώνει μη φυσιολογική συμπεριφορά στον τομέα που απευθύνεται κάθε κλίμακα. Οι ερωτώμενες έχουν τη δυνατότητα για τις 57 πρώτες ερωτήσεις να απαντήσουν ανάλογα με το κατά πόσο συμφωνούν ή όχι (διαφωνώ απόλυτα, διαφωνώ αρκετά, ούτε συμφωνώ-ούτε διαφωνώ, συμφωνώ αρκετά, συμφωνώ απόλυτα), για την ερώτηση 58 υπάρχουν επιλογές που αφορούν τη συχνότητα (ποτέ, σπάνια, μερικές φορές, συχνά, πολύ συχνά), για τις ερωτήσεις 59-60 περιλαμβάνονται απαντήσεις κατάταξης

του σωματικού βάρους από ελλιποβαρήs έως υπέρβαρη σύμφωνα με την προσωπική γνώμη αλλά και τα ερεθίσματα που λαμβάνονται από τους οικείους και τέλος, οι προτάσεις 61-69 απαντώνται από βαθμίδες που εκφράζουν την ικανοποίηση από επιμέρους τμήματα του σώματος. Η αξιοπιστία εσωτερικής συνέπειας και η αξιοπιστία επαναληπτικών μετρήσεων της Ελληνικής προσαρμογής του ερωτηματολογίου κρίνονται ικανοποιητικές (Costarelli V et al, 2011).

- **Ερωτηματολόγιο Φυσικής Δραστηριότητας (International Physical Activity Questionnaire, IPAQ)**

Η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε μέσω του διεθνούς ερωτηματολογίου φυσικής δραστηριότητας IPAQ (short version). Αποτελείται από 7 ερωτήσεις που συλλέγουν πληροφορίες για τον αριθμό των ημερών και τη διάρκεια της κάθε ημέρας που ξοδεύτηκαν σε μέτριας και έντονης έντασης φυσική δραστηριότητα, καθώς και σε περπάτημα και σε καθιστικές δραστηριότητες σε διάστημα 7 ημερών. Η καθημερινή φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε σε μονάδες ενεργειακής δαπάνης (METs). Μία μονάδα ενεργειακής δαπάνης αντιστοιχεί σε 3.5ml O₂/Kg σωματικού βάρους/λεπτό, όπου είναι η ποσότητα οξυγόνου που καταναλώνεται κατά την ηρεμία. Για τον υπολογισμό της φυσικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τύποι:

1. Έντονη σωματική δραστηριότητα: 8 Α Χ λεπτά/εβδομάδα Χ φορές/εβδομάδα.
2. Μέτρια σωματική δραστηριότητα: 4 Α Χ λεπτά/εβδομάδα Χ φορές/εβδομάδα.
3. Ήπια σωματική δραστηριότητα: 3.3 Α Χ λεπτά/εβδομάδα Χ φορές/εβδομάδα.

Η αξιοπιστία εσωτερικής συνέπειας και η αξιοπιστία επαναληπτικών μετρήσεων της Ελληνικής προσαρμογής του ερωτηματολογίου κρίνονται ικανοποιητικές (Cronbach's α 0.63 - 0.92) (Papathanasiou G et al, 2014).

- **Κλίμακα μέτρησης της αϋπνίας (κλίμακα αϋπνίας Αθηνών, Athens Insomnia Scale, AIS-8)**

Η κλίμακα μέτρησης της αϋπνίας (κλίμακα αϋπνίας Αθηνών, Athens Insomnia Scale, AIS-8) είναι ένα ψυχομετρικό όργανο αυτοαξιολόγησης που έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση της δυσκολίας στον ύπνο (Soldatos ET et al, 2003). Αποτελείται από οκτώ στοιχεία τα οποία αφορούν στην ποσότητα και στην ποιότητα του ύπνου, καθώς και στην ευεξία, τη λειτουργική ικανότητα και την υπνηλία κατά τη διάρκεια της επόμενης μέρας. Κάθε υποερώτημα βαθμολογείται σε κλίμακα 0-3. Η διακύμανση της κλίμακας ποικίλει από

μεταβλητή σε μεταβλητή. Το ερωτηματολόγιο αποτελείται από 8 ερωτήσεις και η βαθμολογία υπολογίζεται με διαβάθμιση 4 σημείων της κλίμακας Likert, που εκτείνεται από το 0 ("Πολύ γρήγορη ", "Κανένα πρόβλημα ", "Στον επιθυμητό χρόνο", "Επαρκής", "Ικανοποιητική", "Πλήρης ", "Καμιά ") έως το 3 ("Πολύ καθυστερημένη", "Έντονο πρόβλημα", "Πολύ νωρίτερα", "Πολύ ανεπαρκής", "Κακή", "Πολύ μειωμένη ή απύσχα", "Έντονη"). Η οριακή τιμή ≥ 6 (cut-off value) παρουσιάζει ευαισθησία 93% και ειδικότητα 85% για την κλινική διάγνωση της αϋπνίας (Soldatos CR et al, 2003).

2.3. Μελέτη του γονιδίου PROKR2

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 41 έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ , 12 ασθενείς με ΙΥΥ, 1 ασθενή με σύνδρομο Kallman και 86 υγιείς μάρτυρες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Γενετικής και Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

2.3.1 Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα

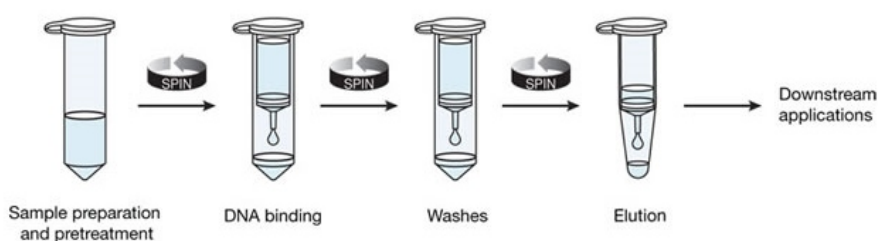
Το εμπορικώς διαθέσιμο σκεύασμα PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, βαμβακοφόρους στυλεούς και ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded tissues). Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται με απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος (2-3 ml) και τοποθετείται σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό, συγκεκριμένα ηπαρίνη ή EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη (φιαλίδιο γενικής αίματος). Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων (cell lysis), την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (protein precipitation) και την κατακρήμνιση του DNA (DNA precipitation).

Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης (Eppendorf tube του 1.5ml) προστίθενται 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου περιφερικού αίματος μαζί με 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer, 20 μl πρωτεϊνάσης K και 20 μl RNάσης A. Το Genomic Lysis/ Binding Buffer προκαλεί την πλήρη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων προκειμένου να απελευθερωθεί στο διάλυμα το DNA που ανευρίσκεται στον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Η πρωτεϊνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες που μπορούν να βλάψουν τα κεκαθαρμένα μόρια του DNA. Η

ριβονουκλεάση A (RNάση A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση που αποικοδομεί το μονόκλωνο RNA (single-stranded RNA), έχει συγκέντρωση 20 mg RNase A/ mL σε 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA και προέρχεται από πάγκρεας βοός.

Το προϊόν της λύσης επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 55° C για 10 λεπτά για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών. Το γονιδιωματικό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, που ονομάζονται πυρηνικά χρωμοσώματα και για να θεωρείται πετυχημένη η διαδικασία της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA πρέπει να έχει αποδώσει ένα μόριο DNA απαλλαγμένο από πρωτεΐνες για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για PCR. Έπειτα προσθέτουμε αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA και μεταφέρουμε το ομογενοποιημένο διάλυμα σε μια περιστρεφόμενη στήλη όπου μετά από φυγοκέντρωση το DNA που έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα που περιέχονται στο διάλυμα δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη, αλλά εκλούονται στο σωλήνα συλλογής, ο οποίος απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις της περιστρεφόμενης στήλης με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων που έχουν δεσμευθεί στη μεμβράνη και να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η καθαρότητα του DNA. Η συναπομόνωση πρωτεϊνών μειώνει την επιτυχία της PCR, γι' αυτό είναι σημαντικό να ελαχιστοποιηθούν ή ακόμη καλύτερα να εξαλειφθούν τα στοιχεία εκτός του DNA που δεσμεύονται στη μεμβράνη της

στήλης. Το κεκαθαρμένο DNA εκλούεται από τη μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column χρησιμοποιώντας διάλυμα έκπλυσης, elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο συλλογής που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20° C για να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του DNA και ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια με PCR.



Το πρωτόκολλο (PureLink Genomic DNA Kits Manual, Life Technologies) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου αίματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
2. Προσθέτουμε 20 μl πρωτεΐνάσης K.
3. Προσθέτουμε 20 μl RNάσης A, αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

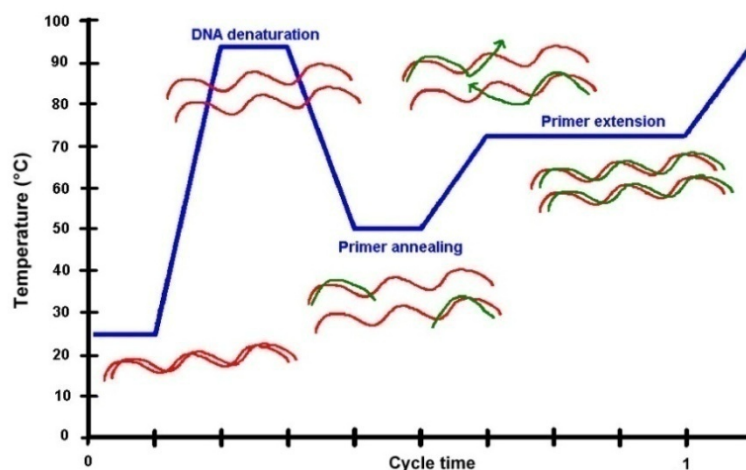
4. Προσθέτουμε 200 μ l PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
5. Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55° C για 10 λεπτά για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
6. Προσθέτουμε 200 μ l 96-100% αιθανόλη.
7. Αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
8. Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μ l) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.
9. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
11. Προσθέτουμε 500 μ l Wash Buffer 1 στη στήλη.
12. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
14. Προσθέτουμε 500 μ l Wash Buffer 2 στη στήλη.
15. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
16. Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης του 1,5 ml.

17. Προσθέτουμε 150 μ l PureLink Elution Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
18. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml.
20. Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρωσης του 1,5 ml που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20°C .

2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια επαναστατική μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro* μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η ταχύτητα, η ευκολία, η ευαισθησία, η ειδικότητα και η αυτοματοποίηση της μεθόδου έχει συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και στην ευρεία εφαρμογή της στην ιατρική έρευνα και τη διάγνωση ασθενειών. Ο επιστήμονας που την επινόησε, Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η τεχνική του Mullis και των συνεργατών του ήταν αργή, δύσκολη και ανακριβής και το μεγαλύτερο μειονέκτημα ήταν ότι σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού ήταν απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης,

καθώς με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το ένζυμο αποδιατασσόταν με αποτέλεσμα να χάνει τη λειτουργικότητά του. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χάρη στην απομόνωση της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, η οποία παραμένει αναλλοίωτη κατά την αποδιάταξη στους 95°C και έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72°C, κάτι το οποίο οδήγησε στην αυτοματοποίηση της μεθόδου.



Εικόνα 2.1. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) είναι η *in vitro* ενζυμική σύνθεση αντιγράφων ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας βάσεων και περιλαμβάνει επαναλήψεις κύκλων αντιγραφής καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τρία στάδια: (1) την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, *DNA denaturation*, στους 95°C, (2) την αναδιάταξη των εκκινητών, *primer annealing*, στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και (3) την επιμήκυνση των εκκινητών, *primer extension*, στους 72°C.

Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο *in vitro* πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA. Η

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με λογαριθμική αύξηση. Βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων του DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να αντιγράφονται. Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA που επιθυμείται να ενισχυθεί.

Η PCR βασίζεται στη χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών για να πραγματοποιηθούν τα τρία βήματα της αποδιάταξης του DNA, του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης των εκκινητών. Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95°C για 15 min για να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq DNA πολυμεράση (1^{ος} κύκλος). Με τον τρόπο αυτόν μειώνεται σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού (non specific amplification), εφόσον ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών, καθώς και των διμερών τους. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται θερμαίνοντάς το στους 95°C για να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA, αυτή η θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές.

Για να ενισχύσουμε το δείγμα του DNA είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασίας 25-40 φορές, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη αποδοτικότητα χρησιμοποιώντας έναν θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler), ο οποίος είναι προγραμματισμένος να εναλλάσσει τη θερμοκρασία στιγμιαία και ικανό να διατηρεί τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.



Εικόνα 2.2. Ο αυτοματοποιημένος θερμοκυκλοποιητής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια (reagents):

- i. **Το μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής (template DNA)** για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η ποιότητα της μήτρας του DNA που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί είναι καθοριστικός παράγοντας της επιτυχίας της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA που κυμαίνεται από 0,01 μ g έως 1 μ g.
- ii. **Ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ένας νοηματικός εκκινητής (forward primer) και ένας αντινοηματικός εκκινητής (reverse primer)**, τα οποία υβριδίζονται στις 5' και 3' γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων (συνήθως 20 βάσεων) συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Το περιεχόμενό τους σε ζεύγη βάσεων G/C, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε G/C, κυμαίνεται από 40% έως 60% με αντιπροσωπευτικότερο ποσοστό συνήθως το 50%. Οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα πρέπει να

είναι περίπου 50-72° C και τα T_m των δύο εκκινητών να μην διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερους από 5° C. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως θέσεις πέψης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 20 μM (20 pmol/ μl).

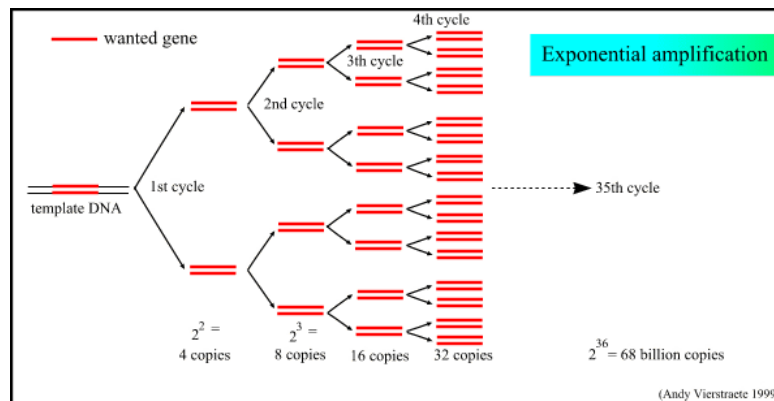
- iii. **Η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση** που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1976 από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι σταθερή στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας, Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα εμπορικώς διαθέσιμο ένζυμο που απομονώνεται από βακτήρια *Escherichia coli*. Αυτό το ένζυμο έχει τη δραστικότητα της 5' → 3' πολυμεράσης και τη δραστικότητα της 5' → 3' εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3' → 5' εξωνουκλεολυτική δραστικότητα με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση (proofreading activity).
- iv. **Τα 5'- τριφωσφορικά 2'- δεοξυριβονουκλεοτίδια (2'-deoxynucleotide 5'-triphosphates, dNTPs, που περιλαμβάνουν την dATP, την dTTP, την dGTP, και την dCTP)** που προσθέτει η DNA πολυμεράση για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα. Τα dNTPs σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg²⁺. Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους πρέπει να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του MgCl₂.
- v. **Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)** που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστικότητα της DNA πολυμεράσης. Το

ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες pH και αλατότητας για τη δράση της πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 °C), $MgCl_2$ KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη και

- vi. **Τα ιόντα μαγνησίου Mg^{2+} με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου $MgCl_2$** που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$ προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαράγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την πιστότητά της. Σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA αυξάνοντας την T_m και τελικά την ειδικότητα των εκκινητών. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,5 mM έως 2,5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.

Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετείται εντός του θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι για να επιτυγχάνεται ομοιογενής θερμοκρασία στο εσωτερικό του μηχανήματος και μετά τη λήξη του

προγράμματος τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%.

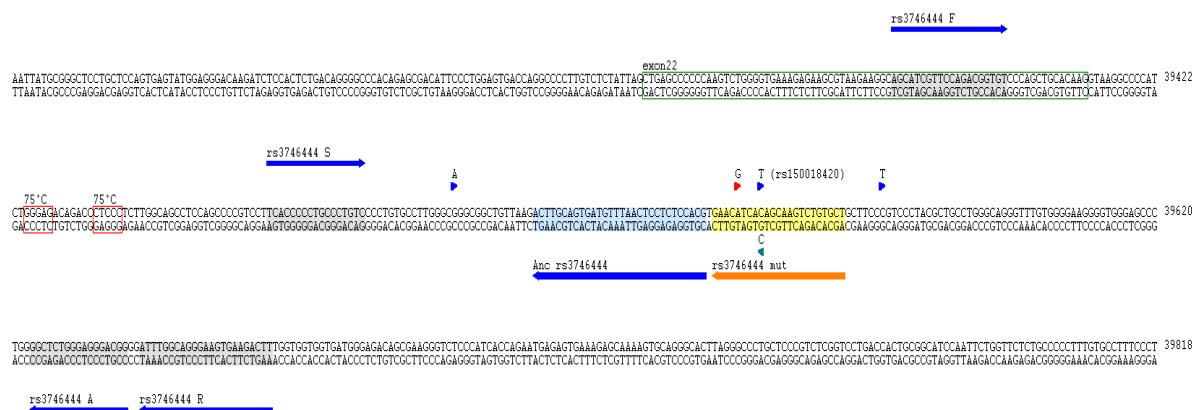


Εικόνα 2.3. Η συγκέντρωση του δείγματος του DNA είναι αρχικά πολύ χαμηλή αλλά η συγκέντρωσή του αυξάνεται εκθετικά, καθώς η αντίδραση προχωράει και τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου γίνονται οι μήτρες του επόμενου κύκλου.

Στην παρούσα μελέτη ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (oligonucleotide primers) έγινε με τη βοήθεια της διαδικτυακής εφαρμογής BLAST Basic Local Alignment Search Tool του NCBI National Centre for Biotechnology Information, η οποία επιτρέπει τόσο την αξιολόγηση μεμονωμένων υποψήφιων εκκινητών όσο και την αξιολόγηση συνδυασμού εκκινητών ως ζεύγη για αντιδράσεις PCR. Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινητών (melting temperature, T_m) από τις οποίες εξαρτάται ο προγραμματισμός μιας PCR δεν πρέπει να διαφέρουν σημαντικά για τους δύο εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν. Ως θερμοκρασία αποδιάταξης ενός εκκινητή (melting temperature, T_m) ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία ένας εκκινητής αδυνατεί πλέον να σχηματίσει σταθερά δίκλινα μόρια με την

συμπληρωματική του αλληλουχία στόχο. Η θερμοκρασία τήξης T_m εξαρτάται από το μέγεθος του εκκινητή καθώς και από το ποσοστό του σε δεοξυριβονουκλεοτίδια γουανίνης G και κυτοσίνης C, τα οποία συγκριτικά με αυτά της αδενίνης A ή της θυμίνης T αυξάνουν την T_m . Κατά τον σχεδιασμό της αλληλουχίας των εκκινητών πρέπει να αποφεύγεται η παρουσία ανεπιθύμητων, θερμοδυναμικά ευνοϊκών δομών, που μειώνουν την απόδοση των εκκινητών στην αντίδραση π.χ. δομές φουρκέτας και ομοδιμερή ή ετεροδιμερή των εκκινητών, καθώς και η παρουσία νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που μπορούν να οδηγήσουν σε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο και τελικά σε σφάλμα στο προϊόν της PCR.

Για την μελέτη της αλληλουχίας του PROKR2 χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών που παράγουν ένα τμήμα 173 ζευγών βάσεων (173-bp).



965272	hu MYH7B (rs3746444)		NG_016984	T_m
--------	----------------------	--	-----------	-------

rs3746444 S	TCACCCCCTGCCCTGTC	S	39467-483	59,6°C
rs3746444 A	CCGTCCCTCCCAGAGCC	A	39640-624	60,6°C

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του PROKR2 περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης του 0,5 mL προσθέτουμε 2,5μl 10X PCR Buffer minus Mg²⁺, 1μl 10 mM dNTP mixture, 1 μl 50 mM MgCl₂, 1μl Primer Sense mix, 1μl Primer Antisense mix, 2 μl Template DNA, 0,3 μl *Taq* DNA polymerase, 16,2 μl απεσταγμένο νερό.
2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζουμε στους 95°C για 15 λεπτά.
3. Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 29 κύκλους: 95°C για 1 λεπτό, 65°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό.
4. Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 10 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4° C.
5. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η

οποία δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από κάποια είδη θαλάσσιων φυκών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100°C και να στερεοποιείται στους 45°C σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων εφαρμόζεται για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR. Η πηκτή

αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 5 μL βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδεις φως.

Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/ cm. Το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε τη γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet, UV, radiation). Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

2.3.4. Καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

Για την ανάγνωση της αλληλουχίας των τμημάτων που ενισχύονται με την αντίδραση της PCR είναι απαραίτητος ο καθαρισμός τους από την περίσσεια

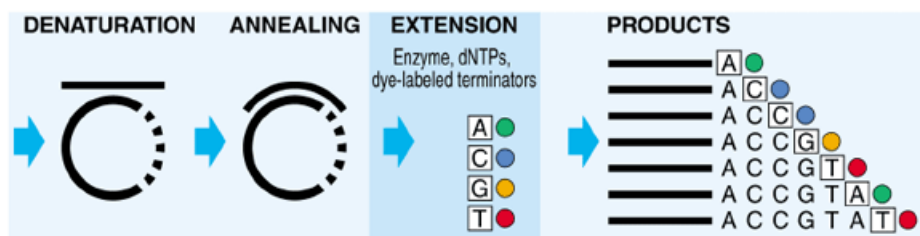
των αντιδραστηρίων, ο οποίος πραγματοποιείται σε ένα ειδικά διαμορφωμένο πιάτο 96 θέσεων (MultiScreen PCR_{μ96} 96-well plate, Millipore), τα βοθρία του οποίου αποτελούνται από ειδικές ρητίνες που έχουν την ικανότητα να κατακρατούν εκλεκτικά το DNA.

2.3.5. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων του DNA

Η τεχνική που ακολουθείται για την ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA βασίζεται στη μέθοδο του Sanger, όπου η μία αλυσίδα του DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με τη χρήση κατάλληλου εκκινητή. Στο μίγμα της αντίδρασης εκτός από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) προστίθενται και τα διδεοξυανάλογά τους (τριφωσφορικά 2', 3' διδεοξυνουκλεοτίδια, dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), στα οποία δεν υπάρχει το 3' υδροξυλικό άκρο 3'-OH άκρο και είναι σημειωμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, καθεμιά από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

Η σύνθεση της αλυσίδας του DNA γίνεται με τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην περίπτωση που κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου μορίου DNA η *Taq* πολυμεράση εισάγει ένα

διδεοξυνουκλεοτίδιο, τότε εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερης 3' υδροξυλομάδας, τερματίζεται πρόωρα η επιμήκυνσή του. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο, ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο είναι επισημασμένο με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ουσίες. Γι' αυτό η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger ονομάζεται εναλλακτικά μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method).

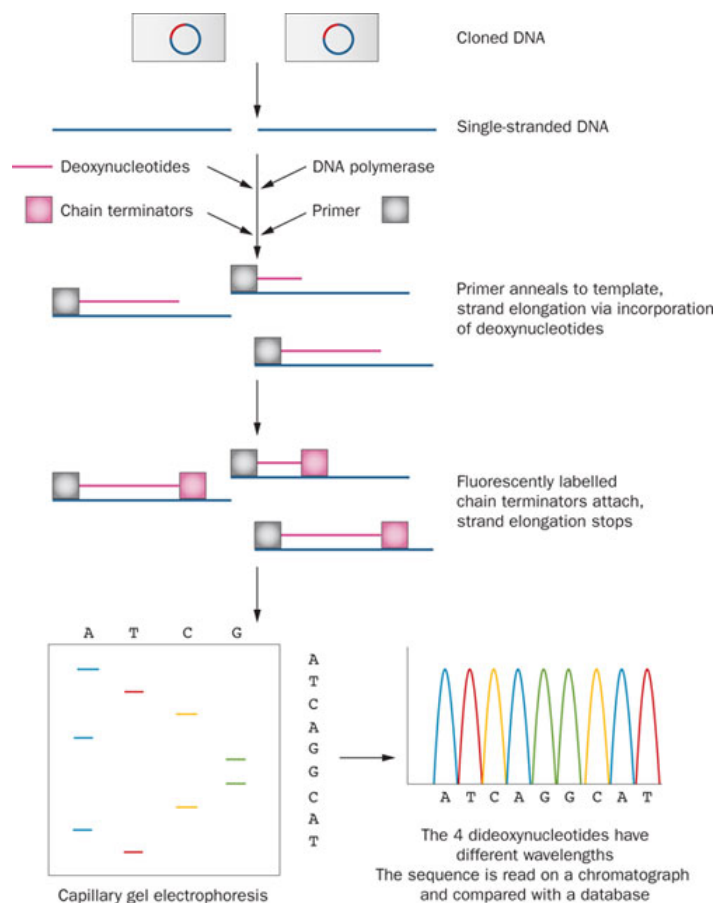


Εικόνα 2.4. Όταν κατά τον πολυμερισμό της νουκλεοτιδικής αλυσίδας η DNA πολυμεράση αντί να προσθέσει ένα από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) προσθέτει ένα από τα διδεοξανάλόγά τους (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP), τότε η επιμήκυνση τερματίζεται, επειδή τα ddNTPs δεν φέρουν 3'-OH άκρο και η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με άλλο νουκλεοτίδιο. Κάθε ένα από τα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια είναι σημειωμένα με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (dye-labeled terminators).

Για την αντίδραση της ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA απαιτούνται 50ng καθαρισμένου προϊόντος της PCR, τα οποία αναμειγνύονται με έτοιμο μίγμα αντίδρασης Big Dye Termination Ready Reaction Mix (RoRo Mix), version 3.1 (Applied Biosystems, USA), το οποίο περιέχει *Taq* πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος αλληλούχισης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 9) με την προσθήκη του εκκινητή (primer) που έχει τη

μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη. Η αντίδραση επιμήκυνσης των εκκινητών πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και γίνεται κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό της PCR, δηλαδή χρησιμοποιούνται εναλλασσόμενα στάδια θερμικής αποδιάταξης στους 94° C, υβριδισμού του εκκινητή στους 55° C και επέκτασης ή διδεοξυτερματισμού στους 72° C.

Στη συνέχεια, το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης υπόκειται σε καθαρισμό με στήλη Sephadex G-50, με σκοπό την απομάκρυνση των σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την αντίδραση, καθώς και ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους έως και 20 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 2.5. Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας από την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος έως την αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με την ανάγνωση του χρωματογραφήματος που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα.

Τα σημασμένα τμήματα DNA που παράγονται τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (POP-7 Polymer, Applied Biosystems) και ανιχνεύονται από διάταξη laser αισθητήρων και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Με την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των

μορίων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Τα μόρια κατά την έξοδό τους από το τριχοειδές διέρχονται από δέσμη laser, ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική καταγραφική συσκευή (CCD camera). Κάθε φθορίζουσα ουσία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου του κάθε μορίου.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis v 5.2), είναι δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ηλεκτροφερογράφημα (electropherogram), μια αλληλουχία κορυφών (peaks) τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA.



Εικόνα 2.6. Ο αυτόματος αναλυτής ABI Prism 3130 Genetic Analyzer της Applied Biosystems που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.

3. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα MedCalc (MedCalc software, Ostend, Belgium). Στα περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος, οι τιμές αναφέρονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (εύρος δείγματος). Ο έλεγχος της κανονικότητας έγινε με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Για τις ποσοτικές μεταβλητές οι οποίες ακολουθούν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το t-test, ενώ για εκείνες που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή το Mann-whitney U-test αντιστοίχως. Επιπλέον, ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 εφαρμόστηκε για να εξετάσουμε τη συνάφεια μεταξύ δύο ποιοτικών μεταβλητών με την έννοια της ανεξαρτησίας μεταξύ των γραμμών και στηλών του πίνακα διπλής εισόδου (ή συνάφειας)

των δύο μεταβλητών. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις αποτιμήθηκαν μετά τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης rho του Spearman. Τέλος, για την πολυπαραγοντική ανάλυση της διαταραχής των διαιτητικών συνηθειών και της διαταραχής του ύπνου χρησιμοποιήθηκε η λογαριθμική παλινδρόμηση. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p=0.05$.

ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ψυχοσωματικές μετρήσεις

1.1. Γενική περιγραφή δείγματος

Το δείγμα αποτελούταν από 41 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση ΛΥΑ ηλικίας 15 έως 22 έτη και 86 έφηβες και νέες γυναίκες με φυσιολογική έμμηνο ρύση ηλικίας 14 έως 22 έτη. Η μέση ηλικία ήταν 17.8 ± 1.79 έτη για ομάδα της ΛΥΑ και 18.32 ± 2.73 έτη για την ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την ηλικία ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0.27$). Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στο σωματικό βάρος ($p=0.06$) και τον δείκτη μάζας σώματος ($p<0.0001$). Οι ασθενείς με ΛΥΑ, ήταν, όπως αναμενόταν περισσότερο ελλιποβαρείς σε σχέση με εκείνες της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, ο μέσος δείκτης μάζας σώματος στην ομάδα της ΛΥΑ ήταν $19.78 \pm 0.62 \text{ Kg/m}^2$, έναντι 21.4 ± 1.89 της ομάδας ελέγχου. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων καθώς επίσης και το ορμονικό προφίλ των ασθενών με ΛΥΑ.

Πίνακας 1. Δημογραφικά στοιχεία και ορμονικό προφίλ

	ΛΥΑ	Ομάδα ελέγχου	p-value
Ηλικία (έτη)	17.8 ± 1.79 (15-22)	18.32 ± 2.73 (14-24)	0.27
BMI (Kg/m ²)	19.78 ± 0.62 (18.5-21.1)	21.4 ± 1.89 (18-25)	<0.0001
Ύψος (m)	168 ± 2.79 (163-175)	164.86 ± 5.46 (150-178)	0.0001
Βάρος (Kg)	56.39 ± 2.51 (52-62)	58.23 ± 5.87 (47-70)	0.06
Εκπαίδευση (έτη)	11.8 ± 1.79 (9-16)	13.4 ± 2.74 (8-18)	0.0009
LH (IU/L)	0.75 ± 0.32 (0.3-1.5)	ΔΜ	
FSH (IU/L)	0.98 ± 0.36 (0.3-1.8)	ΔΜ	
Προλακτίνη (ng/ml)	13.06 ± 3.01 (6.5-19)	ΔΜ	

1.2. Διαταραγμένες διατροφικές συμπεριφορές

Είκοσι από τις 41 (48.8%) ασθενείς με ΛΥΑ και 10 από τις 86 (11.6%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν διαταραγμένη διατροφική συμπεριφορά (EAT-26 ≥20). Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στις τιμές του ερωτηματολογίου EAT-26 ($p<0.0001$) ανάμεσα στις δύο ομάδες καθώς επίσης και στις υποκλίμακες της δίαιτας ($p=0.03$) και της βουλημίας ($p<0.001$).

Ο πίνακας 2 παρουσιάζει τις τιμές του ερωτηματολογίου EAT-26 καθώς και των υποκλιμάκων του ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Πίνακας 2. Εκτίμηση των διατροφικών συμπεριφορών με την χρήση του ερωτηματολογίου EAT-26 σε ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (ΛΥΑ) και σε ευμνηνορρικές γυναίκες (ομάδα ελέγχου).

	ΛΥΑ	Ομάδα ελέγχου	p-value
EAT-26 < 20	21(51.2%)	76(88.4%)	
EAT-26 ≥ 20	20(48.8%)	10(11.6%)	<0.0001
EAT-26 score	18.75 ± 5.46 (8-26)	10.86 ± 5.95 (3-29)	<0.0001
Υποκλίμακα δίαιτας	11.8 ± 3.1	8.27 ± 4.23	0.03
Υποκλίμακα βουλιμίας	3.85 ± 1.7	1.66 ± 1.01	<0.0001
Έλεγχος φαγητού	3.07 ± 1.39	1.39 ± 1.1	0.09

1.3. Διαταραχές του ύπνου

Εικοσιπέντε από τις 41 (61%) ασθενείς με ΛΥΑ και 21 από τις 86 (24.4%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν διαταραχές του ύπνου (AIS-8≥6). Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στις τιμές του ερωτηματολογίου AIS-8 ($p=0.004$) ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στις υποκλίμακες του

αυξημένου αριθμού αφυπνίσεων κατά τη διάρκεια της νύχτας ($p=0.03$), της πρόωρης τελικής αφύπνισης ($p<0.0001$), της ανεπαρκούς διάρκειας του ύπνου ($p=0.0009$), της κακής ποιότητας του ύπνου ($p<0.0001$) και της αυξημένης ημερήσιας υπνηλίας ($p<0.0001$) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Εκτίμηση των διαταραχών του ύπνου με την χρήση της κλίμακας αϋπνίας Αθηνών ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (ΛΥΑ) και σε ευμνηνορροικές γυναίκες (ομάδα ελέγχου).

	ΛΥΑ	Ομάδα ελέγχου	p-value
AIS-8 < 6	16(39%)	67(75.6%)	
AIS-8 ≥ 6	25(61%)	21(24.4%)	<0.0001
AIS-8	6.48 ± 2.79 (2-13)	4.88 ± 2.93 (1-14)	0.004
Έλευση ύπνου	0.6 ± 0.54 (0-2)	0.67 ± 0.71 (0-3)	0.6
Αφυπνίσεις κατά τη διάρκειά του	0.97 ± 0.48 (0-2)	0.53 ± 0.68 (0-3)	0.003
Τελική αφύπνιση	1.09 ± 0.49 (0-2)	0.45 ± 0.6 (0-3)	<0.0001
Συνολική διάρκεια ύπνου	1.31 ± 0.64 (0-3)	0.89 ± 0.65 (0-3)	0.0009
Ποιότητα ύπνου	1.31 ± 0.64 (0-3)	0.38 ± 0.55 (0-2)	<0.0001
Διάθεση κατά τη διάρκεια της ημέρας	0.46 ± 0.5 (0-1)	0.62 ± 0.57 (0-2)	0.12
Λειτουργική ικανότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας	0.36 ± 0.48 (0-1)	0.44 ± 0.52 (0-2)	0.44
Υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας	0.36 ± 0.53 (0-2)	0.87 ± 0.5 (0-2)	<0.0001

1.4. Άγχος και ανησυχία για πρόσληψη βάρους

Στατιστικά υψηλότερες τιμές του STAI βρέθηκαν στην ομάδα των ασθενών με ΛΥΑ. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή του STAI στην ομάδα των ασθενών με ΛΥΑ ήταν 65.75 ± 6.09 έναντι 56.34 ± 9.48 της ομάδας ελέγχου ($p < 0.0001$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων αναφορικά με τον αριθμό των γυναικών με τιμές $\text{STAI} \geq 55$ ($p = 0.66$). Συγκεκριμένα, 26 από τις 41 (63.4%) ασθενείς με ΛΥΑ και 51 από τις 86 (59.3%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν τιμές $\text{STAI} \geq 55$ (Πίνακας 4).

Εικοσιτέσσερις από τις 41 (58.5%) ασθενείς με ΛΥΑ και 10 από τις 86 (11.6%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν τιμές $\text{MBSRQ} \geq 2.5$. Η διαφορά αυτή βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.0001$). Επίσης, η μέση τιμή MBSRQ στην ομάδα των ασθενών με ΛΥΑ (2.68 ± 0.97) βρέθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ($p < 0.0001$) σε σχέση με εκείνη της ομάδας ελέγχου (1.79 ± 0.77) (Πίνακας 4).

Ο πίνακας 4 παρουσιάζει την εκτίμηση του άγχους και της ανησυχίας για την εικόνα του σώματος στις έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ και στην ομάδα ελέγχου μέσω της χρήσης των ερωτηματολογίων STAI και MBSRQ αντίστοιχα.

Πίνακας 4. Εκτίμηση των επιπέδων άγχους και της αντίληψης της εικόνας σώματος μέσω των ερωτηματολογίων STAI και MBSRQ ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (ΛΥΑ) και σε ευμνηνορροϊκές γυναίκες (ομάδα ελέγχου).

	ΛΥΑ	Ομάδα ελέγχου	p-value
STAI < 55	15 (36.6%)	35 (40.7%)	
STAI ≥ 55	26 (63.4%)	51 (59.3%)	0.66
STAI	65.75 ± 6.09 (55-74)	56.34 ± 9.48 (38-75)	<0.0001
MBSRQ <2.5	17 (41.5%)	76 (88.4%)	
MBSRQ ≥ 2.5	24 (58.5%)	10 (11.6%)	<0.0001
MBSRQ	2.68 ± 0.97 (1-3.8)	1.79 ± 0.77 (1-4)	<0.0001

1.5. Φυσική δραστηριότητα

Τριάντα τέσσερεις από τις 41 (82.9%) ασθενείς με ΛΥΑ και 38 από τις 86 (44.2%) γυναίκες της ομάδας ελέγχου βρέθηκαν να εμφανίζουν τιμές IPAQ ≥ 1500. Η εβδομαδιαία ενεργειακή δαπάνη στην ομάδα της ΛΥΑ βρέθηκε όπως

αναμενόταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτή της ομάδας ελέγχου ($p=0.004$) (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Υπολογισμός της εβδομαδιαίας ενεργειακής δαπάνης σε ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια (ΛΥΑ) και σε ευμνηνορρικές γυναίκες (ομάδα ελέγχου).

	ΛΥΑ	Ομάδα ελέγχου	p-value
IPAQ<1500	7 (17.1%)	48 (55.8%)	
IPAQ ≥ 1500	34 (82.9%)	38 (44.2%)	<0.0001
IPAQ	2632.2 ± 1036.7 (891-4695)	2024.7 ± 1090.75 (377-4998)	0.004

1.6. Συσχέτιση των διατροφικών διαταραχών με προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες

Στατιστικά σημαντική αρνητική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του σκορ του ερωτηματολογίου EAT-26 και του δείκτη μάζας σώματος ($\rho=-0.36$, $p=0.02$), ενώ βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του σκορ του ερωτηματολογίου EAT-26 και του άγχους ($\rho=0.26$, $p=0.04$), της

εικόνας σώματος ($\rho=0.79$, $p<0.0001$) και της φυσικής δραστηριότητας ($\rho=0.35$, $p=0.03$) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Γραμμική συσχέτιση των τιμών του ερωτηματολογίου EAT-26 με άλλους προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες στην κοόρτη των ασθενών με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια.

	Rho	p-value
BMI	-0.36	0.02
Βάρος	-0.12	0.42
Ύψος	0.19	0.23
Ηλικία	-0.06	0.66
IPAQ	0.35	0.03
STAI	0.26	0.04
MBSRQ	0.79	<0.0001

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της γραμμικής συσχέτισης των υποκλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26 με τους ανωτέρω ψυχοσωματικούς παράγοντες. Στατιστικά σημαντική αρνητική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του BMI και των υποκλιμάκων της δίαιτας ($\rho= -0.32$, $p=0.04$) και του ελέγχου της τροφής ($\rho= -0.51$, $p=0.0008$), όπως επίσης και μεταξύ της σωματικής δραστηριότητας και της υποκλίμακας της δίαιτας ($\rho= -0.4$, $p=0.0009$).

Στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του άγχους και της υποκλίμακας της βουλιμίας ($\rho=-0.32$, $p=0.04$), καθώς επίσης και μεταξύ της αντίληψης της εικόνας σώματος με τις υποκλίμακες της δίαιτας ($\rho=0.74$, $p<0.0001$), της βουλιμίας ($\rho=0.69$, $p<0.0001$) και του ελέγχου της τροφής ($\rho=0.64$, $p<0.0001$) αντίστοιχα.

Ο πίνακας 7 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των υποκλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26 και διαφόρων ψυχοσωματικών προδιαθεσικών παραγόντων στην κοόρτη των ασθενών με ΛΥΑ.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των υποκλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26 και προδιαθεσικών ψυχοσωματικών παραγόντων στην κοόρτη της λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας.

	Rho	p-value
<i>EAT-26</i>		
<i>Δίαιτα</i>	-0.32	0.04
<i>Βουλιμία</i>	-0.22	0.15
<i>Έλεγχος τροφής</i>	-0.51	0.0008
<i>STAI</i>		
<i>Δίαιτα</i>	0.2	0.21
<i>Βουλιμία</i>	0.38	0.01
<i>Έλεγχος τροφής</i>	0.15	0.15
<i>MBSRQ</i>		

Δίαιτα	0.74	<0.0001
Βουλιμία	0.69	<0.0001
Έλεγχος τροφής	0.64	<0.0001
IPAQ		
Δίαιτα	-0.4	0.0009
Βουλιμία	-0.12	0.46
Έλεγχος τροφής	-0.3	0.6

Η διενέργεια πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι το άγχος και η αντίληψη της εικόνας σώματος αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την εκδήλωση συσλειτουργικών διατροφικών διαταραχών στην υπό μελέτη κοόρτη εφήβων και νέων γυναικών με ΛΥΑ. Συγκεκριμένα, στην παρούσα υπό μελέτη κοόρτη η ανησυχία για την εικόνα σώματος σχετιζόταν με 12.2 φορές υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης δυσλειτουργικών διατροφικών διαταραχών ($p=0.0008$), ενώ τα υψηλά επίπεδα άγχους με 4.3 φορές υψηλότερη πιθανότητα ($p=0.04$) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης απεικονίζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης για τη συσχέτιση των δυσλειτουργικών διατροφικών συμπεριφορών με ψυχοσωματικούς παράγοντες.

	Σχετική πιθανότητα	95% διαστήματα εμπιστοσύνης	p-value
STAI	4.3	2.8 - 6.9	0.04
IPAQ	1.3	0.85 - 1.54	0.85
MBSRQ	12.2	9.3 - 14.2	0.008

1.7. Συσχέτιση των διαταραχών του ύπνου με άλλους προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες

Στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του σκορ του ερωτηματολογίου AIS-8 και του υψηλών επιπέδων άγχους ($\rho=0.79$, $p<0.0001$) (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Γραμμική συσχέτιση των τιμών του ερωτηματολογίου AIS-8 με άλλους προδιαθεσικούς ψυχοσωματικούς παράγοντες στην κοόρτη των ασθενών με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια.

Rho	p-value
-----	---------

STAI	0.79	<0.0001
EAT-26	0.2	0.2
MBSRQ	0.26	0.1
IPAQ	0.01	0.95

Επιπροσθέτως, στατιστικά σημαντική θετική γραμμική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των υψηλών επιπέδων άγχους και των υποκλιμάκων της έλευσης του ύπνου ($\rho=0.53$, $p=0.0004$), της αφύπνισης ($\rho=0.6$, $p<0.0001$), της συνολικής διάρκειας του ύπνου ($\rho=0.64$, $p<0.0001$), της ποιότητας του ύπνου ($\rho=0.63$, $p<0.0001$), της διάθεσης κατά τη διάρκεια της ημέρας ($\rho=0.34$, $p=0.03$) και της ημερήσιας υπνηλίας ($\rho=0.51$, $p=0.007$) (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των υποκλιμάκων του ερωτηματολογίου AIS-8 και προδιαθεσικών ψυχοσωματικών παραγόντων στην κοόρτη της λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας.

	Rho	p-value
Έλευση ύπνου	0.53	0.0004
Αφυπνίσεις κατά τη διάρκεια της νύχτας	0.6	<0.0001
Τελική αφύπνιση	0.42	0.006
Συνολική διάρκεια ύπνου	0.64	<0.0001
Ποιότητα του ύπνου	0.63	<0.0001
Διάθεση κατά τη διάρκεια της ημέρας	0.34	0.03
Λειτουργικότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας	0.23	0.14
Ημερήσια υπνηλία	0.51	0.007

Τέλος, η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση έδειξε ότι σε αυτή την κοόρτη εφήβων και νέων γυναικών με ΛΥΑ τα υψηλά επίπεδα άγχους αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ανάπτυξη διαταραχών του ύπνου. Συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη υπό μελέτη κοόρτη, τα υψηλά επίπεδα άγχους σχετίζονταν με 2.83 φορές υψηλότερη πιθανότητα για την ανάπτυξη διαταραχών του ύπνου ($p=0.04$) (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Αποτελέσματα πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης για τη συσχέτιση των διαταραχών του ύπνου με ψυχοσωματικούς παράγοντες.

	Σχετική πιθανότητα	95% διαστήματα εμπιστοσύνης	p-value
STAI	2.83	1.0 - 8.0	0.04
EAT-26	0.81	0.37 - 1.77	0.6
IPAQ	1.0	0.99 - 1.00	0.98
MBSRQ	1.17	1. - 95.54	0.94

2. Μοριακός έλεγχος του γονιδίου PROKR2

Η ανάλυση του γονιδίου PROKR2 πραγματοποιήθηκε σε 41 ασθενείς με ΛΥΑ, 23 ασθενείς με ΙΥΥ ή σύνδρομο Kallmann και 20 γυναίκες με φυσιολογική έμμηνο ρύση αντίστοιχα.

Η ανάλυση των των δύο κωδικοποιούντων εξονίων καθώς και των εγγείς περιοχών μεταξύ των εξονίων και των ενδονίων αποκάλυψε οκτώ νέες μεταλλάξεις σε τέσσερις από τους 41 ασθενείς με ΛΥΑ είτε με την μορφή ετεροζυγωτίας (δύο ασθενείς) είτε με την μορφή ομοζυγωτίας (τρεις ασθενείς). Οι μεταλλάξεις αυτές περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2 σε ασθενείς με λειτουργική υποθαλαμική αμηνόρροια.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ
Ασθενής 1	c.241 G>C (ομοζυγωτία)
Ασθενής 2	c.375 A>G (ετεροζυγωτία) c.396 G>T (ετεροζυγωτία) c.404 C>G (ετεροζυγωτία) c.410 C>A (ετεροζυγωτία)
Ασθενής 3	c.404 A>G (ετεροζυγωτία) c.421 G>A (ετεροζυγωτία)
Ασθενής 4	c.475 G>T (ομοζυγωτία)

Επιπροσθέτως, τρεις νέες μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2 βρέθηκαν σε δύο απο τους 23 ασθενείς με ΙΥΥ ή σύνδρομο Kallmann, όλες με την μορφή ετεροζυγωτίας (Πίνακας 13). Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στην κοόρτη των γυναικών με φυσιολογική έμμηνο ρύση.

Πίνακας 13. Μεταλλάξεις του γονιδίου *PROKR2* σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ
Ασθενής 1	c.246 C>T (ετεροζυγωτία)
Ασθενής 2	c.252 C>T (ετεροζυγωτία) c.259 G>C (ετεροζυγωτία)

Ζ. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η παθοφυσιολογία της ΛΥΑ είναι πολύπλοκη και δεν χαρακτηρίζεται απλά ως μια μεμονωμένη απορύθμιση της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH. Έχει συσχετιστεί με συναισθηματικούς, συμπεριφορολογικούς και ψυχοσωματικούς παράγοντες που μεμονωμένα ή συνεργικά οδηγούν σε απορρύθμιση του υποθαλάμου (Berga SL et al, 2006, Michopoulos V et al, 2013). Προηγούμενες μελέτες υπογράμμισαν τον ρόλο των ψυχοσωματικών παραγόντων στην παθογένεση της ΛΥΑ, ωστόσο ο κομβικός ρόλος των διαταραχών του ύπνου σε αυτούς τους πληθυσμούς δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Δεδομένου ότι οι αγχώδεις διαταραχές και οι διαταραχές του ύπνου συχνά συνυπάρχουν, υποθέσαμε ότι η επίπτωση των διαταραχών του ύπνου θα είναι αυξημένη σε ασθενείς με ΛΥΑ. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήσαμε, για πρώτη φορά, τις διαταραχές του ύπνου σε Ελληνίδες έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ και την πιθανή αλληλοσυσχέτιση τους με γνωστούς ψυχοσωματικούς προδιαθεσικούς παράγοντες.

Σε αυτή την κοόρτη, σχεδόν έξι στις δέκα γυναίκες με ΛΥΑ παρουσίαζαν διαταραχές του ύπνου, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα του σχετικού ερωτηματολογίου, ενώ οι γυναίκες με υψηλά επίπεδα στρες παρουσίαζαν τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση διαταραχών του ύπνου. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η αϋπνία χαρακτηριζόταν από ένα ευρύ φάσμα

διαταραχών του ύπνου, ενώ το άγχος φαίνεται να χαρακτηρίζεται επίσης από ένα ευρύ φάσμα αρνητικής επίδρασης στα μοτίβα του ύπνου (Tranoulis A et al, 2019). Συγκεκριμένα, τα υψηλά άγχους συσχετίζονται σημαντικά με την καθυστερημένη έλευση του ύπνου, αυξημένο αριθμό αφυπνίσεων κατά τη διάρκεια της νύχτας, πρόωρη τελική αφύπνιση, ανεπαρκή διάρκεια του ύπνου, κακή ποιότητα του ύπνου, καθώς επίσης με μειωμένη διάθεση κατά τη διάρκεια της ημέρας και αυξημένη ημερήσια υπνηλία.

Οι αγχώδεις διαταραχές έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με τις διαταραχές του ύπνου, ενώ η πειραματική πρόκληση άγχους έχει βρεθεί ότι προκαλεί σημαντική αρνητική επίδραση στα φυσιολογικά μοτίβα του ύπνου (Germain A et al, 2003, Kahn M et al, 2013). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το στρες θεωρείται ο κύριος παράγοντας για την ανάπτυξη αϋπνίας (American Academy OF Sleep Medicine, 2005). Αυτή η συσχέτιση φαίνεται να είναι πολύπλοκη και αμφίδρομη. Τα υψηλά επίπεδα στρες φαίνεται ότι διαταράσσουν το φυσιολογικά μοτίβα ύπνου, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε διαταραγμένες συναισθηματικές και ψυχοσωματικές συμπεριφορές, δημιουργώντας και συντηρώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο (Dinges DF et al, 2006, Lim J et al, 2010, Astill RG et al, 2012).

Οι διαταραχές του ύπνου πιθανώς μειώνουν τον ψυχολογικό ουδό αντίληψης ενός γεγονότος ως στρεσογόνο. Οι Babson et al μελέτησαν την επίπτωση της αϋπνίας όσον αφορά την ανάπτυξη αγχώδους διαταραχής και κατάθλιψης σε φυσιολογικούς ενήλικες, υπογραμμίζοντας την εξαιρετικά αρνητική επίδρασή της στην έκλυση αρνητικών συναισθημάτων (Babson KA et al, 2010). Το αν οι

διαταραχές του ύπνου επιδρούν μεμονωμένα στην απορρύθμιση του υποθαλάμου δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Είναι πιθανό ωστόσο να εμπλέκεται στα πολύπλοκα νευροενδοκρινικά μονοπάτια που αφορούν τον άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια'. Επιπροσθέτως, αρνητική συσχέτιση της αϋπνίας με τα νυχτερινά επίπεδα μελατονίνης και LH έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Brzezinski A et al, 1987). Γυναίκες με ΛΥΑ παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος εκκριτικών αιχμών μελατονίνης και μεγαλύτερης διάρκειας έκκριση κατά τις πρωινές ώρες (Aleandri V et al, 1996). Τέλος, η μελατονίνη φαίνεται να σχετίζεται με την άμεση κυκλική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών, με μεσοδιαστήματα της τάξεως των 24 ωρών (Roy D et al, 2002).

Θεωρητικά το στρες δύναται να επηρεάσει τον ύπνο μέσω διαφόρων μηχανισμών. Η ικανότητα ομαλής ανταπόκρισης και συναισθηματικής αρμονίας σε περιπτώσεις στρεσογόνων γεγονότων, ενδέχεται να επηρεάζει τον βαθμό επίδρασης του στρες στην ποιότητα του ύπνου (Aleandri V et al, 1996). Οι γυναίκες με ΛΥΑ χαρακτηρίζονται συχνά από ανεπαρκείς μηχανισμούς διαχείρισης στρεσογόνων γεγονότων και δυσλειτουργικές συμπεριφορές όπως τελειομανία, μη ρεαλιστικούς στόχους, έντονη ανησυχία για την γνώμη τρίτων, χαμηλή αυτοεκτίμηση και υψηλά επίπεδα άγχους (Berga SL et al, 1996). Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν έντονη ανησυχία για την εικόνα του σώματός τους, τη δίαιτα και την πρόσληψη σωματικού βάρους (Berga SL et al, 1996). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ξεκάθαρα υποδηλώνουν την υψηλή επίπτωση άγχους και έντονης ενασχόλησης με την

εικόνα σώματος. Τα ανωτέρω είναι πιθανό να εγείρουν ψυχικές και συναισθηματικές διαταραχές, που με τη σειρά τους επηρεάζουν αρνητικά σε ποικίλο βαθμό τα μοτίβα του ύπνου. Ακολούθως, οι διαταραχές του ύπνου επιβαρύνουν τις ήδη υπάρχουσες αγχώδεις διαταραχές, οδηγώντας έτσι σε έναν φαύλο κύκλο με κοινό παρονομαστή τη διαταραχή του ύπνου (Morin CM et al, 2003, Sadeh A et al, 2004). Όπως αναμενόταν, η έντονη σωματική δραστηριότητα ήταν ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της κοόρτης των γυναικών με ΛΥΑ. Η θετική επίδραση της σωματικής δραστηριότητας στην ποιότητα του ύπνου είναι γνωστή απο προηγούμενες μελέτες, ενώ άτομα που πάσχουν από αϋπνία φαίνεται να επωφελούνται από αυτή (Chennaoui M et al 2015). Επιπλέον, φαίνεται ότι η σωματική δραστηριότητα βελτιώνει την αυτοεκτίμηση και τις νοητικές λειτουργίες, ενώ μειώνει τα επίπεδα άγχους και κατάθλιψης (Sharma A et al, 2006). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθη σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της σωματικής άσκησης και των διαταραχών του ύπνου.

Η ευαισθησία των ασθενών στα στρεσογόνα ερεθίσματα φαίνεται να οδηγεί σε χαμηλό ουδό ενεργοποίησης του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' και ακολούθως σε υψηλότερα επίπεδα εκλυτικής ορμόνης της CRH, της αδενοκορτικοτροπίνης (ACTH) και της κορτιζόλης. Η αρνητική επίδραση του στρες στην παθοφυσιολογία της ΛΥΑ είναι γνωστή. Προηγούμενες μελέτες υπογράμμισαν την συσχέτιση της με νευροψυχολογικούς παράγοντες και κατέδειξαν υψηλά επίπεδα κορτιζόλης ορού και εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Berga SL et al, 2000, Brundu B et al, 2006, Bomba M et al, 2007, Lawson EA

et al, 2009, Sanders KM et al, 2018). Επιπρόσθετα, η αποκατάσταση της ωοθηκικής λειτουργίας συνοδεύεται με σημαντική μείωση των επιπέδων κορτιζόλης ορού αίματος (Berga SL et al, 2000). Ο ύπνος γρήγορων κινήσεων των ματιών (Rapid Eye Movement, REM) χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα ACTH ορού, ενώ οι διαταραχές του ύπνου δύνανται να οδηγήσουν σε διαταραχή της διακύμανσης της έκκρισης της κορτιζόλης κατά τη διάρκεια της ημέρας (Ahrberg K et al, 2012). Η λειτουργία του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' παρουσιάζεται επίσης αυξημένη κατά τη διάρκεια του ύπνου REM και σημαντικά μειωμένη κατά τη διάρκεια του ύπνου αργών κυμάτων (slow-wave sleep) (Staner L, 2003). Με βάση τα ανωτέρω, αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ του ύπνου και του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' φαίνεται να εξηγεί εν μέρει την επίδραση του άγχους στα μοτίβα του ύπνου και αντιστρόφως.

Στη παρούσα μελέτη μελετήθηκε επίσης η επίπτωση των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών σε έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ και η πιθανή συσχέτιση τους με άλλους ψυχοσωματικούς στρεσογόνους παράγοντες. Οι διατροφικές διαταραχές αποτελούν έναν αναγνωρισμένο προδιαθεσικό παράγοντα της απορρύθμισης της ΛΥΑ (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Οι διαταραχές συμπεριφοράς, η συναισθηματική αστάθεια και οι άλλοι ψυχοσωματικοί παράγοντες που ενέχονται στη παθογένεση της ΛΥΑ, ενδέχεται να προάγουν επίσης την ανάπτυξη διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Υποθέσαμε ότι οι γυναίκες με ΛΥΑ χαρακτηρίζονται από διαταραγμένες διαιτητικές

συμπεριφορές και ότι η συνύπαρξη της ΛΥΑ και διατροφικών διαταραχών ενδέχεται να πυροδοτείται από κοινά στρεσογόνα ερεθίσματα. Μελετήσαμε λοιπόν τον ρόλο των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών στην ανάπτυξη της ΛΥΑ και τον αμοιβαίο ρόλο των ψυχοπαθολογικών χαρακτηριστικών στην παθοφυσιολογία αμφότερων των διαταραχών.

Η ομάδα των ασθενών με ΛΥΑ παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη επίπτωση διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών σε σχέση με τις ευμηνorroϊκές γυναίκες. Παρόλο που ασθενείς με ΝΑ ή νευρογενή βουλιμία δεν συμπεριλήφθηκαν σε αυτή την μελέτη, οι ασθενείς με ΛΥΑ βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη επίπτωση περιοριστικού και βουλιμικού τύπου διαιτητικών διαταραχών, οι οποίες ενδέχεται να εξελιχθούν μελλοντικά σε παθολογικές διαιτητικές διαταραχές (ΝΑ ή βουλιμία). Επίσης, η παρούσα μελέτη έδειξε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των διαταραγμένης διαιτητικής συμπεριφοράς με το στρες, την ανησυχία για την εικόνα του σώματος και την σωματική άσκηση αντιστοίχως.

Συγκεκριμένα, σε αυτή την κοόρτη σχεδόν οι μισές από τις γυναίκες με ΛΥΑ βρέθηκε να παρουσιάζουν διαταραγμένες διαιτητικές συμπεριφορές. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με εκείνα προηγούμενων μελετών (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Η επακόλουθη ανάλυση των υπο-κλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26 αποκάλυψε ότι οι ασθενείς με ΛΥΑ είναι δυνατό να παρουσιάζουν τόσο περιοριστικού όσο και βουλιμικού τύπου συμπτώματα. Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερης κλινικής σημασίας δεδομένου ότι προηγούμενες σχετικές μελέτες είχαν δείξει ότι οι ασθενείς με ΛΥΑ συνήθως

παρουσιάζουν περιοριστικού τύπου διαιτητικές διαταραχές (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Η παρούσα μελέτη υπογραμμίζει ότι οι βουλιμικού τύπου διαιτητικές διαταραχές μπορούν επίσης να χαρακτηρίζουν αυτούς τους πληθυσμούς. Το τελευταίο παρέχει μια βαθύτερη εικόνα στην πολύπλοκη συμπτωματολογία των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών στις γυναίκες με ΛΥΑ και υπογραμμίζει την πολυδιάστατη φύση της διαταραχής. Η υψηλότερη επίπτωση διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών ανάμεσα στις γυναίκες με ΛΥΑ εξηγεί εν μέρει και τον σημαντικά χαμηλότερο δείκτη μάζα σώματος που χαρακτήριζε αυτή την ομάδα. Επιπροσθέτως, σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και όλων των υπο-κλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26, υποδηλώνοντας έτσι μία άμεση ισχυρή συσχέτιση. Αυτά τα ευρήματα είναι εξαιρετικής κλινικής σημασίας όσον αφορά την μελέτη των διαιτητικών συμπεριφορών στις γυναίκες με ΛΥΑ. Οι κλινικοί ιατροί θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη την υψηλότερη επίπτωση των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών σε αυτούς τους πληθυσμούς, καθώς επίσης και την ποικιλομορφία των συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα συνήθως σε αυτές τις περιπτώσεις είναι υπο-κλινικά, ωστόσο δύνανται να εξελιχθούν σε κλινικά σε περίπτωση που δεν αναγνωριστούν εγκαίρως.

Η έντονη σωματική άσκηση αποτελεί επίσης έναν πιθανό παράγοντα, ο οποίος εξηγεί τον σημαντικά χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος στην ομάδα των γυναικών με ΛΥΑ. Η παρούσα ανάλυση έδειξε μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έντασης της σωματικής δραστηριότητας με τις υπο-

κλίμακες της δίαιτας και του ελέγχου του φαγητού αντίστοιχα. Η σωματική δραστηριότητα συνδυάζεται συχνά με μειωμένη πρόσληψη θερμίδων, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις πάσχουσες από ΝΑ (Allaway HC et al, 2016). Επιπλέον, οι γυναίκες με διατροφικές διαταραχές παρουσιάζουν συχνότερα μια τάση για ιδιαίτερα έντονη σωματική άσκηση (Allaway HC et al, 2016). Η έντονη σωματική άσκηση και οι διατροφικές διαταραχές ενδέχεται να δρουν συνεργικά οδηγώντας σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο και επακόλουθη απορρύθμιση του υποθαλάμου (Berga SL, Pauli SA). Η χρόνια ενεργειακή ανεπάρκεια πυροδοτεί αντισταθμιστικούς μηχανισμούς, όπως η απώλεια σωματικού βάρους και η ενεργειακή συντήρηση (Allaway HC et al, 2016, Berga SL, Pauli SA). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει χαμηλές συγκεντρώσεις λεπτίνης σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα γκρελίνης και ΝΥΥ σε ασθενείς με ΛΥΑ (Misra M et al, 2006, Schneider LF et al, 2006, Nakahara T et al, 2007, Pfluger PT et al, 2007, Christo K et al, 2008, Scheid JL et al, 2009, Scheid JL et al, 2011). Μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών περιοριστικού τύπου και της ορμονικής απορρύθμισης σχετιζόμενης με την πείνα έχει αναφερθεί σε ασθενείς με ΛΥΑ (Schneider LF et al, 2008).

Η συσχέτιση μεταξύ των διαταραγμένων διατροφικών συμπεριφορών και της ΛΥΑ φαίνεται να είναι πολύπλοκη και χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργικές συμπεριφορές και ψυχοκοινωνικές διαταραχές, οι οποίες αμοιβαία επηρεάζουν τα συμπτώματα και την αιτιολογία αμοτέρων των διαταραχών. Οι Berga et al διατύπωσαν την αρχή ότι μεταβολικοί και ψυχοκοινωνικοί παράγοντες

οδηγούν από κοινού στην ανάπτυξη της ΛΥΑ (Berga SL et al). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ταιριάζουν με το ανωτέρω μοντέλο. Η παρούσα ανάλυση αποκάλυψε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα άγχους στην ομάδα των γυναικών με ΛΥΑ. Επίσης η μελέτη λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα άγχους αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ανάπτυξη διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών. Συγκεκριμένα, σε αυτή την κοόρτη, οι γυναίκες με ΛΥΑ και υψηλά επίπεδα άγχους παρουσίαζαν τέσσερις φορές υψηλότερη πιθανότητα για την ανάπτυξη διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών. Φαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα άγχους ενδέχεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη τόσο της ΛΥΑ όσο και των διαταραγμένων διαιτητικών διαταραχών και ότι η παθογένεση των δύο αυτών διαταραχών δεν είναι ανεξάρτητη. Το άγχος αποτελεί γνωστό προδιαθεσικό παράγοντα της ΛΥΑ σχετιζόμενης με το στρες (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014, Tranoulis A et al, 2019), ενώ προηγούμενες μελέτες έχουν υπογραμμίσει την σημαντική επίπτωση των αγχωδών διαταραχών σε γυναίκες με διατροφικές διαταραχές (Swinbourne J et al, 2012, Martinussen M et al, 2017, Martinfernandez KW et al, 2019). Φαίνεται λοιπόν ότι το άγχος έχει κομβικό ρόλο στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ΛΥΑ και των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών μέσω δικτύων παλινδρόμησης ρύθμισης. Το στρες ενδέχεται να οδηγεί στην ανάπτυξη άλλων συμπτωμάτων, τα οποία όλα μαζί οδηγούν στην διατήρηση αμοτέρων των διαταραχών. Συνεπώς, το στρες φαίνεται ότι μεσολαβεί σε κάποιο βαθμό στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο διαταραχών.

Οι ψυχολογικοί παράγοντες που αφορούν την αντίληψη της εικόνας του σώματος θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη. Η έντονη ανησυχία για την εικόνα του σώματος αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της παθοφυσιολογίας αμφοτέρων των διαταραχών (Stice E, 2002, Costarelli V et al, 2009). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η ανησυχία για την εικόνα του σώματος αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα για την ανάπτυξη δυσλειτουργικών διαιτητικών συμπεριφορών και ότι οι υψηλές τιμές του ερωτηματολογίου MBSRQ σχετίζονται με δώδεκα φορές υψηλότερη πιθανότητα επίσης υψηλών τιμών του ερωτηματολογίου EAT-26 στην ομάδα των γυναικών με ΛΥΑ. Όπως αναμενόταν, η παρούσα ανάλυση έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της ανησυχίας για την εικόνα του σώματος και όλων των υπο-κλιμάκων του ερωτηματολογίου EAT-26. Οι γυναίκες με ΛΥΑ παρουσιάζουν συχνά έντονη ανησυχία για την εικόνα του σώματος και φόβο σχετικά με την πρόσληψη σωματικού βάρους (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Οι ανεπαρκείς μηχανισμοί διαχείρισης στρεσογόνων γεγονότων και οι δυσλειτουργικές συμπεριφορές, όπως η ανάγκη αποδοχής και επιβράβευσης, η τελειομανία και η χαμηλή αυτοεκτίμηση που αποτελούν πιθανούς ενδοφαινότυπους σε ασθενείς με ΛΥΑ, ενώ επίσης συχνά χαρακτηρίζουν και τα άτομα με διατροφικές διαταραχές (Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014, Martinussen M et al, 2017, Martin-fernandez KW et al, 2019). Αυτές οι δυσλειτουργικές συμπεριφορές όπως επίσης και η ευαισθησία τους στο στρες ενδέχεται να πυροδοτήσει ψυχοσωματικά συμπτώματα και αγχώδεις διαταραχές, οδηγώντας ακολούθως στην ανάπτυξη και συντήρηση τόσο της ΛΥΑ όσο και των διατροφικών διαταραχών. Η αποσαφήνιση του ρόλου της

ανησυχίας για την εικόνα του σώματος σε αμφότερες τις διαταραχές, θα παίξει σημαντικό ρόλο σε μελλοντικές θεραπείες συμπεριφοράς.

Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικές και πρακτικές πληροφορίες σχετικά με τις διαταραχές του ύπνου, τις δυσλειτουργικές διαιτητικές συμπεριφορές, τα υψηλά επίπεδα άγχους και το ψυχοσωματικό προφίλ των γυναικών με ΛΥΑ και υπογραμμίζει την εξαιρετική κλινική σημασία της έγκαιρης αναγνώρισης των ανωτέρω ψυχοκοινωνικών παραμέτρων που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της ΛΥΑ. Όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη σημαντικές πληροφορίες αυτού του ψυχοσωματικού προφίλ είναι δυνατόν να συλλεχθούν μέσω αυτοσυμπληρούμενων ερωτηματολογίων. Δεδομένης της υψηλής επίπτωσης διαταραχών του ύπνου, των διαταραγμένων διαιτητικών συμπεριφορών και των υψηλών επιπέδων στρες, οι έφηβες και οι γυναίκες με ΛΥΑ χρήζουν ψυχολογικής εκτίμησης και διερεύνησης της ποιότητας του ύπνου. Η έγκαιρη αναγνώριση των ανωτέρω διαταραχών θα έχει ως αποτέλεσμα και την έγκαιρη παραπομπή των ασθενών για διατροφική και ψυχολογική υποστήριξη, καθώς επίσης για τις απαραίτητες παρεμβάσεις. Η έγκαιρη αναγνώριση υπο-κλινικών συμπτωμάτων διατροφικής διαταραχής δίνει τη δυνατότητα έγκαιρης παρέμβασης και δύναται να εμποδίσει την εξέλιξη τους σε παθολογικά κλινικά συμπτώματα. Επιπροσθέτως, η παρούσα μελέτη υπογραμμίζει την σημασία της λεπτομερούς κλινικής και ψυχολογικής εκτίμησης αυτών των ασθενών. Οι έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ συχνά δεν υποβάλλονται σε ψυχολογική εκτίμηση, καθώς η κλινική ή/και η γονική προσοχή συνήθως εστιάζεται στην αμηνόρροια. Συνεπώς η εκτίμηση των

ασθενών με ΛΥΑ πρέπει να είναι ολοκληρωμένη και να ξεπερνά τα στενά πλαίσια της μέτρησης του δείκτη μάζας σώματος και του ορμονολογικού ελέγχου. Οι θεράποντες ιατροί θα πρέπει να είναι ενήμεροι για τα υποκείμενα υπο-κλινικά καταθλιπτικά συμπτώματα και την υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης ψυχιατρικής διαταραχής σε γυναίκες με ΛΥΑ (Giles DE et al, 1993, Marcus MD et al, 2001, Bomba M et al, 2007, Bomba M et al, 2014). Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι θεραπείες συμπεριφοράς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές για την αναστροφή της διαταραχής και την αποκατάσταση της ωοθηκικής λειτουργίας (Berga SL et al, 2006, Michopoulos V et al, 2013). Μια βαθύτερη ανάλυση του ψυχοσωματικού προφίλ των ασθενών θα βοηθήσει τους θεράποντες ιατρούς να προσαρμόσουν τις θεραπείες συμπεριφοράς με τέτοιο τρόπο ώστε να εστιάζουν στο υποκείμενο στρες, ανησυχία για την εικόνα του σώματος και ίσως άλλα καταθλιπτικά συμπτώματα, με αποτέλεσμα την μείωση πιθανότητας κλινικών διαταραχών διατροφής και την αποκατάσταση της εμμήνου ρύσης.

Τέλος, η παρούσα μελέτη ανέλυσε τον ρόλο του γονιδίου του υποδοχέα της προκινετισίνης-2 (PROKR2) στην παθογένεση της ΛΥΑ. Η προκινετισίνη 2 και ο υποδοχέας της διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση και την επιβίωση των GnRH νευρώνων, καθώς και στη λειτουργική σύνδεση του άξονα της αναπαραγωγής με υποθαλαμικά κέντρα που καθορίζουν τους ορμονικούς ρυθμούς με βάση τους κύκλους φωτός και σκότους (Lin DC et al, 2002, Soga T et al, 2002). Ενώ η γενετική βάση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann έχει διερευνηθεί και αποσαφηνιστεί σε σημαντικό βαθμό, δεν ισχύει

το ίδιο και στην περίπτωση της λειτουργικής υποθαλαμικής αμηνόρροιας. Οι Caronia et al, υπέθεσαν ότι τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann ενδέχεται να διαδραματίζουν επίσης σημαντικό προδιαθεσικό ρόλο στις γυναίκες με ΛΥΑ (Caronia LM et al, 2011). Ανέλυσαν τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες των εξονίων και τις εγγείς ιντρονικές αλληλουχίες σε επτά γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann: KAL1, GNRHR, GPR54, FGFR1, FGF8, PROK2 και PROKR2. Η ανωτέρω μελέτη συμπεριέλαβε 55 ασθενείς με ΛΥΑ, 160 ασθενείς με ΙΥΥ και 422 γυναίκες με φυσιολογική έμμηνο ρύση. Τα ευρήματα συμπεριέλαβαν έξι ετερογενείς μεταλλάξεις σε επτά από τις 55 ασθενείς με ΛΥΑ που αφορούσαν τα γονίδια: FGFR1 (G260E, R756H), PROKR2 (R85H, L173R), GNRHR (R262Q) και KAL1 (V371I). Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν in vitro μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι αποτελούσαν αδρανοποιητικές μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις ανευρέθηκαν επίσης σε οκτώ από τις 160 ασθενείς με ΙΥΥ που αφορούσαν τα γονίδια PROKR2 και GNRHR. Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στην κοόρτη των ευμηνόρροϊκών γυναικών.

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες των δύο εξονίων του PROKR2 καθώς επίσης και τις εγγείς περιοχές μεταξύ των εξονίων και των ενδονίων. Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε οκτώ νέες μεταλλάξεις σε τέσσερις από τις 41 γυναίκες με ΛΥΑ, καθώς επίσης και δύο νέες μεταλλάξεις σε τρεις από τις 23 γυναίκες με ΙΥΥ.

Οι μεταλλάξεις αυτές ενδέχεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της διαταραχής, καθώς το PROKR2 εμπλέκεται στην διαδικασία μετανάστευσης των GnRH νευρώνων. Υποθέτουμε ότι η μειωμένη ή διαταραγμένη δράση του υποδοχέα της προκινετισίνης-2 επηρεάζει σε κάποιο βαθμό την λειτουργία του GnRH νευρωνικού δικτύου λόγω της μειωμένης παραγωγής GnRH κυττάρων, τα οποία έχουν επιτύχει εμβρυική μετανάστευση στον υποθάλαμο, ανεπαρκή ωρίμανση του GnRH δικτύου κατά την εφηβεία ή διαταραγμένη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH, καθώς αμφότερες οι πρωτεΐνες δεν εκφράζονται μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και στον υποθάλαμο ενήλικων γυναικών (Chung WC et al, 2008, Pitteloud N et al, 2007). Αυτό ενδέχεται να προδιαθέτει σε κάποιο βαθμό τις ασθενείς για διαταραγμένη έκκριση της GnRH κάτω από την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων. Επιπροσθέτως, η προκινετισίνη-2 φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση των διαιτητικών συμπεριφορών στους επίμυες (Gardiner JV et al, 2010, Sun HD et al, 2007). Συνεπώς, υποθέτουμε ότι μεταλλάξεις σε αυτά τα μονοπάτια ενδέχεται να συμβάλλουν σε κάποιο βαθμό στις διαταραγμένες διατροφικές συμπεριφορές που συχνά παρατηρούνται στις γυναίκες με ΛΥΑ.

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2 σε έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ, το οποίο επίσης σχετίζεται με την γενετική βάση του ΙΥΥ και του συνδρόμου Kallmann. Τα ευρήματα αυτά επεκτείνουν την γνώση μας σχετικά με την γενετική βάση των διαταραχών που σχετίζονται με την ανεπάρκεια της GnRH. Ο ΙΥΥ αποτελεί παραδοσιακά την εφ' όρου ζωής

γενετικά καθοριζόμενη και κληρονομική μορφή ανεπάρκειας της GnRH. Ωστόσο, 10% των ασθενών με ΙΥΥ διατηρούν φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία μετά την διακοπή της θεραπείας, ακόμα και αν παρουσιάζουν μεταλλάξεις στα προαναφερθέντα γονίδια. Το τελευταίο καταδεικνύει την πλαστικότητα του GnRH δικτύου και την ευαισθησία του σε μη γενετικούς παράγοντες, υποδηλώνοντας ότι η υποθαλαμική απορρύθμιση είναι αποτέλεσμα συνδυασμού γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Η ΛΥΑ θεωρείται παραδοσιακά ως μια λειτουργική μορφή GnRH ανεπάρκειας, η οποία αποδίδεται στην ενεργειακή ανεπάρκεια, στο στρες ή σε συνδυασμό τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το στρες είναι δυνατό να προκαλέσει αναπαραγωγική δυσλειτουργία σε αρκετές αλλά όχι σε όλες τις γυναίκες (Bullen BA et al, 1985, Centeno ML et al, 2007, Thome JL et al, 2007). Τα ευρήματά μας ενδέχεται να βοηθήσουν στην κατανόηση της ευαισθησίας κάποιων γυναικών στην κατασταλτική δράση του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' στην αναπαραγωγική λειτουργία. Σε περίπτωση που η ΛΥΑ παρουσιάζει γενετικό υπόβαθρο παρόμοιο με αυτό του ΙΥΥ, παραμένει να διευκρινιστεί ποιοί είναι οι παράγοντες που ρυθμίζουν την εμφάνιση αυτών των κλινικών φαινοτύπων ευρέος φάσματος.

Ασθενείς με ΙΥΥ ή σύνδρομο Kallmann συχνά εμφανίζουν ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία στις μεταλλάξεις των γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια εξετάστηκε το ενδεχόμενο το σύνδρομο Kallmann και ο ΙΥΥ να μην ακολουθούν την απλή μορφή κληρονομικότητας κατά Mendel, αλλά να παρουσιάζουν διγονιδιακά ή ολιγογονιδιακά

χαρακτηριστικά κληρονόμησης (Quaynor SD et al, 2011). Έξι μεταλλάξεις του γονιδίου PROKR2 σε ασθενείς με ΛΥΑ βρέθηκαν με τη μορφή ετεροζυγωτίας. Επίσης, τέσσερις διαφορετικές ετεροζυγωτίες ανιχνεύτηκαν σε μία ασθενή. Υποθέτουμε ότι αυτές οι ετεροζυγωτίες, αν και δεν είναι ικανές να προκαλέσουν την εμφάνιση ΙΥΥ, θα μπορούσαν να θέσουν ένα χαμηλότερο ουδό της ανασταλτικής παλίνδρομης ρύθμισης του άξονα 'υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια' κάτω από καταστάσεις στρες, ορμονικής απορρύθμισης ή και διατροφικών διαταραχών, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση ΛΥΑ. Ένας τέτοιος χαμηλός ουδός ενδέχεται να παρέχει πλεονέκτημα στις γυναίκες φορείς σε καταστάσεις έντονης ενεργειακής ανεπάρκειας, βοηθώντας προς την κατεύθυνση της επιβίωσης παρά αυτής των μεταβολικών αναγκών μιας πιθανής κύησης. Αυτή θα μπορούσε να αποτελεί και μία πιθανή εξήγηση για την παρουσία μεταλλάξεων σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με ΛΥΑ ή ΙΥΥ. Για παράδειγμα η μετάλλαξη PROKR2 L173R έχει βρεθεί σε μεγάλο αριθμό ασθενών με ΙΥΥ, κυρίως με την μορφή ετεροζυγωτίας, και σε αρκετές των περιπτώσεων κληρονομήθηκε από ασυμπτωματικούς γονείς (Thome JL et al, 2007, Miller KK et al, 1998, Monnier C et al, 2009, Code C et al, 2006).

Για την αποσαφήνιση της γενετικής βάσης της ΛΥΑ, οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να συμπεριλάβουν μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια του ΙΥΥ, καθώς επίσης και μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Θα είχε ιδιαίτερη σημασία να μελετηθεί εάν οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται επίσης με καθυστέρηση της ήβης. Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της όρεξης και του στρες, ενδέχεται να

εμπλέκονται επίσης στην παθοφυσιολογία της ΛΥΑ. Η γενετική προδιάθεση για ΝΑ ή βουλιμία έχει μελετηθεί σε διάφορες έρευνες, οι οποίες ανέλυσαν πιθανά σχετιζόμενα γονίδια όπως του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα, του υποδοχέα της νευροτροφικής τυροσινικής κινάσης τύπου 2 και 3, της σεροτονίνης, της λεπτίνης και της υποκρετίνης (ορεξίνης) (Mercader JM et al, 2007, Mercader JM et al, 2008). Θα ήταν έτσι σημαντικό να μελετηθούν πιθανές μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται με την ανταπόκριση σε σήματα πείνας και στρες, οι οποίες σε κάποιο βαθμό ενδέχεται να συμβάλλουν στην ευαισθησία των γυναικών για ανάπτυξη ΛΥΑ. Σε κάθε περίπτωση οι γενετικές ποικιλομορφίες που πηγάζουν από την διαφορετική εθνική προέλευση θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν.

Η. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, δείξαμε για πρώτη φορά ότι η επίπτωση των διαταραχών του ύπνου και είναι υψηλότερη στις έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ σε σχέση με τις ευμηνορροϊκές γυναίκες. Η επίπτωση των διαταραγμένων διατροφικών συμπεριφορών ήταν επίσης υψηλότερη σε αυτόν τον πληθυσμό. Δείξαμε ότι υπάρχει ξεκάθαρη συσχέτιση αμφότερων των διαταραχών με τα υψηλά επίπεδα άγχους. Τα ανωτέρω ευρήματα έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία υπογραμμίζοντας ότι η εκτίμηση των ασθενών με ΛΥΑ πρέπει να είναι ολοκληρωμένη και να ξεπερνά τα στενά πλαίσια της μέτρησης του δείκτη μάζας σώματος και του ορμονολογικού ελέγχου. Η έγκαιρη αναγνώριση υποκλινικών συμπτωμάτων είναι σημαντική για την αναγνώριση των ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από θεραπείες συμπεριφοράς. Οι θεραπείες αυτές θα μπορούσαν να αντιστρέψουν την ΛΥΑ βελτιώνοντας τις όποιες δυσλειτουργικές συμπεριφορές. Τέλος, δείξαμε για πρώτη φορά την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο PROKR2 σε Ελληνίδες έφηβες και νέες γυναίκες με ΛΥΑ. Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερος σημαντικά, υποδηλώνοντας την πιθανή εμπλοκή των γενετικών παραγόντων στην ευαισθησία των γυναικών αυτών σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα που οδηγούν στην ανάπτυξη λειτουργικής ανεπάρκειας της GnRH. Περαιτέρω μελέτες που θα συμπεριλάβουν μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων και ασθενών απαιτούνται για την διερεύνηση της γενετικής βάσης της ΛΥΑ. Η ανακάλυψη μεταλλάξεων οι

οποίες ενδεχομένως να ενοχοποιούνται για αυτή την ευαισθησία θα οδηγήσουν σε βαθύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας της ΛΥΑ και ενδεχομένως σε βελτιωμένες διαγνωστικές προσεγγίσεις και καινοτόμες θεραπείες.

Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abreu, A. P., Kaiser, U. B., and Latronico, A. C. The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology* . 2010; 91, 283–290.

Abreu, A. P., Noel, S. D., Xu, S., Carroll, R. S., Latronico, A. C., and Kaiser, U. B. Evidence of the importance of the first intracellular loop of prokineticin receptor 2 in receptor function. *Mol. Endocrinol.* 2012; 26, 1417–1427.

Ackerman KE, Slusarz K, Guereca G, Pierce L, Slattery M, Mendes N, Herzog DB, Misra M. Higher ghrelin and lower leptin secretion are associated with lower LH secretion in young amenorrheic athletes compared with eumenorrheic athletes and controls. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:E800–6.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382:250–2.

Ahrberg K, Dresler M, Niedermaler S, Steiger A, Genzel L. The interaction between sleep quality and academic performance. *J Psychiatr Res.* 2012; 46: 1618-1622.

Ajmal A, Joffe H, and Nachtigall LB (2014) Psychotropic-induced hyperprolactinemia: A clinical review. *Psychosomatics* 55: 29–36.

Akashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Svoboda ME, Van Wyk JJ. In vivo regulation of granulosa cell somatomedin- C/insulin-like growth factor I receptors. *Endocrinology* 1988; 122:1383–9.

Aleandri V, Spina V, Morini A. The pineal gland and reproduction. *Hum Reprod Update*. 1996; 3: 225-235.

Allaway HC, Southmayd EA, De Souza MJ. The physiology of functional hypothalamic amenorrhea associated with energy deficiency in exercising women and in women with anorexia nervosa. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016; 25: 91-119.

Alvarez-Castro P, Isidro ML, Garcia-Buela J, Leal-Cerro A, Broglio F, Tassone F, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF, Cordido F. Marked GH secretion after ghrelin alone or combined with GH-releasing hormone (GHRH) in obese patients. *Clin Endocrinol* 2004; 61:250–5.

American Academy of Sleep Medicine, 2005. ICSD-2. The International Classification of Sleep Disorders. Diagnostic and Coding Manual. 2nd ed.

Angelin B, Rudling M. Growth hormone and hepatic lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:160–5.

Arvat E, Maccario M, Di Vito L, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86:1169–74.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120:337–45.

Astill RG, Van der Heijden KB, Van Ijzendoorn MH, Van Someren EJ. Sleep, cognition, and behavioural problems in school-age children: a century of research meta-analyzed. *Psychol Bull.* 2012; 138: 119-38.

Babson KA, Trainor CD, Feldner MT, Blumenthal H. A test of the effects of acute sleep deprivation on general and specific self-reported anxiety and depressive symptoms: an experimental extension. *J Behav Ther Exp Psychiatry.* 2010; 41: 297-303.

Bachelot A, Monget P, Imbert-Bollere P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA, Binart N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 2002; 143:4104–12.

Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, Hodgson TK, Matthews KA, Pepine CJ, Reis SE, Reichek N, Rogers WJ, Pohost GM, Kelsey SF, Sopko G. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41:413–419.

Bannai C, Kuzuya N, Koide Y, Fujita T, Itakura M, Kawai K, Yamashita K. Assessment of the relationship between serum thyroid hormone levels and peripheral metabolism in patients with anorexia nervosa. *Endocrinol Japon* 1988; 35:455–62.

Barrett EJ. The thyroid gland. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. Medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012:1044–6.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003; 421:856–9.

Baumann G, Shaw MA, Amburn K. Circulating growth hormone binding proteins. *J Endocrinol Invest* 1994; 17:67–81.

Becker AE, Grinspoon SK, Klibanski A, Herzog DB. Eating disorders. *NEJM*. 1999; 340:1092–1098.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte- secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947–53.

Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:84–9.

Berga SL, Mortola JF, Yen SSC. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66:242e244.

Berga SL, Mortola JF, Girton L, et al. Neuroendocrine aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68:301e308.

Berga SL, Girton LG. The psychoneuroendocrinology of functional hypothalamic amenorrhea. *The Psychiatric Clinics of North America* 1989; 12(1):105–16.

Berga SL, Loucks AB, Rossmanith WG, Kettel LM, Laughlin GA, Yen SS. Acceleration of luteinizing hormone pulse frequency in functional hypothalamic amenorrhea by dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72:151e156.

Berga SL. Behaviorally induced reproductive compromise in women and men. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1997; 15(1):47–53.

Berga SL, Daniels TL, Giles DE. Women with functional hypothalamic amenorrhea but not other forms of anovulation display amplified cortisol concentrations. *Fertil Steril.* 1997; 67:1024e1030.

Berga SL, Loucks-Daniels TL, Adler LJ, Chrousos GP, Cameron JL, Matthews KA et al. Cerebrospinal fluid levels of corticotropin-releasing hormone in women with functional hypothalamic amenorrhea. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182: 776-81.

Berga SL, Marcus MD, Loucks TL, Hlastala MS, Ringham R, Krohn MJ. Recovery of ovarian activity in women with functional hypothalamic amenorrhea who were treated with cognitive behavior therapy. *Fertil Steril.* 2003; 80:976e981.

Berga SL, Loucks TL. Use of Cognitive Behavior Therapy for Functional Hypothalamic Amenorrhea. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092: 114-29.

Berga, SL, Loucks, TL. (2007). Stress induced anovulation. In G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of stress* (pp.615–631). Oxford: Academic Press.

Bethea CL, Pau FKY, Fox S, Hess DL, Berga SL, Cameron JL. Sensitivity to stress-induced reproductive dysfunction linked to activity of the serotonin system. *Fertil Steril.* 2005; 83:148e155.

Bhagavath B, Xu N, Ozata M, Rosenfield RL, Bick DP, Sherins RJ, et al. KAL1 mutations are not a common cause of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism in humans. *Mol Hum Reprod* 2007;13:165-170.

Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:569-576.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocr Metab* 1996; 81:3419–23.

Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT et al. Expert consensus document : European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 ; 11 :547-564.

Bomba M, Gambera A, Bonini L, Peroni M, Neri F, Scagliola P, Nacinovich R. Endocrine profiles and neuropsychologic correlates of functional hypo-thalamic amenorrhea in adolescents. *Fertil Steril*. 2007; 87:876–885.

Bomba M, Corbetta F, Bonini L, Gambera A, Tremolizzo L, Neri F, Nacinovich R. Psychopathological traits of adolescents with functional hypothalamic amenorrhea: a comparison with anorexia nervosa. *Eat Weight Dis-ord*. 2013; 19:41–48.

Bonomi M, Libri DV, Guizzardi F, et al. New understandings of the genetic basis of isolated idiopathic central hypogonadism. *Asian J Androl* 2012;14:49-56.

Boyar RM, Katz J, Finkelstein JW, Kapen S, Weiner H, Weitzman ED, Hellman L. Anorexia nervosa. Immaturity of the 24-hour luteinizing hormone secretory pattern. *N Engl J Med* 1974;291:861–5.

Brundu B, Loucks TL, Adler LJ, Cameron JL, Berga SL. Increased cortisol in the cerebrospinal fluid of women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 1561-5.

Budak E, Fernandez Sanchez M, Bellver J, Cervero A, Simon C, Pellicer A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3–36 with the reproductive system. *Fertil Steril* 2006; 85:1563–81.

Burger AG, Berger M, Wimpfheimer K, Danforth E. Interrelationships between energy metabolism and thyroid hormone metabolism during starvation in the rat. *Acta Endocrinol* 1980; 93:322–31.

Brzezinski A, Lynch HJ, Wurtman RJ, Seibel MM. Possible contribution of melatonin to the timing of the luteinizing hormone surge. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1550-1551.

Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, et al. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet* 2004;13:2781-2791.

Caronia LM, Martin C, Welt CK, et al. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. *N Eng J Med*. 2011; 364: 215-25.

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

Camino JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia- Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocr Metab* 2005; 90:4276–86.

Cambuli VM, Musiu MC, Incani M, Paderi M, Serpe R, Marras V, Cossu E, Cavallo MG, Mariotti S, Loche S, Baroni MG. Assessment of adiponectin and leptin as biomarkers of positive metabolic outcomes after lifestyle intervention in overweight and obese children. *J Clin Endocr Metab* 2008; 93:3051–7.

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domestic animal endocrinology* 2007; 33:480–7.

Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2008; 133:719–31.

Chabrolle C, Tosca L, Rame C, Lecomte P, Royere D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced Fertil Steril 2009; 92:1988–96.

Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 2003; 111:1409–21.

Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet* 2005; 366:74–85.

Chan YM, Butler JP, Sidhoum VF, Pinnell NE, Seminara SB. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 2012; 97:E1458–67.

Chan, Y. M., de Guillebon, A., Lang-Muritano, M., Plummer, L., Cerrato, F., Tsiaras, S., et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106, 11703–11708.

Chennaoui M, Arnal PJ, Sauvet F, Leger D. Sleep and exercise: a reciprocal issue? *Sleep Med Rev.* 2015; 20: 59-72.

Chou SH, Chamberland JP, Liu X, Matarese G, Gao C, Stefanakis R, Brinkoetter MT, Gong H, Arampatzi K, Mantzoros CS. Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:6585–90.272.

Christian CA, Moenter SM. Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *J Neurosci* 2007; 27:1913–21.

Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 2010; 31:544–77.

Christo K, Cord J, Mendes N, Miller KK, Goldstein MA, Klibanski A, Misra M. Acylated ghrelin and leptin in adolescent athletes with amenorrhea, eumenorrheic athletes and controls: a cross-sectional study. *Clin Endocrinol* 2008; 69:628–33.

Cole, L. W., Sidis, Y., Zhang, C., Quinton, R., Plummer, L., Pignatelli, D., et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone

deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 93, 3551–3559.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108:1875–81.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292–5.

Corr M, De Souza MJ, Toombs RJ, Williams NI. Circulating leptin concentrations do not distinguish menstrual status in exercising women. *Hum Reprod* 2011; 26:685–94.

Costarelli V, Demerzi M, Stamou D. Disordered eating attitudes in relation to body image and emotional intelligence in young women. *J Hum Nutr Diet.* 2009; 22: 239-45.

Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler GB Jr. The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocr Metab* 1992; 75:762–7.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37:649–61.

Crandall CJ, Tseng CH, Karlamangla AS, Finkelstein JS, Randolph JF, Jr, Thurston RC, Huang MH, Zheng H, Greendale GA. Serum sex steroid levels and longitudinal changes in bone density in relation to the final menstrual period. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98:E654–E663.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714–9.

Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287:E297–304.

Curran-Rauhut MA, Petersen SL. Regulation of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 gene expression by ovarian steroids: identification of two functionally distinct populations of GABA neurones in the preoptic area. *J Neuroendocrinol* 2002; 14:310–7.

Daniell HW (2008) Opioid endocrinopathy in women consuming prescribed sustained-action opioids for control of nonmalignant pain. *The Journal of Pain* 9(1): 28–36.

Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev* 1987; 8:115–31.

Davies JH, Evans BAJ, Gregory JW. Bone acquisition in healthy children. *Arch Dis Child*. 2005;87:2391–2394.

De Feo P. Hormonal regulation of human protein metabolism. *Eur J Endocrinol* 1996; 135:7–18.

De Souza MJ, Maguire MS, Maresh CM, Kraemer WJ, Rubin KR, Loucks AB. Adrenal activation and the prolactin response to exercise in eumenorrheic and amenorrheic runners. *J Appl Physiol* 1991;70:2378–87.

De Souza MJ, Miller BE, Loucks AB, Luciano AA, Pescatello LS, Campbell CG, Lasley BL. High frequency of luteal phase deficiency and anovulation in recreational women runners: blunted elevation in follicle-stimulating hormone observed during luteal-follicular transition. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83:4220–32.

De Souza MJ, Williams NI. Physiological aspects and clinical sequelae of energy deficiency and hypoestrogenism in exercising women. *Hum Reprod Update* 2004;10:433–48.

De Souza MJ, Leidy HJ, O'Donnell E, Lasley B, Williams NI. Fasting ghrelin levels in physically active women: relationship with menstrual disturbances and metabolic hormones. *J Clin Endocr Metab* 2004; 89:3536–42.

De Souza MJ, Lee DK, VanHeest JL, Scheid JL, West SL, Williams NI. Severity of energy-related menstrual disturbances increases in proportion to indices of energy conservation in exercising women. *Fertil Steril* 2007; 88:971–5.

De Souza MJ, West SL, Jamal SA, Hawker GA, Gundberg CM, Williams NI. The presence of both an energy deficiency and estrogen deficiency exacerbate alterations of bone metabolism in exercising women. *Bone* 2008; 43:140–8.

De Souza MJ, Toombs RJ, Scheid JL, E. O'Donnell, West SL, Williams NI. High prevalence of subtle and severe menstrual disturbances in exercising women: confirmation using daily hormone measures. *Hum Reprod* 2010;25:491–503.

Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocr Metab* 2007; 92:3958–66.

Dickson SL, Luckman SM. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 1997; 138:771–7.

Dinges DF. The state of sleep deprivation: From functional biology to functional consequences. *Sleep Med Rev.* 2006; 10: 303-5.

Dode C, Levilliers J, Dupont JM, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003;33:463-465.

Dode C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann syndrome : mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *Plos Genet.* 2006; 2:e175.

Dode C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17:139- 146.

Doldi N, Bassan M, Bonzi V, Ferrari A. Effects of growth hormone and growth hormone-releasing hormone on steroid synthesis in cultured human luteinizing granulosa cells. *Gynecol Endocrinol* 1996; 10:101–8.

Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar A. Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1992;131:1559–61.

Dostalova I, Smitka K, Papezova H, Kvasnickova H, Nedvidkova J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* 2007; 56:587–94.

Dundon CM, Rellini AH, Tonani S, Santamaria V, Nappi R. Mood disorders and sexual functioning in women with functional hypothalamic amenor-rhea. *Fertil Steril.* 2010; 94:2239–2243.

Easter A, Treasure J, Micali N. Fertility and prenatal attitudes towards pregnancy in women with eating disorders: results from the avon longitudinal study of parents and children. *BJOG.* 2011;118:1491–1498.

Eckert ED, Pomeroy C, Raymond N, Kohler PF, Thuras P, Bowers CY. Leptin in anorexia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83:791–5.

Ecochard R, Gougeon A. Side of ovulation and cycle characteristics in normally fertile women. *Hum Reprod* 2000;15:752–5.

Evans JJ, Anderson GM. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update* 2012; 18:313–32.

Farooqi IS, O’Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009;89:980S–4.

Fazeli PK, Lawson EA, Prabhakaran R, Miller KK, Donoho DA, Clemmons DR, Herzog DB, Misra M, Klibanski A. Effects of recombinant human growth hormone in anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocr Metab* 2010; 95:4889–97.

Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of GH resistance in malnutrition. *J Endocrinol* 2014; 220:R57–65.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 2005; 82:245–55.

Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254–255:127–32.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett* 2004; 362:103–7.

Franco B et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*. 1991; 100: E646-654.

Friday KE, Drinkwater BL, Bruemmer B, Chesnut C, 3rd, Chait A. Elevated plasma low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol levels in amenorrheic athletes: effects of endogenous hormone status and nutrient intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77:1605–1609.

George JT, Anderson RA, Millar RP. Kisspeptin-10 stimulation of gonadotrophin secretion in women is modulated by sex steroid feedback. *Hum Reprod* 2012; 27:3552–9.

Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman JG, Crowley WF, Jr, Vallejo M. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:213-217.

Germain A, Buysse DJ, Ombao H, Kupfer DJ, Hall M. Psychophysiological reactivity and coping styles influence the effects of acute stress exposure on rapid eye movement sleep. *Psychosom Med*. 2003; 65: 857-864.

Giles DE, Berga SL. Cognitive and psychiatric correlates of functional hypothalamic amenorrhea: a controlled comparison. *Fertil Steril*. 1993; 60:486 -492.

Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 2007; 148:5752–60.

Gordon CM, Bachrach LK, Carpenter TO, Crabtree N, El-Hajj Fuleihan G, Kutilek S, Lorenc RS, Tosi LL, Ward KA, Ward LM, Kalkwarf HJ. Dual energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the 2007 ISCD pediatric official positions. *J Clin Densitom*. 2008;11:43–58.

Gordon CM. Clinical practice. Functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2010; 363:365–71.

Gordon CM, Ackerman KE, Berga SL, Kaplan JR, Mastorakos G, Misra M, Murad MH, Santoro NF, Warren MP. Functional hypothalamic amenorrhea: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2017; 102(5):1413–1439.

Gregoraszczyk EL, Ptak A. In vitro effect of leptin on growth hormone (GH)- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-stimulated progesterone secretion and apoptosis in developing and mature corpora lutea of pig ovaries. *J Reprod Dev* 2005; 51:727–33.

Grinspoon S, Gulick T, Askari H, Landt M, Lee K, Anderson E, Ma Z, Vignati L, Bowshe R, Herzog D, Klibanski A. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3861–3.

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain research Mol Brain Res* 1997; 48:23–9.

Guo LJ, et al. Relationship between serum omentin-1 level and bone mineral density in girls with anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest*. 2013; 36:190–194.

Harlow SD. Menstruation and menstrual disorders: the epidemiology of menstruation and menstrual dysfunction. In: Goldman MB, Hatch MC, editors. *Women & Health*. San Diego, CA: Academic Press, 2000:99–113.

Hebert JM, Lin M, Partanen J, Rossant J, McConnell SK. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 2003;130:1101-1111.

Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillon WS, Liposits Z, Kallo I. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual

dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 2010;31:1984–98.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:E827–32.

Hind K. Recovery of bone mineral density and fertility in a former amenorrheic athlete. *J Sports Sci Med*. 2008; 7:415–418.

Ho KY, Veldhuis JD, Johnson ML, Furlanetto R, Evans WS, Alberti KG, Thorner MO. Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. *J Clin Invest* 1988; 81:968–75.

Hochberg Z, Hertz P, Colin V, Ish-Shalom S, Yeshurun D, Youdim MB, Amit T. The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism* 1992; 41:106–12.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose- specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271:10697–703.

Huda MS, Wilding JP, Pinkney JH. Gut peptides and the regulation of appetite. *Obes Rev* 2006; 7:163–82.

Hull KL, Harvey S. GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *J Endocrinol* 2002; 172:1–19.

Hull KL, Harvey S. Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions. *Int J Endocrinol* 2014; 2014:234014.

Jayasena CN, Nijher GM, Chaudhri OB, Murphy KG, Ranger A, Lim A, Patel D, Mehta A, Todd C, Ramachandran R, Salem V, Stamp GW, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J Clin Endocr Metab* 2009; 94:4315–23.

Jarrell H, Hoffman JB, Kaplan JR, Berga S, Kinkead B, Wilson ME. Polymorphisms in the serotonin reuptake transporter gene modify the consequences of social status on metabolic health in female rhesus monkeys. *Physiol Behav*. 2008; 93:807e819.

Jayasena CN, Nijher GM, Abbara A, Murphy KG, Lim A, Patel D, Mehta A, Todd C, Donaldson M, Trew GH, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88:840–7.

Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, Comninou AN, Ratnasabapathy R, De Silva A, Nijher GM, Ganiyu-Dada Z, Mehta A, Todd C, Ghatei MA, Bloom SR, Dhillon WS. Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54. *J Clin Endocr Metab* 2014; 99:E953–61.

Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000; 141:333–9.

Jones EE, Decherney AH. The female reproductive system. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Medical physiology*, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012:1146–69.

Judd SJ, Wong J, Saloniklis S, et al. The effect of alprazolam on serum cortisol and luteinizing hormone pulsatility in normal women and in women with stress-related anovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:818e823.

Juul A, Hagen CP, Aksglaede L, Sørensen K, Mouritsen A, Frederiksen H, Main KM, Mogensen SS, Pedersen AT. Endocrine evaluation of reproductive function in girls during infancy, childhood and adolescence. *Endocr Dev.* 2012; 22:24–39.

Kahn M, Sheppes G, Sadeh A. Sleep and emotions: bidirectional links and underlying mechanisms. *Int J Psychophysiol.* 2013; 89: 218-228.

Kaplan, J. R., & Manuck, S. B. (2004). Ovarian dysfunction, stress, and disease: A primate continuum. *ILAR Journal*, 45, 89–115.

Karamouti M, Kolia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 2008; 90(4 Suppl):1444–50.

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocr Metab* 1997; 82:4144–8.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50:2438–43.

Kawano T, Saito T, Yasu T, Nakamura T, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Saito M, Ishikawa SE. Close association of hypoadiponectinemia with arteriosclerosis obliterans and ischemic heart disease. *Metabolism* 2005; 54:653–6.

Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23:576–581.

Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K, Honjo H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 2000; 85:1946–50.

King JA, Miyashita M, Wasse LK, Stensel DJ. Influence of prolonged treadmill running on appetite, energy intake and circulating concentrations of acylated ghrelin. *Appetite* 2010; 54:492–8.

King NA, Caudwell PP, Hopkins M, Stubbs JR, Naslund E, Blundell JE. Dual-process action of exercise on appetite control: increase in orexigenic drive but improvement in meal-induced satiety. *Am J Clin Nutr* 2009; 90:921–7.

Kluge M, Schussler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocr Metab* 2007; 92:3202–5.

Klenke U, Taylor-Burds C, Wray S. Metabolic influences on reproduction: adiponectin attenuates GnRH neuronal activity in female mice. *Endocrinology* 2014; 155:1851–63.

Knobil E. The Wisdom of the Body Revisited. *News Physiol Sci* 1999;14:1–11.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402:656–60.

Konrad KK, Carels RA, Garner DM. Metabolic and psychological changes during refeeding in anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* 2007; 12:20–6.

Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and de-pression: from animals to humans. *Neuropeptides*. 2013; 47:401–419.

Kosmiski L, Schmiede SJ, Mascolo M, Gaudiani J, Mehler PS. Chronic starvation secondary to anorexia nervosa is associated with an adaptive suppression of resting energy expenditure. *J Clin Endocr Metab* 2014; 99:908–14.

Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284:8–45.

Lambrinoudaki I, Papadimitriou D. Pathophysiology of bone loss in the female athlete. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1205:45–50.

Lanfranco F, Bonelli L, Baldi M, Me E, Broglio F, Ghigo E. Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *J Clin Endocr Metab* 2008; 93:3633–9.

Laughlin GA, Yen SS. Nutritional and endocrine-metabolic aberrations in amenorrheic athletes. *J Clin Endocr Metab* 1996; 81:4301–9.

Laughlin GA, Yen SS. Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endocr Metab* 1997;82:318–21.

Laughlin GA, Dominguez CE, Yen SS. Nutritional and endocrinemetabolic aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83:25–32.

Lawson EA, Donoho D, Miller KK, Misra M, Meenaghham E, Lydecker J, Wexier T, Herzog DB, Klibanski A. Hypercortisolemia is associated with severity of bone loss and depression in hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 4710-6.

Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006; 147:5178–86.

Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991;67:423-435.

Leidy HJ, Dougherty KA, Frye BR, Duke KM, Williams NI. Twentyfour- hour ghrelin is elevated after calorie restriction and exercise training in non-obese women. *Obesity* 2007; 15:446–55.

Leranth C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F. Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 1985; 40:536–9.

Li XF, Knox AMI, and O'Byrne KT (2010) Corticotropin-releasing factor and stress-induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. *Brain Research* 1364: 153–163.

Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2002; 277: 19276-19280.

Lim J, Dinges DF. A meta-analysis of the impact of short-term sleep deprivation on cognitive variables. *Psycho Bull.* 2010; 136: 375-89.

Loucks AB, Mortola JF, Girton L, Yen SS. Alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian and the hypothalamic-pituitary-adrenal axes in athletic women. *J Clin Endocr Metab* 1989; 68:402–11.

Loucks AB, Laughlin GA, Mortola JF, Girton L, Nelson JC, Yen SS. Hypothalamic-pituitary-thyroidal function in eumenorrheic and amenorrheic athletes. *J Clin Endocr Metab* 1992; 75:514–8.

Loucks AB, Callister R. Induction and prevention of low-T3 syndrome in exercising women. *Am J Physiol* 1993; 264(5 Pt 2): R924–30.

Loucks AB, Heath EM. Dietary restriction reduces luteinizing hormone (LH) pulse frequency during waking hours and increases LH pulse amplitude during sleep in young menstruating women. *J Clin Endocr Metab* 1994;78:910–5.

Loucks AB, Verdun M, Heath EM. Low energy availability, not stress of exercise, alters LH pulsatility in exercising women. *J Appl Physiol* 1998; 84:37–46.

Loucks AB, Thuma JR. Luteinizing hormone pulsatility is disrupted at a threshold of energy availability in regularly menstruating women. *J Clin Endocr Metab* 2003; 88:297–311.

Loucks AB, Kiens B, Wright HH. Energy availability in athletes. *J Sport Sci* 2011; 29 (Suppl 1):S7–15.

Lowry DW, Lowry DLB, Berga SL, Adelson PD, and Roberts MM (1996) Secondary amenorrhea due to hydrocephalus treated with endoscopic ventriculocisternostomy. Case report. *Journal of Neurosurgery* 85: 1148–1152.

Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2005; 309:99–109.

Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1648–56.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Co* 1996; 221:286–9.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1:1155–61

Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Rame C, Coyral- Castel S, Dupont J. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:23.

Marcus MD, Loucks TL, Berga SL. Psychological correlates of functional hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril*. 2001; 76:310e316.

Martin-Fernandez KW, Ben-Porath YS. Associations among eating disorder symptoms and the Minnesota Multiphasic Personality Inventory-2-Restructured Form (MMPI-2-RF) in college students. *Eat Weight Disord*. 2019.

Martins C, Morgan LM, Bloom SR, Robertson MD. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *J Endocrinol* 2007; 193:251–8.

Martinussen M, Friborg O, Schmierer P, et al. The comorbidity of personality disorders in eating disorders: a meta-analysis. *Eat Weight Disord*. 2017; 22: 201-209.

Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PROKR2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 4140-4145.

McArdle CA, Kohl C, Rieger K, Groner I, Wehrenberg U. Effects of gonadotropins, insulin and insulin-like growth factor I on ovarian oxytocin and progesterone production. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 78:211–20.

McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neuro-sci*. 2012; 126:4–16.

Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR. Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol*. 2010; 26:652–657.

Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol*. 2002; 89:12E–17E.

Messinis CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulas P, Messinis IE. Effect of ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 2009; 24:976–81.

Michalakis KG, Segars JH. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril* 2010; 94:1949–57.

Michopoulos V, Embree M, Reding K, Sanchez MM, Toufexis D, Votaw JR, Voll RJ, Goodman MM, Rivier J, Wilson ME, and Berga SL. CRH receptor antagonism reverse the effect of social subordination upon central GABA-A receptor binding in estradiol-treated ovariectomized female rhesus monkeys. *Neuroscience*. 2013; 250: 300–308.

Michopoulos V, Mancini F, Loucks TL, Berga SL. Neuroendocrine recovery initiated by cognitive behavioral therapy in women with functional hypothalamic amenorrhea: a randomized, controlled trial. *Fertility and Sterility* 2013; 99: 2084-91.

Michopoulos V, Mancini F, Loucks TL, Berga SL. Neuroendocrine recovery initiated by cognitive behavioral therapy in women with functional hypothalamic amenorrhea: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril*. 2013; 99(7):2084e209.

Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 2011;124:229–36.

Miller KK, Parulekar MS, Schoenfeld E, Anderson E, Hubbard J, Klibanski A, Grinspoon SK. Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea: the effects of body composition and nutritional intake. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83:2309–12.

Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007; 29:887–902.

Misra M, Miller KK, Bjornson J, Hackman A, Aggarwal A, Chung J, Ott M, Herzog DB, Johnson ML, Klibanski A. Alterations in growth hormone secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J Clin Endocr Metab* 2003; 88:5615–23.

Misra M, Miller KK, Herzog DB, Ramaswamy K, Aggarwal A, Almazan C, Neubauer G, Breu J, Klibanski A. Growth hormone and ghrelin responses to an oral glucose load in adolescent girls with anorexia nervosa and controls. *J Clin Endocr Metab* 2004; 89:1605–12.

Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E347–56.

Misra M, Miller KK, Tsai P, Gallagher K, Lin A, Lee N, Herzog DB, Klibanski A. Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 2006; 91:1027–33.

Misra M, Miller KK, Cord J, Prabhakaran R, Herzog DB, Goldstein M, Katzman DK, Klibanski A. Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 2007; 92:2046–52.

Misra M. What is the best strategy to combat low bone mineral density in functional hypothalamic amenorrhea? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4:542–543.

Misra M, Klibanski A. Endocrine consequences of anorexia nervosa. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2:581–92.

Miyai K, Yamamoto T, Azukizawa M, Ishibashi K, Kumahara Y. Serum thyroid hormones and thyrotropin in anorexia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 1975; 40:334–8.

Morin CM, Rodrigue S, Ivers H. Role of stress, arousal, and coping skills in primary insomnia. *Psychosom Med*. 2003; 65: 259-67.

Morton GJ, Schwartz MW. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(Suppl 5):S56–62.

Moshang T, Vande Wiele RL. Clinical and metabolic features of anorexia nervosa. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117:435–49.

Moshang T Jr, Parks JS, Baker L, Vaidya V, Utiger RD, Bongiovanni AM, Snyder PJ. Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 1975; 40:470–3.

Myerson M, Gutin B, Warren MP, May MT, Contento I, Lee M, Pi-Sunyer FX, Pierson RN Jr, Brooks-Gunn J. Resting metabolic rate and energy balance in amenorrheic and eumenorrheic runners. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23:15–22.

Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, et al. Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. *J Psychiat Res* 2007; 41: 814–20.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996; 120:803–12.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194–8.

Nattiv A, Loucks AB, Manore MM, Sanborn CF, Sundgot-Borgen J, Warren MP. American college of sports medicine position stand. The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:1867–82.

Navarro VM, Kaiser UB. Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; 20:335–41.

Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. Dependence of olfactory bulb morphogenesis on prokineticin 2 signaling. *Nature*. 2005; 308: 1923-1927.

Obarzanek E, Lesem MD, Jimerson DC. Resting metabolic rate of anorexia nervosa patients during weight gain. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:666–75.

O'Brian JT, Bybee DE, Burman KD, Osburne RC, Ksiazek MR, Wartofsky L, Georges LP. Thyroid hormone homeostasis in states of relative caloric deprivation. *Metabolism* 1980; 29:721–7.

O'Donnell E, Harvey PJ, Goodman JM, De Souza MJ. Long-term estrogen deficiency lowers regional blood flow, resting systolic blood pressure, and heart rate in exercising premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292:E1401–E1409.

O'Donnell E, Goodman JM, Harvey PJ. Clinical review: cardiovascular consequences of ovarian disruption: a focus on functional hypothalamic amenorrhea in physically active women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:3638–3648.

O'Donnell E, De Souza MJ. Increased serum adiponectin concentrations in amenorrheic physically active women are associated with impaired bone health but not with estrogen exposure. *Bone* 2011; 48:760–7.

Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype- phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1532-1538.

Onur S, Haas V, Bosy-Westphal A, Hauer M, Paul T, Nutzinger D, Klein H, Muller MJ. L-triiodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur J Endocrinol* 2005;152:179–84.

Ouyang P, Michos ED, Karas RH. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47:1741–1753.

Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, Granzotto M, Catucci A, Federspil G, De Giacomo P, Giorgino R, De Pergola G. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocr Metab* 2003; 88:1748–52.

Pannacciulli N, Bunt JC, Ortega E, Funahashi T, Salbe AD, Bogardus C, Krakoff J. Lower total fasting plasma adiponectin concentrations are associated with higher metabolic rates. *J Clin Endocr Metab* 2006; 91:1600–3.

Pauli SA, Berga SL. Athletic amenorrhea: Energy deficit or psychogenic challenge. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1205, 33-38.

Pedersen-White JR, Chorch LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. The prevalence of intragenic deletions in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Hum Reprod* 2008;14:367-370.

Pfluger PT, Kampe J, Castaneda TR, et al. Effect of human body weight changes on circulating levels of peptide YY and peptide YY3–36. *J Clin Endocr Metab* 2007; 92: 583–8.

Pierre P, Froment P, Negre D, Rame C, Barateau V, Chabrolle C, Lecomte P, Dupont J. Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN. *Hum Reprod* 2009; 24:2890–901.

Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; 92:1235–316.

Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 2007;117:457-463.

Podfigurna-Stopa A, Pludowski P, Jaworski M, Lorenc R, Genazzani AR, Meczekalski B. Skeletal status and body composition in young women with functional hypothalamic amenorrhea. *Gynecol Endocrinol*. 2012; 28:299–304.

Poehlman ET. A review: exercise and its influence on resting energy metabolism in man. *Med Sci Sports Exerc* 1989; 21:515–25.

Polito A, Fabbri A, Ferro-Luzzi A, Cuzzolaro M, Censi L, Ciarapica D, Fabbrini E, Giannini D. Basal metabolic rate in anorexia nervosa: relation to body composition and leptin concentrations. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1495–502.

Pombo M, Pombo CM, Astorga R, Cordido F, Popovic V, Garcia- Mayor RV, Dieguez C, Casanueva FF. Regulation of growth hormone secretion by signals produced by the adipose tissue. *J Endocrinol Invest* 1999; 22 (5 Suppl):22–6.

Poretsky L, Chandrasekher YA, Bai C, Liu HC, Rosenwaks Z, Giudice L. Insulin receptor mediates inhibitory effect of insulin, but not of insulin-like growth factor (IGF)-I, on IGF binding protein 1 (IGFBP-1) production in human granulosa cells. *J Clin Endocr Metab* 1996; 81:493–6.

Postel-Vinay MC, Saab C, Gourmelen M. Nutritional status and growth hormone-binding protein. *Horm Res* 1995; 44:177–81.

Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, et al. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 2011;96:1424-1430.e6.

Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009;150:2805–12.

Raivio, T., Avbelj, M., McCabe, M. J., Romero, C. J., Dwyer, A. A., Tommiska, J., et al. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97, E694–E699.

Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte--at the crossroads of energyhomeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144:3765–73.

Reckelhoff JF. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations. *Hypertension*. 2005; 45:170–174.

Rettori V, De Laurentiis A, and Fernandez-Solari J (2010) Alcohol and endocannabinoids: Neuroendocrine interactions in the reproductive axis. *Experimental Neurology* 224(1): 15–22.

Rickenlund A, Eriksson MJ, Schenck-Gustafsson K, Hirschberg AL. Amenorrhea in female athletes is associated with endothelial dysfunction and unfavorable lipid profile. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1354–1359.

Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castano JP, Malagon MM. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007; 148:401–10.

Rosenbaum M, Hirsch J, Murphy E, Leibel RL. Effects of changes in body weight on carbohydrate metabolism, catecholamine excretion, and thyroid function. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1421–32.

Ross RJ, Chew SL. Acquired growth hormone resistance. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:655–60.

Roy D, Belsham DD. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7Gn-RH neurons. Signal transduction mechanisms. *J Biol Chem*. 2002; 277: 251-258.

Russell M, Stark J, Nayak S, Miller KK, Herzog DB, Klibanski A, Misra M. Peptide YY in adolescent athletes with amenorrhea, eumenorrheic athletes and non-athletic controls. *Bone* 2009; 45:104–9.

Sadeh A, Keinan G, Daon K. Effects of stress on sleep :the moderating role of coping style. *Health Psychol*. 2004; 23: 542-5.

Sanders KM, Kawwass JF, Loucks T, Berga SL. Heightened cortisol response to exercise challenge in women with functional hypothalamic amenorrhea. *Am J Obstet Gynecol*. 2018; 218: 230.e1-230.e6.

Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, et al. A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;9 5:659-669.

Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet*. 2002; 359:1841–1850.

Scheid JL, Williams NI, West SL, VanHeest JL, De Souza MJ. Elevated PYY is associated with energy deficiency and indices of subclinical disordered eating in exercising women with hypothalamic amenorrhea. *Appetite* 2009;52:184–92.

Scheid JL, De Souza MJ, Leidy HJ, Williams NI. Ghrelin but not peptide YY is related to change in body weight and energy availability. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43: 2063–71.

Scheid JL, Toombs RJ, Ducher G, Gibbs JC, Williams NI, De Souza MJ. Estrogen and peptide YY are associated with bone mineral density in premenopausal exercising women. *Bone* 2011;49:194–201.

Scheid JL, De Souza MJ, Hill BR, Leidy HJ, Williams NI. Decreased luteinizing hormone pulse frequency is associated with elevated 24-hour ghrelin after calorie restriction and exercise in premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304:E109–16.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:26746–9.

Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 2004; 81:289–317.

Schneider LF, Warren MP. Functional hypothalamic amenorrhea is associated with elevated ghrelin and disordered eating. *Fertil Steril* 2006; 86:1744–9.

Schneider LF, Monaco SE, Warren MP. Elevated ghrelin level in women of normal weight with amenorrhea is related to disordered eating. *Fertil Steril* 2008; 90: 121–8.

Scholz CJ, Jungwirth S, Danielczyk W, et al. Investigation of association of serotonin transporter and monoamine oxidase-A genes with Alzheimer's disease and depression in the VITA study cohort: a 90-month longitudinal study. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genetics*. 2014; 165B(2):184e191.

Sharma A, Madaan V, Petty FD. Exercise for mental health. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2006; 8:106.

Shen ZQ, Xu JJ, Lin JF. Resumption of menstruation and pituitary response to gonadotropin-releasing hormone in functional hypothalamic amenorrhea subjects undertaking estrogen replacement therapy. *J Endocrinol Invest*. 2013; 36:812–815.

Sirotkin AV. Direct action of growth hormone on bovine ovarian cells: effects on estradiol, oxytocin, vasopressin release by granulosa cells and on oocyte maturation and cleavage in vitro. *Ann Endocrinol* 1996; 57:219–24.

Sirotkin AV, Makarevich AV, Hetenyi L. Effect of growth hormone and inhibitors of protein kinase A on IGF-I, oxytocin and progesterone release by cultured bovine granulosa cells. *Ann Endocrinol* 2000; 61:154–8.

Skorupskaitė K, George JT, Anderson RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update* 2014;20:485–500.

Slot KA, Kastelijn J, Bachelot A, Kelly PA, Binart N, Teerds KJ. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction* 2006; 131:525–32.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; 146:3686–92.

Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1579: 173-179.

Staner L. Sleep and anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2003; 5: 249-258.

Stice E. Risk and maintenance factors for eating pathology: a meta-analytic review. *Psychol. Bull.* 2002; 128: 825-848.

Stoving RK, Veldhuis JD, Flyvbjerg A, Vinten J, Hangaard J, Koldkjaer OG, Kristiansen J, Hagen C. Jointly amplified basal and pulsatile growth hormone (GH) secretion and increased process irregularity in women with anorexia nervosa: indirect evidence for disruption of feedback regulation within the GH-insulin-like growth factor I axis. *J Clin Endocr Metab* 1999; 84:2056–63.

Stoving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C. A review of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiat Res* 1999; 33:139–52.

St-Pierre DH, Faraj M, Karelis AD, Conus F, Henry JF, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A, Cianflone K, Rabasa-Lhoret R. Lifestyle behaviours and components of energy balance as independent predictors of ghrelin and adiponectin in young non-obese women. *Diabetes Metab* 2006; 32:131–9.

Sullivan SD, Howard LC, Clayton AH, Moenter SM. Serotonergic activation rescues reproductive function in fasted mice: does serotonin mediate the metabolic effects of leptin on reproduction? *Biol Reprod*. 2002; 66: 1702e1706.

Swinbourne J, Hunt C, Abbott M, Russell J, St Clare T, Touyz S. The comorbidity between eating disorders and anxiety disorders: prevalence in an eating disorder sample and anxiety disorder sample. *Aust N Z J Psychiatry*. 2012; 46:118-31.

Taes Y, Lapauw B, Vandewalle S, Zmierzak H, Goemaere S, Vanderschueren D, Kaufman JM, T'Sjoen G. Estrogen-specific action on bone geometry and volumetric bone density: longitudinal observations in an adult with complete androgen insensitivity. *Bone*. 2009; 45:392–397.

Tagami T, Satoh N, Usui T, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya H. Adiponectin in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocr Metab* 2004; 89:1833–7.

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28:829–35.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15:80–101.

Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocr Metab* 2003; 88:109–16.

Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:11524-11529.

Tranoulis A, Laios A, Pampanos A, Yannoukakos A, Loutradis D, Michala L. Efficacy and safety of pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy among patients with idiopathic and functional hypothalamic amenorrhea: a systematic review and a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2018; 109: 708-719.

Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184:285–93.

Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:RC19–21.

Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J* 2009;56:729–37.

Veldhuis JD, Evans WS, Demers LM, Thorner MO, Wakat D, Rogol AD. Altered neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in women distance runners. *J Clin Endocr Metab* 1985;61:557–63.

Veldhuis JD, Rodgers RJ. Mechanisms subserving the steroidogenic synergism between follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I (somatomedin C). Alterations in cellular sterol metabolism in swine granulosa cells. *J Biol Chem* 1987; 262:7658–64.

Vulliemoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Germond M, Rivier J, Ferin M. Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocr Metab* 2004; 89:5718–23.

Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. *Am J Physiol* 1996; 270:E1–19.

Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, Holderness CC, Hyle EP, Hamilton WG. Osteopenia in exercise-associated amenorrhea using ballet dancers as a model: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:3162–3168.

Wildt L, Leyendecker G. Induction of ovulation by the chronic administration of naltrexone in hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64:1334e1335.

Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004;351:987–97.

Willesen MG, Kristensen P, Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1999; 70:306–16.

Williams NI, Young JC, McArthur JW, Bullen B, Skrinar GS, Turnbull B. Strenuous exercise with caloric restriction: effect on luteinizing hormone secretion. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27:1390–8.

Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB, Caston-Balderrama A, Cameron JL. Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86:5184–93.

Williams NI, Berga SL, Cameron JL. Synergism between psychosocial and metabolic stressors: impact on reproductive function in cynomolgus monkeys. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293:E270eE276.

Wimpfheimer C, Saville E, Voirol MJ, Danforth E Jr, Burger AG. Starvation-induced decreased sensitivity of resting metabolic rate to triiodothyronine. *Science* 1979; 205:1272–3.

WISE Study Group. Ahmed B, Bairey Merz CN, Johnson BD, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, Hodgson TK, Smith K, Shaw L, Kelsey SF, Sopko G, WISE Study Group Diabetes mellitus, hypothalamic hypoestrogenemia, and coronary artery disease in premenopausal women (from the National Heart, Lung, and Blood Institute sponsored WISE study) *Am J Cardiol*. 2008; 102:150–154.

Woods AJ, Stock MJ. Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 1996; 381:745.

Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology* 2007; 132:2116–30.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86:3815–9.

Yen SS. The human menstrual cycle: neuroendocrine regulation. In: Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL, editors. *Reproductive endocrinology: physiology, pathology, and clinical management*. Philadelphia: Saunders, 1999:191–217.

Zapf J. Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:645–54.

Zhang S, Wang T, Yang J, Liu Z, Wang S, Liu J. A fertile male patient with Kallmann syndrome and two missense mutations in the KAL1 gene. *Fertil Steril* 2011; 95:1789.e3-1789.e6.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425–32.

Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Goldstein JL, Brown MS. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:7467–72.

Zhou J, Chin E, Bondy C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 1991; 129:3281–8.

Zhou J, Bondy C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 1993; 48:467–82.

I. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ (EAT-26)

	ΠΑΝΤ Α	ΣΥΧΝ Α	ΣΥΝΗΘ ΩΣ	ΜΕΡΙΚ ΕΣ ΦΟΡΕΣ	ΣΠΑΝ ΙΑ	ΠΟΤΕ
1. Τρομάζω στην ιδέα του να γίνω υπέρβαρα						
2. Αποφεύγω να τρώω όταν πεινάω						
3. Νομίζω ότι με απασχολεί πολύ το θέμα του φαγητού						
4. Τεμαχίζω το φαγητό μου σε πολύ μικρά κομμάτια						
5. Ξέρω πόσες θερμίδες έχουν οι τροφές που τρώω						
6. Αποφεύγω ιδιαίτερα τα φαγητά που είναι πλούσια σε υδατάνθρακες (δηλαδή ψωμί, μακαρόνια, ρύζι κτλ)						
7. Νομίζω ότι οι άλλοι θα ήθελαν να τρώω περισσότερο						
8. Κάνω εμετό μετά το φαγητό						
9. Νιώθω πολλές ενοχές όταν έχω φάει						
10. Με απασχολεί η επιθυμία να γίνω πιο λεπτή						
11. Όταν ασκούμαι σκέφτομαι τις θερμίδες που «καίω»						
12. Οι άλλοι πιστεύουν ότι είμαι πάρα πολύ αδύνατη						

	ΠΑΝΤ Α	ΣΥΧΝ Α	ΣΥΝΗΘ ΩΣ	ΜΕΡΙΚ ΕΣ ΦΟΡΕΣ	ΣΠΑΝ ΙΑ	ΠΟΤΕ
13. Με ανησυχεί η ιδέα ότι έχω λίπος στο σώμα μου						
14. Μου παίρνει περισσότερο χρόνο από ότι στους άλλους να τελειώσω το γεύμα μου						
15. Αποφεύγω τα τρόφιμα που περιέχουν ζάχαρη						
16. Τρώω τρόφιμα «διαίτης» (light)						
17. Νιώθω ότι το φαγητό ελέγχει τη ζωή μου						
18. Ελέγχω τον εαυτό μου						
19. Νιώθω ότι οι άλλοι με πιέζουν να φάω						
20. Αφιερώνω πάρα πολύ χρόνο και σκέψη στο φαγητό						
21. Νιώθω άσχημα όταν τρώω γλυκά						
22. Ασχολούμαι με δίαιτες						
23. Μου αρέσει να έχω άδειο στομάχι						
24. Μου αρέσει να δοκιμάζω καινούρια τρόφιμα πλούσια σε θερμίδες						
25. Έχω την τάση να κάνω εμετό μετά τα γεύματα						
26. Μου έχει συμβεί να φάω μεγάλες ποσότητες φαγητού και να αισθάνομαι ότι δεν μπορώ να σταματήσω						

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΑΓΧΟΥΣ (State Trait Anxiety Inventory - STAI)

	ΚΑΘΟΛΟΥ	ΚΑΠΩΣ	ΜΕΤΡΙΑ	ΠΑΡΑ ΠΟΛΥ
1. Αισθάνομαι ήρεμα	1	2	3	4
2. Αισθάνομαι ασφάλεια	1	2	3	4
3. Νοιώθω ένταση	1	2	3	4
4. Αισθάνομαι θλίψη	1	2	3	4
5. Αισθάνομαι χαλαρή	1	2	3	4
6. Αισθάνομαι αναστατωμένη	1	2	3	4
7. Ανησυχώ για πιθανά δεινά/ κακουχίες	1	2	3	4
8. Αισθάνομαι ξεκούραστη	1	2	3	4
9. Αισθάνομαι άγχος		2	3	4
10. Αισθάνομαι άνετα	1	2	3	4

	ΚΑΘΟΛΟΥ	ΚΑΠΩΣ	ΜΕΤΡΙΑ	ΠΑΡΑ ΠΟΛΥ
11. Έχω αυτοπεποίθηση	1	2	3	4
12. Αισθάνομαι νευρικά	1	2	3	4
13. Αισθάνομαι παραγμένη	1	2	3	4
14. Αισθάνομαι ότι είμαι σε υπερδιέγερση	1	2	3	4
15. Αισθάνομαι χαλαρή	1	2	3	4
16. Αισθάνομαι ικανοποίηση	1	2	3	4
17. Έχω ανησυχία για κάτι	1	2	3	4
18. Αισθάνομαι σε υπερένταση και «ταρακουνημένη»	1	2	3	4
19. Αισθάνομαι περικοιάρης	1	2	3	4
20. Αισθάνομαι ευχάριστα	1	2	3	4
21. Αισθάνομαι ευχάριστα	1	2	3	4
22. Κουράζομαι εύκολα	1	2	3	4
23. Βρίσκομαι σε συνεχή αγώνα	1	2	3	4

	ΚΑΘΟΛΟΥ	ΚΑΠΩΣ	ΜΕΤΡΙΑ	ΠΑΡΑ ΠΟΛΥ
24. Εύχομαι να μπορούσα να είμαι τόσο ευτυχισμένη/, όσο οι άλλοι φαίνονται να είναι	1	2	3	4
25. Μένω πίσω στις δουλειές μου, γιατί δεν μπορώ να αποφασίσω αρκετά γρήγορα	1	2	3	4
26. Αισθάνομαι αναπαισμένη	1	2	3	4
27. Είμαι ήρεμη, ψύχραιμη και συγκεντρωμένη	1	2	3	4
28. Αισθάνομαι πως οι δυσκολίες συσσωρεύονται ώστε να μην μπορώ να τις ξεπεράσω.	1	2	3	4
29. Ανησυχώ πάρα πολύ για κάτι που στην πραγματικότητα δεν έχει σημασία	1	2	3	4
30. Βρίσκομαι σε συνεχή υπερένταση	1	2	3	4
31. Έχω την τάση να βλέπω τα πράγματα δύσκολα	1	2	3	4
32. Μου λείπει η αυτοπεποίθηση	1	2	3	4
33. Αισθάνομαι ασφαλής	1	2	3	4
34. Προσπαθώ να αποφεύγω την αντιμετώπιση μιας κρίσεως ή δυσκολίας	1	2	3	4
35. Βρίσκομαι σε υπερδιέγερση	1	2	3	4
36. Είμαι ικανοποιημένη	1	2	3	4

	ΚΑΘΟΛΟΥ	ΚΑΠΩΣ	ΜΕΤΡΙΑ	ΠΑΡΑ ΠΟΛΥ
37. Κάποια ασήμαντη σκέψη μου περνά από το μυαλό και με ενοχλεί	1	2	3	4
38. Παίρνω τις απογοητεύσεις τόσο πολύ σοβαρά ώστε δεν μπορώ να τις διώξω από τη σκέψη μου	1	2	3	4
39. Είμαι ένας σταθερός χαρακτήρας	1	2	3	4
40. Έρχομαι σε μια κατάσταση εντάσεως ή αναστατώσεως όταν σκέπτομαι τις τρέχουσες ασχολίες και τα ενδιαφέροντα μου	1	2	3	4

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ (International Physical Activity Questionnaire – IPAQ)

Οι παρακάτω ερωτήσεις αφορούν στο χρόνο που έχετε αφιερώσει για κάποια σωματική δραστηριότητα τις **τελευταίες 7 ημέρες**. Περιλαμβάνουν ερωτήσεις σχετικά με δραστηριότητες που κάνετε κατά την εργασία σας, στις μετακινήσεις σας, στις δουλειές του σπιτιού, του κήπου και στον ελεύθερο χρόνο σας για ψυχαγωγία, άσκηση ή άθληση. Σας παρακαλώ να απαντήσετε όλες τις ερωτήσεις, ακόμα και εάν πιστεύετε ότι δεν είστε ένα ιδιαίτερα σωματικά δραστήριο άτομο.

Πριν απαντήσετε τις ερωτήσεις 1 και 2, σκεφτείτε όλες τις **έντονες** σωματικές δραστηριότητες που κάνατε κατά τις **τελευταίες 7 ημέρες**. Μια έντονη σωματική δραστηριότητα αναφέρεται σε δραστηριότητες που απαιτούν έντονη σωματική προσπάθεια και σας κάνουν να αναπνέετε σημαντικά δυσκολότερα από ότι συνήθως. Σκεφθείτε μόνο τις **έντονες** σωματικές δραστηριότητες που κάνατε και είχαν διάρκεια **μεγαλύτερη από 10 λεπτά** κάθε φορά.

1. Κατά τις τελευταίες 7 ημέρες, πόσες ημέρες κάνατε κάποια έντονη σωματική δραστηριότητα, όπως σκάψιμο, έντονη άσκηση με βάρη, τρέξιμο σε διάδρομο με κλίση, γρήγορο τρέξιμο, aerobics, γρήγορη ποδηλασία, γρήγορη κολύμβηση, τένις μονό, αγώνας σε γήπεδο (ποδόσφαιρο, basketball-μπάσκετ, volleyball-βόλεϊ, κλπ);

_____ ημέρες ανά εβδομάδα

☐

εάν δεν κάνατε έντονες σωματικές δραστηριότητες,
τότε προχωρήστε στην ερώτηση 3

2. Τις ημέρες που κάνατε κάποια έντονη σωματική δραστηριότητα, πόσο χρόνο αφιερώνατε συνήθως;

_____ λεπτά ανά ημέρα

δεν γνωρίζω/δεν είμαι βέβαιη

☐

Πριν απαντήσετε τις ερωτήσεις 3 και 4, σκεφτείτε όλες τις μέτριας έντασης σωματικές δραστηριότητες που κάνατε κατά τις τελευταίες 7 ημέρες. Μια μέτριας έντασης σωματική δραστηριότητα αναφέρεται σε δραστηριότητες που απαιτούν μέτρια σωματική προσπάθεια και σας κάνουν να αναπνέετε κάπως δυσκολότερα από ότι συνήθως. Σκεφθείτε μόνο τις μέτριας έντασης σωματικές δραστηριότητες που κάνατε και είχαν διάρκεια μεγαλύτερη από 10 λεπτά κάθε φορά.

3. Κατά τις τελευταίες 7 ημέρες, πόσες ημέρες κάνατε κάποια μέτρια σωματική δραστηριότητα, όπως το να σηκώνετε και να μεταφέρετε ελαφρά βάρη (λιγότερο από 10 κιλά), συνολική καθαριότητα του σπιτιού, ήπιες ρυθμικές ασκήσεις σώματος, ποδηλασία αναψυχής με χαμηλή ταχύτητα, χαλαρή κολύμβηση; Σας παρακαλώ να μη συμπεριλάβετε το περπάτημα.

_____ ημέρες ανά εβδομάδα

☐ εάν δεν κάνατε μέτριας έντασης σωματικές δραστηριότητες,
τότε προχωρήστε στην ερώτηση 5

4. Τις ημέρες που κάνατε κάποια μέτρια σωματική δραστηριότητα, πόσο χρόνο αφιερώνετε συνήθως;

_____ λεπτά ανά ημέρα

δεν γνωρίζω/δεν είμαι βέβαιη

☐

Πριν απαντήσετε στις ερωτήσεις 5 και 6, σκεφτείτε το χρόνο που περπατήσατε κατά τις **τελευταίες 7 ημέρες**. Να συμπεριλάβετε το περπάτημα στο χώρο της εργασίας σας, στο σπίτι, στις μετακινήσεις σας και στον ελεύθερο χρόνο σας για ψυχαγωγία, άσκηση ή άθληση.

5. Κατά τις τελευταίες 7 ημέρες, πόσες ημέρες περπατήσατε για περισσότερο από 10 συνεχόμενα λεπτά;

_____ ημέρες ανά εβδομάδα

☐ εάν δεν περπατήσατε καμία φορά περισσότερο από 10
συνεχόμενα λεπτά, τότε προχωρήστε στην ερώτηση 7

6. Τις ημέρες που περπατήσατε, για περισσότερο από 10 συνεχόμενα λεπτά, πόσο χρόνο περάσατε περπατώντας;

_____ λεπτά ανά ημέρα

δεν γνωρίζω/δεν είμαι βέβαιη

☐

7. Κατά τις τελευταίες 7 ημέρες, πόσο χρόνο περάσατε καθισμένος/η σε μια συνηθισμένη μέρα; Ο χρόνος αυτός μπορεί να περιλαμβάνει το χρόνο που περνάτε καθισμένος/η στο σπίτι, στο γραφείο, στο αυτοκίνητο, όταν διαβάζετε, όταν είστε με φίλους, ξεκουράζεστε σε πολυθρόνα ή βλέπετε τηλεόραση, αλλά δεν περιλαμβάνει τον ύπνο.

_____ ώρες ανά ημέρα

δεν γνωρίζω/δεν είμαι βέβαιη

☐

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΚΛΙΜΑΚΑ ΑΨΠΝΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (Athens Insomnia Scale - AIS-8)

Τουλάχιστον 3 μέρες την εβδομάδα κατά μέσο όρο για τον τελευταίο μήνα, παρουσιάστηκαν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω (η αξιολόγηση αναφέρεται στον νυχτερινό ύπνο και βασίζεται στην υποκειμενική εκτίμησή σας):

1. Έλευση ύπνου

A. Πολύ Γρήγορη B. Ελαφρώς Καθυστερημένη Γ. Καθυστερημένη Δ. Πολύ Καθυστερημένη ή
δεν κοιμήθηκα καθόλου

2. Αφυπνήσεις κατά τη διάρκεια της νύχτας

A. Κανένα Πρόβλημα B. Μικρό Πρόβλημα Γ. Μέτριο Πρόβλημα Δ. Μεγάλο πρόβλημα ή
δεν κοιμήθηκα καθόλου

3. Τελική αφύπνιση σε σχέση με τον επιθυμητό χρόνο

A. Στον επιθυμητό χρόνο B. Λίγο νωρίτερα Γ. Αρκετά νωρίτερα Δ. Πολυ νωρίτερα ή
δεν κοιμήθηκα καθόλου

4. Συνολική διάρκεια ύπνου

A. Επαρκής B. Μάλλον Επαρκής Γ. Ανεπαρκής Δ. Πολύ Ανεπαρκής ή
δεν κοιμήθηκα καθόλου

5. Ποιότητα ύπνου

A.Ικανοποιητική

B.Μέτρια

Γ.Μή Ικανοποιητική

Δ.Κακή

6. Ευεξία κατά την επόμενη ημέρα

A.Πλήρης

B.Μειωμένη

Γ.Αρκετά Μειωμένη

Δ.Πολύ Μειωμένη ή Απούσα

7. Λειτουργικότητα κατά την επόμενη ημέρα

A.Πλήρης

B.Μειωμένη

Γ.Αρκετά Μειωμένη

Δ.Πολύ Μειωμένη ή Απούσα

8. Υπνηλία κατά την επόμενη ημέρα

A.Καμία

B.Ελαφρά

Γ.Μέτρια

Δ.Έντονη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Ερωτηματολόγιο εκτίμησης εικόνας σώματος

(Multidimensional Body-Self Relation Questionnaire - MBSRQ)

	Διαφωνώ απόλυτα	Διαφωνώ αρκετά	Ούτε συμφωνώ ούτε διαφωνώ	Συμφωνώ αρκετά	Συμφωνώ απόλυτα
1. Πάντα προσέχω την εμφάνισή μου, όταν πρόκειται να βγω κάπου δημοσίως					
2. Φροντίζω να αγοράζω ρούχα που με κάνουν να δείχνω όσο το δυνατόν καλύτερα					
3. Θα ήθελα να εξεταστώ σε περισσότερα τεστ σωματικής αντοχής					
4. Είναι σημαντικό για μένα να διαθέτω σωματική δύναμη					
5. Θεωρώ πως το σώμα μου είναι ελκυστικό					
6. Δεν ανήκω σε κάποιο πρόγραμμα συστηματικής φυσικής άσκησης					
7. Έχω τον έλεγχο της υγείας μου					
8. Έχω καλή γνώση των παραγόντων που επιδρούν στη σωματική μου υγεία					
9. Έχω προσεκτικά αναπτύξει έναν υγιή τρόπο ζωής					
10. Συνεχώς ανησυχώ είτε για το αν είμαι παχιά, είτε για το αν πρόκειται να γίνω					
11. Μου αρέσει το παρουσιαστικό μου, απλά όπως είναι					
12. Πάντα ελέγχω την εμφάνισή μου σε κάποιο καθρέπτη, οποτεδήποτε μπορώ					
13. Προτού βγω κάπου δημοσίως, συνήθως ξοδεύω πολύ χρόνο για να ετοιμαστώ					
14. Η φυσική μου αντοχή είναι καλή					

	Διαφωνώ απόλυτα	Διαφωνώ αρκετά	Ούτε συμφωνώ ούτε διαφωνώ	Συμφωνώ αρκετά	Συμφωνώ απόλυτα
15. Η συμμετοχή μου σε αθλήματα είναι ασήμαντη για μένα					
16. Δεν ασχολούμαι με δραστηριότητες που να διατηρούν τη σωματική μου υγεία					
17. Η κατάσταση της υγείας μου υπόκειται σε απροσδόκητες διακυμάνσεις					
18. Η καλή υγεία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πράγματα στη ζωή μου					
19. Δεν κάνω ποτέ κάτι που θα μπορούσε πιθανώς να απειλήσει την υγεία μου					
20. Έχω επίγνωση ακόμη και για τις μικρότερες αλλαγές που συμβαίνουν στο σώμα μου					
21. Οι περισσότεροι άνθρωποι θα με θεωρούσαν ευπαρουσίαστη					
22. Είναι πολύ σημαντικό για μένα να δείχνω πάντα ωραία					
23. Χρησιμοποιώ πολύ λίγα προϊόντα περιποίησης					
24. Αποκτώ σχετικά εύκολα σωματικές ικανότητες					
25. Το να ξεκινήσω κάποια φυσική δραστηριότητα, δεν αποτελεί σημαντική προτεραιότητα για μένα					
26. Κάνω πράγματα που αυξάνουν τη σωματική μου δύναμη					
27. Σπανίως νιώθω σωματικά άρρωστη					
28. Θεωρώ την υγεία μου δεδομένη					
29. Συχνά διαβάζω βιβλία και περιοδικά που αναφέρονται σε θέματα υγείας					

	Διαφωνώ απόλυτα	Διαφωνώ αρκετά	Ούτε συμφωνώ ούτε διαφωνώ	Συμφωνώ αρκετά	Συμφωνώ απόλυτα
30. Μου αρέσει ο τρόπος που δείχνω χωρίς τα ρούχα μου					
31. Είμαι ανήσυχη για το αν η περιποίησή μου δεν είναι αυτή που θα έπρεπε (μαλλιά, νύχια, επιδερμίδα)					
32. Συνήθως φοράω ρούχα εύχρηστα, χωρίς να νοιάζομαι πώς δείχνουν πάνω μου					
33. Δεν είμαι καλή σε ό,τι αφορά αθλητικά σπορ και παιχνίδια					
34. Σπάνια προβληματίζομαι για τις αθλητικές μου ικανότητες					
35. Εργάζομαι σκληρά για να ενισχύσω τη φυσική μου αντοχή					
36. Από μέρα σε μέρα, δε γνωρίζω πώς νιώθω μέσα στο σώμα μου					
37. Σε περίπτωση που αρρωστήσω, δεν δίνω την απαραίτητη προσοχή στα συμπτώματα					
38. Δεν κάνω καμία ιδιαίτερη προσπάθεια για να πετύχω μια ισορροπημένη και θρεπτική διατροφή					
39. Μου αρέσει ο τρόπος που τα ρούχα μου ταιριάζουν στο σώμα μου					
40. Δεν ενδιαφέρομαι για το τι πιστεύουν άλλα άτομα για την εμφάνισή μου					
41. Φροντίζω ιδιαίτερα τα μαλλιά μου με προϊόντα περιποίησης					
42. Απεχθάνομαι τη σωματική μου διάπλαση					
43. Δε με ενδιαφέρει να βελτιώσω τις ικανότητες μου σε φυσικές δραστηριότητες					

	Διαφωνώ απόλυτα	Διαφωνώ αρκετά	Ούτε συμφωνώ ούτε διαφωνώ	Συμφωνώ αρκετά	Συμφωνώ απόλυτα
44. Προσπαθώ να είμαι σωματικά δραστήρια					
45. Συχνά νιώθω ευπαθής απέναντι σε ασθένειες					
46. Δίνω μεγάλη προσοχή στο σώμα μου, για τυχόν σημάδια αρρώστιας					
47. Όταν αρρωσταίνω με κρύωμα ή γρίππη, απλά το αγνοώ και συνεχίζω ως συνήθως					
48. Είμαι σωματικά μη ελκυστική					
49. Ποτέ δεν σκέφτομαι την εμφάνισή μου					
50. Πάντα προσπαθώ να βελτιώνω τη σωματική μου εμφάνιση					
51. Είμαι πολύ καλά συντονισμένη					
52. Γνωρίζω αρκετά σε σχέση με τη σωστή φυσική κατάσταση					
53. Ασχολούμαι με κάποιο σπορ συστηματικά καθ όλη τη διάρκεια του χρόνου					
54. Είμαι ένα υγιές άτομο					
55. Αντιλαμβάνομαι και την παραμικρή αλλαγή στη σωματική μου υγεία					
56. Από τα πρώτα σημάδια μιας ασθένειας, αναζητώ ιατρικές συμβουλές					
57. Αυτήν την περίοδο βρίσκομαι σε δίαιτα απώλειας βάρους					

58. Έχω προσπαθήσει να χάσω βάρος κάνοντας νηστεία ή εξαντλητικές δίαιτες.

A. Ποτέ

- B. Σπάνια
- Γ. Μερικές φορές
- Δ. Συχνά
- Ε. Πολύ συχνά

59. Πιστεύω πως είμαι:

- A. Πολύ πιο κάτω από το κανονικό βάρος
- B. Μάλλον πιο κάτω από το κανονικό βάρος
- Γ. Κανονικού βάρους
- Δ. Μάλλον πιο πάνω από το κανονικό βάρος
- Ε. Πολύ πιο πάνω από το κανονικό βάρος

60. Πιστεύω πως οι περισσότεροι άνθρωποι κοιτάζοντάς με, θεωρούν πως είμαι:

- A. Πολύ πιο κάτω από το κανονικό βάρος
- B. Μάλλον πιο κάτω από το κανονικό βάρος
- Γ. Κανονικού βάρους
- Δ. Μάλλον πιο πάνω από το κανονικό βάρος
- Ε. Πολύ πιο πάνω από το κανονικό βάρος

	Πολύ Δυσανεστημέ νη	Αρκετά Δυσανεστημέ νη	Ούτε ικανοποιημέν η ούτε δυσανεστημέ νη	Αρκετά Ικανοποιημέ νη	Πολύ Ικανοποιημέ νη
61.Πρόσωπο (έκφραση, χαρακτηριστικά, χρώμα δέρματος)					
62.Μαλλιά (χρώμα, πυκνότητα, υφή)					

63. Κάτω κορμός (γλουτοί, γοφοί, μηροί, πόδια)					
64. Μέσος κορμός (μέση, στομάχι)					
65. Άνω κορμός (στήθος ή μαστός, ώμοι, χέρια)					
66. Μυϊκός τόνος					
67. Βάρος					
68. Ύψος					
69. Συνολική εμφάνιση					