

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**Β΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**«ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ» ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Κ.ΚΡΕΑΤΣΑΣ**

---

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Βιοχημική και Γενετική προσέγγιση της απόκρισης της  
Νευροορμονικής Ομοιοστασίας και του Οστικού  
Μεταβολισμού στη διαδερμική χορήγηση ορμονικής  
θεραπείας σε γυναίκες με Ψυχογενή Ανορεξία**

**ΥΠΟ**

**Ευγενία Σ. Στεργιώτη**

**Μαιευτήρος-Γυναικολόγου**

**Επιβλέπων Μέλος: Ε.Δεληγεώρογλου Αν. Καθηγητής Μαιευτικής και  
Γυναικολογίας**

**ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2013**



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**



**Β΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**«ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ» ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Κ.ΚΡΕΑΤΣΑΣ**

---

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Βιοχημική και Γενετική προσέγγιση της απόκρισης της  
Νευροορμονικής Ομοιοστασίας και του Οστικού  
Μεταβολισμού στη διαδερμική χορήγηση ορμονικής  
θεραπείας σε γυναίκες με Ψυχογενή Ανορεξία**

**ΥΠΟ**

**Ευγενία Σ. Στεργιώτη**

Μαιευτήρος-Γυναικολόγου

**Επιβλέπων Μέλος: Ε.Δεληγεώρογλου Αν. Καθηγητής Μαιευτικής και  
Γυναικολογίας**

**ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2013**



ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
**ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ**



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Βιοχημική και Γενετική προσέγγιση της απόκρισης της Νευροορμονικής Ομοιοστασίας και του Οστικού Μεταβολισμού στη διαδερμική χορήγηση θεραπείας σε γυναίκες με Ψυχογενή Ανορεξία

**ΕΥΓΕΝΙΑ Σ. ΣΤΕΡΓΙΩΤΗ**

**Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 11.11.2009**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 13.1.2010**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ: Αν. Καθ. Ε. ΔΕΛΗΓΕΩΡΟΓΛΟΥ**

**ΠΡΩΤΟ ΜΕΛΟΣ: Επ. Καθ. Ε. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ**

**ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΛΟΣ: Επ. Καθ. Α ΤΣΙΤΣΙΚΑ**

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 24.3.2010

Α' έκθεση προόδου: 10.12.2010

Β' έκθεση προόδου: 3.2.2012

Γ' έκθεση προόδου: 23.1.2013

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Γ.Κ. ΚΡΕΑΤΣΑΣ** Καθηγητής Μ/Γ Παν/μίου Αθηνών

**Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ** Καθηγητής Μ/Γ Παν/μίου Αθηνών

**Δ. ΜΠΟΤΣΗΣ** Καθηγητής Μ/Γ Παν/μίου Αθηνών

**Ε. ΔΕΛΗΓΕΩΡΟΓΛΟΥ** Αν.Καθηγητής Μ/Γ Παν/μίου Αθηνών

**Ε. ΛΑΜΠΡΙΝΟΥΔΑΚΗ** Αν.Καθηγήτρια Γυν. Ενδοκρινολογίας Παν/μίου Αθηνών

**ΕΜ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ** Επ.Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας Παν/μίου Αθηνών

**Α.ΤΣΙΤΣΙΚΑ** Επ.Καθηγήτρια Εφηβικής Ιατρικής Παν/μίου Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ : 19.6.2013





## ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳ δὲ καὶ ὀσίῳ διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποροῦντι, τάναντία τουτέων.



## ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ (ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ)

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέλφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς διδάκτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

- 1991: Πτυχίο ΠΤΔΕ Παν/μίου Ιωαννίνων (Λίαν Καλώς)
- 1998: Πτυχίο Ιατρικής Παν/μίου Ιωαννίνων (Λίαν Καλώς)
- 1998-1999: Ωρομίσθια εκπαιδευτρια στο 1<sup>ο</sup> και 20 ΙΕΚ Ιωαννίνων
- 1998-1999: Περιφερειακό Ιατρείο Ζίτσας ( ΚΥ Δελβινακίου)
- 1999-2000: Ειδικευόμενη Γενικής Χειρουργικής στο Π.Γ.Ν. Αθηνών «Ιπποκράτειο»
- 2000-2004: Ειδίκευση στη Μαιευτική και Γυναικολογία στο Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας.
- 2005: Τίτλος ειδικότητας στη Μαιευτική και Γυναικολογία
- 2005: Άμ. συνεργάτης του τμήματος Παιδικής – Εφηβικής Γυναικολογίας & Επανορθωτικής Χειρουργικής στη Β΄Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Κλινική Παν/μίου Αθηνών στο «Αρεταίειο» Νοσοκομείο, προκειμένου να εξειδικευτώ στην Παιδική και Εφηβική Γυναικολογία
- 2006: Άδεια λειτουργίας Ιδιωτικού Ιατρείου
- 2007: Τοποθέτηση σε θέση αμ. υπεράριθμου ιατρού για έξι (6) μήνες στο ΣΤ΄ Μαιευτικό-Γυναικολογικό τμήμα και Προγεννητικού Ελέγχου του Γ.Ν. Μαιευτηρίου «Έλενα Βενιζέλου» για να εκπαιδευτώ στους υπερήχους.
- 2007: Άδεια εκτέλεσης υπερήχων
- 2008: Πιστοποίηση στη διαγνωστική κολποσκόπηση
- 2008: IFEPAG Fellow, κατόπιν εξετάσεων στο St.Petersburg
- 2008: Ελεγκτής ιατρός στον Οίκο Ναύτου
- 2010 έως σήμερα: Ανεξάρτητος συνεργάτης στο Μαιευτήριο ΙΑΣΩ με συμμετοχή στο πρόγραμμα εφημεριών στην αίθουσα των Χειρουργείων
- 2010-2011: Σύναψη σύμβασης έργου ως θεραπευτής ιατρός με τον ΟΑΕΕ
- 2012-2013: Σύναψη σύμβασης έργου 12 μήνης διάρκειας με τον ΕΟΠΥΥ ως θεραπεύτρια ιατρός με τοποθέτηση στο Σταθμό Προστασίας Μητέρας Παιδιού και Εφήβου στο Υποκατάστημα Ν. Κόσμου
- 2012 έως σήμερα: Έμμισθος συνεργάτης στο Μαιευτήριο ΙΑΣΩ στο τμήμα Υπερήχων με συμμετοχή στο πρόγραμμα on call εφημεριών για το συγκεκριμένο τμήμα

## Συνέδρια

- Παρακολούθηση και συμμετοχή σε 92 Ελληνικά, Πανευρωπαϊκά και Διεθνή Συνέδρια-Σεμινάρια- Ημερίδες- Διαλέξεις

## Δημοσιεύσεις –Ανακοινώσεις

- Συμμετοχή σε 62 Ανακοινώσεις σε Ελληνικά και Διεθνή Συνέδρια και 5 Δημοσιεύσεις
- 3 βραβεία Προφορικών Ανακοινώσεων

## Εθελοντισμός –Κοινωνική προσφορά

- 2011: Ομιλήτρια με θέμα «Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα στην εφηβεία» που πραγματοποιήθηκε στο 1<sup>ο</sup> Τ.Ε.Ε. και 2<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Θήβας αντίστοιχα και στο 4<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Χαϊδαρίου, κατόπιν πρόσκληση του Ι.Σ. Θήβας στο Τμήμα Παιδικής-Εφηβικής Γυναικολογίας & Επανορθωτικής Χειρουργικής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο «Αρεταίειο» Νοσοκομείο
- 2012-έως σήμερα: Εθελοντική Προσφορά ιατρικών υπηρεσιών στο Ιατρείο Κοινωνικής Αποστολής του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών

## Επιστημονικές Εταιρείες

- Μέλος σε 8 Επιστημονικές Εταιρείες ( 2 Διεθνείς)



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η Ψυχογενής Ανορεξία είναι μια σοβαρή διατροφική διαταραχή, αγνώστου αιτιολογίας που εμφανίζεται κυρίως σε έφηβες και νεαρές γυναίκες. Συσχετίζεται με ελαττωμένη οστική πυκνότητα και αύξηση του εφόρου ζωής κινδύνου για οστεοπορωτικά κατάγματα, επιπλέον 2 με 3 φορές σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Η οστική πυκνότητα εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των ορμονικών παραγόντων με τον τρόπο ζωής. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία είναι η οστική μάζα τη χρονική στιγμή εμφάνισης της νόσου και οι γενετικοί παράγοντες, καθώς το 85% της κορυφαίας οστικής πυκνότητας ενός ατόμου είναι γενετικά καθορισμένο. Λόγω του ότι το 45% της οστικής πυκνότητας επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της εφηβείας, η εμφάνιση της Ψυχογενούς Ανορεξίας στην κρίσιμη αυτή αναπτυξιακή περίοδο, μπορεί να αποτρέψει την επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας. Η βλάβη στο οστόν που εμφανίζουν αυτές οι ασθενείς είναι συνεπακόλουθο της μακροχρόνιας ένδειας οιστρογόνων. Μέχρι σήμερα, η ευρέως αποδεκτή κατάλληλη παρέμβαση για την ανάσχεση των απώτερων επιπτώσεων της νόσου στην οστική υγεία αυτών των ασθενών, συνίσταται στην επανάκτηση του φυσιολογικού για την ηλικία σωματικού βάρους και τη συγχορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D. Η από του στόματος χορήγηση οιστρογόνων σαν θεραπευτική επιλογή δεν είναι επιτυχημένη λόγω της περαιτέρω μείωσης του IGF-1 και της τεστοστερόνης. Η εναλλακτική οδός χορήγησης ( διαδερμική), 17-β οιστραδιόλης φαίνεται περισσότερο υποσχόμενη.

Σκοπός: Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, και με βάση την παρατήρηση ότι η ελάττωση και ο βαθμός βλάβης της οστικής πυκνότητας, είναι σε κάποιες ανορεκτικές έφηβες ανεξάρτητοι από το εμμηνορρυσιακό status και τη διάρκεια της αμηνόρροιας, θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση της γενετικής επιβάρυνσης και της ετερογένειας του οστικού μεταβολισμού στην Ψυχογενή Ανορεξία, όπως και στην πιθανή επίδραση στη διαδερμική θεραπεία υποκατάστασης.

Υλικό και Μέθοδος: Σ' αυτή την προοπτική πιλοτική μελέτη έλαβαν μέρος 50 έφηβες ηλικίας 12 έως 21 ετών. Οι 40 ήταν πάσχουσες από ΨΑ, ενώ 10 υγιείς παρόμοιας ηλικίας, αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Για τη διάγνωση της νόσου χρησιμοποιήθηκαν τα προτεινόμενα κριτήρια της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρείας (APA), DSM-V. Με την τεχνική της πυροαλληλούχισης αναλύθηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα της βιταμίνης D(VDR), τον alpha οιστρογονικό υποδοχέα (Esr-1), τον υποδοχέα της καλσιπονίνης (CTR) και τον υποδοχέα του κολλαγόνου τύπου I (COL1A1), ώστε να αποσαφηνιστεί η πιθανή σχέση τους με το δείκτη μάζας σώματος (BMI), τις κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης ( $E_2$ ), το πρότυπο της εμμηνορρυσίας και την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score ).

Αποτελέσματα: Ο πληθυσμός της ομάδας των μαρτύρων είχε μικρότερο LBMD Z-score, μικρότερες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στον ορό, ενώ ήταν πιο πιθανό να εμφανίζει αμηνόρροια. Η συχνότητα κατανομής των γονοτύπων του CTR-AluI πολυμορφισμού, διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων, χωρίς όμως να καταδεικνύεται συσχέτιση με το LBM Z-score. Η συχνότητα κατανομής των Esr1-XbaI γονότυπων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 2 ομάδων, αλλά ο AA γονότυπος συσχετίστηκε με μικρότερη τιμή του LBMD Z-score ( $\leq -1$ ) στην ομάδα των ασθενών. Οι φορείς του A αλληλόμορφου, ήταν πιο πιθανό να έχουν ελαττωμένο LBMD Z-score ανεξαρτήτως των τιμών των συγκεντρώσεων της  $E_2$  στον ορό. Οι φορείς του G αλληλίου φάνηκε να έχουν μειωμένο κίνδυνο να εμφανίσουν οστική βλάβη στη σπονδυλική στήλη, ο οποίος εξαρτάται από τα επίπεδα της κυκλοφορούσης οιστραδιόλης.

Συμπεράσματα: Οι φορείς του T αλληλόμορφου (wt) του CTR-AluI εμφανίζονται σε σημαντικά αυξημένα συχνότητα στις πάσχουσες από ΨΑ, σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό χωρίς όμως να καταδεικνύεται συσχέτιση με την πιθανή οστική βλάβη. Οι ανορεκτικές ασθενείς με το μη μεταλλαγμένο γονότυπο του Esr-1XbaI υποδοχέα, έχουν υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν ελαττωμένη οστική πυκνότητα σε σύγκριση με αυτές που φέρουν το μεταλλαγμένο, καθώς φαίνεται να υφίσταται ένα μοντέλο γονιδιακής δοσολογίας μέσω της δράσης των αλληλίων. Οι πάσχουσες από ΨΑ που φέρουν το G αλληλόμορφο και έχουν



υψηλότερες τιμές οιστραδιόλης στον ορό τους, εμφανίζουν μειωμένο κίνδυνο οστικής βλάβης. (Πιθανή προστατευτική δράση του G). Η πρόωμη αναγνώριση αυτών των ασθενών μπορεί να συνεισφέρει στην πρόληψη και ανάσχεση των απώτερων δυσμενών επιπτώσεων της Ψυχογενούς Ανορεξίας στον οστικό μεταβολισμό, μέσω της έγκαιρης χορήγησης της κατάλληλης θεραπείας.



## SUMMARY

### **“Genetic and biochemical approach of neurohormonal homeostasis response and bone metabolism in transdermal hormone therapy in women with anorexia nervosa”**

**Objective:** Anorexia nervosa is a serious eating disorder of unknown etiology that occurs mainly in adolescent girls and young women. This condition is associated with decreased bone mineral density and greater lifetime risk for fractures. Bone mineral acquisition involves the interaction of hormonal factors with lifestyle. Bone mass at the beginning of the disorder and genetic factors also influence this process. Because approximately 45% of the bone mineral content is acquired during puberty, occurrence of anorexia nervosa at this time may prevent the attainment of optimal bone mass. This bone maleficence occurring to these patients is a result of long term lack of estrogens. In an attempt to prevent further decrease in BMD, weight restoration within normal limits, as well treatments consisting of calcium and vitamin D supplementation are advised for proper management of anorexia nervosa. Per os estrogen administration is not successful because of the concurrent decrease in insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and testosterone, which are already low in anorexia. However, transdermal hormone replacement treatment with physiologic estrogen replacement seems more promising.

**Study design:** Prospective case-control study

**Methods:** Girls diagnosed with AN according to the criteria of APA (proposed DSM-V, 2012) took part in this study. We used pyrosequencing to analyze single nucleotide polymorphisms of genes encoding vitamin D receptor (VDR), estrogen receptor alpha (Esr1), collagen type I (COL1A1), and calcitonin receptor (CTR). Relationships between genotype and body mass index (BMI), cycling status, circulating concentrations of estradiol (E<sub>2</sub>), and lumbar spine bone mineral

density (LBMD and LBMD Z-scores) were determined in 40 girls with anorexia nervosa and 10 age-matched controls.

**Results:** We found that cases had lower LBMD Z-scores and serum E<sub>2</sub> concentrations and were more likely to have amenorrhea. Among cases, amenorrhea was associated with low serum E<sub>2</sub> level. The distribution of CTR-AluI genotypes differed between groups, but this polymorphism was not associated with LBMD Z-score. Distribution of Esr1-XbaI genotypes did not differ between groups, but the AA genotype was associated with decreased LBMD Z-score ( $\leq -1$ ). Carriers of the A allele were more likely to have decreased LBMD Z-score regardless of E<sub>2</sub> serum concentrations. Carriers of the G allele were more likely to have a reduced risk of decreased LBMD Z-score which depends on the levels of circulating estradiol.

**Conclusions:** In our study, although patients with anorexia nervosa were more likely to have the wild type (TT) calcitonin receptor polymorphism than age-matched controls, CTR-AluI genotype was not associated with LBMD Z-score. Anorexic patients with wild type genotype Esr1-XbaI receptor are in greater risk of decreased BMD in relation to those with the mutated gene, since it appears that there is an acting model further increasing the risk through allele action. Prompt recognition of these patients may contribute to the prevention of adverse sequelae on bone metabolism through early administration of the proper therapeutic treatment.





*Léda et le cygne*

*François Boucher, 1741*

## Αντί προλόγου και περί αφιερώσεων.....

---

Τείχη

Χωρίς περίσκεψιν, χωρίς λύπην, χωρίς αιδῶ  
μεγάλα κ' υψηλά τριγύρω μου έκτισαν τείχη.

Και κάθομαι και απελπίζομαι τώρα εδῶ.  
Ἄλλο δεν σκέπτομαι: τον νουν μου τρώγει αυτή η τύχη·

διότι πράγματα πολλά έξω να κάμω είχαν.  
Α όταν έκτιζαν τα τείχη πῶς να μην προσέξω.

Αλλά δεν άκουσα ποτέ κρότον κτιστῶν ἢ ἤχον.  
Ανεπαισθήτως μ' έκλεισαν από τον κόσμον έξω.

Κ.Π. Καβάφης

---

(Από τα *Ποιήματα 1897-1933*, Ἴκαρος 1984)

..... Αφού ολοκληρώθηκε η συγγραφή του επιστημονικού μέρους της μελέτης ,  
έπρεπε κατά το τυπικόν, να γραφτεί ένας πρόλογος , η αφιέρωση και οι  
ευχαριστίες.

Τον πρόλογο τον εμπιστεύτηκα στα λόγια του Καβάφη που με τη λιτότητα της  
ποιήσής του, εκφράζει περισσότερο απ' όσα θα 'γραφα με χίλιες λέξεις.

Οι ευχαριστίες ήταν το εύκολο μέρος. Είναι συγκεκριμένοι οι άνθρωποι που με τη βοήθεια, τις συμβουλές και τη συμμετοχή τους συνέβαλαν στη ολοκλήρωση αυτού του πονήματος.

Ολόψυχα ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Εμ. Οικονόμου και την Επίκουρη Καθηγήτρια και Επιστημονικά Υπεύθυνη της Μονάδας Εφηβικής Υγείας της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Παν/μίου Αθηνών κυρία Α. Τσίτσικα, για τις πολύτιμες συμβουλές και την ενθάρρυνσή τους, όπως και για τις καίριες παρεμβάσεις τους καθόλη την περίοδο της συλλογής, επεξεργασίας και συγγραφής των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ επίσης τον Μοριακό Βιολόγο του εργαστηρίου εξατομικευμένης παρέμβασης του «Αρεταιείου» Νοσοκομείου, κύριο Β. Τσαμαδιά του οποίου η συμμετοχή ήταν ιδιαίτερα πολύτιμη και άκρως απαραίτητη στην γονοτύπηση των πολυμορφισμών και τον στατιστικό του τμήματος επιδημιολογίας του Παν/μίου Θεσσαλίας, κύριο Α. Κατσούλη για τις εξειδικευμένες γνώσεις και συμβουλές του στην στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θα ήταν παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα το φίλο μου και συνάδελφο Μαιευτήρα-Γυναικολόγο κύριο Κ. Δημόπουλο, γιατί στις μεταξύ μας συζητήσεις, βοήθησε πολύ στον προσανατολισμό της επιστημονικής μου σκέψης, όταν η ερμηνεία κάποιων εκ των αποτελεσμάτων έμοιαζε δύσκολη και αντιφατική.

Και ήγγικεν η ώρα της **αφιέρωσης**. Όπως και στις ευχαριστίες, τα πρόσωπα ήταν και πάλι συγκεκριμένα. Το καθένα με τον δικό του ιδιαίτερο, σημαντικό και αποφασιστικό ρόλο στην επιστημονική και επαγγελματική μου πορεία, έτσι που η επιλογή ενός ή δύο, να είναι εξαιρετικά δύσκολη.

Ήθελα να την αφιερώσω στον **πατέρα μου** συνάδελφο ορθοπαιδικό, με ευγνωμοσύνη γιατί μου εμφύσησε τόση αγάπη για την Ιατρική και τον πάσχοντα συνάνθρωπο.

Ήθελα να την αφιερώσω στη **μητέρα μου**, για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη στις δυσκολίες.

Ήθελα να την αφιερώσω στους **δασκάλους μου**, και ιδιαίτερα στον **μέντορά μου** Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Ε. Δεληγεώρογλου, για να εκφράσω με αυτό



τον τρόπο τις ευχαριστίες μου, όχι μόνο για την παρότρυνσή του να ασχοληθώ με ένα θέμα που μου έδωσε την δυνατότητα ν' αποκομίσω τόσες γνώσεις, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την βοήθεια και τις συμβουλές στις δυσκολίες που ανέκυψαν, αλλά και γιατί με τη δική του συνεχή, επί σειρά ετών, παρότρυνση και επιμονή κατέστη δυνατή η έναρξη, η συνέχιση και η ολοκλήρωση της παρούσης διατριβής.

Ήθελα να την αφιερώσω στη **μικρή Ειρήνη-Λήδα**, στο φως των ματιών μου, με απύθμενη αγάπη γιατί με την ωριμότητα που επέδειξε, παρά τα πεντέμισή της χρόνια, ελάφρυνε συναισθηματικά το έργο μου.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, **αφιερώνεται σε όλους μαζί και στον καθένα ξεχωριστά.**

Τέλος, αφιερώνεται **σε όλα τα κορίτσια που μάχονται με την ασθένεια** με την ευχή και την ελπίδα , να βρουν τη δύναμη να «ρίξουνε τα τείχη».

Αθήνα, Ιούνιος 2013.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ .....	7
ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ (ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ) .....	9
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	13
SUMMARY .....	17
Αντί προλόγου και περί αφιερώσεων.....	21
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	33
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	35
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	37
ΟΡΙΣΜΟΙ.....	41
ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ.....	43
Λεπτίνη .....	43
Γκρελίνη.....	47
Νευροπεπτιδίο Υ (NPY).....	48
Πεπτιδίο ΥΥ (PYY).....	50
Β-ενδορφίνη.....	51
ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΑ .....	53
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	55

Οστεοβλάστες .....	55
Οστεοκύτταρα .....	56
Οστεοκλάστες.....	56
ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ .....	59
Ινσουλινομιμητικός Αυξητικός παράγων (IGF-1) .....	60
Ανδρογόνα .....	61
ΚΟΡΥΦΑΙΑ ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ .....	62
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ .....	65
Γονιδιακοί πολυμορφισμοί.....	66
Πολυμορφισμοί των Γονιδίων των Υποδοχέων των Οιστρογόνων.....	67
Πολυμορφισμοί των Γονιδίων του Κολλαγόνου τύπου Ια Ι.....	69
Πολυμορφισμοί των Γονιδίων του Υποδοχέα της Βιταμίνης D .....	71
Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της Καλσιτονίνης (CTR) .....	73
Πολυμορφισμοί του γονιδίου του Ινσουλινομιμητικού Αυξητικού Παράγοντα (IGF-1).....	77
ΝΕΥΡΟΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ .....	79
Λεπτίνη και οστικός μεταβολισμός .....	79
Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) και οστικός μεταβολισμός .....	80
Πεπτίδιο ΥΥ (PYY) και οστικός μεταβολισμός .....	80
Γκρελίνη και οστικός μεταβολισμός .....	81
ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ .....	83
Διπλή Φωτονιακή Απορρόφηση (DXA ή DEXA) .....	84
Ανάγνωση αποτελεσμάτων μέτρησης της οστικής πυκνότητας.....	86
Διπλή Φωτονιακή Απορροφησιμετρία (DEXA) σε παιδιά και εφήβους.....	88

Ορολογία για την εκτίμηση των DEXA αποτελεσμάτων σε παιδιά και εφήβους σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ISCD το 2007 .....	92
Τυποποίηση των μετρήσεων της οστικής πυκνότητας (Standardized Bone Mineral Density- sBMD), Εξισώσεις και Υπολογισμοί .....	93
ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ (BMI) ΚΑΙ BMI Z-SCORE .....	95
ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ.....	103
Επανασίτιση - Επανάκτηση βάρους .....	104
Συμπληρώματα Ασβεστίου και Βιταμίνης D .....	108
Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.....	109
Θεραπεία με χορήγηση ανασυνδυασμένου IGF-1 (r -IGF1).....	110
Θεραπεία με διφωσφονικά .....	111
Άλλες Θεραπευτικές επιλογές .....	112
ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ ΜΕ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.....	113
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΗ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (GSNPs Genotyping).....	115
Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικού Θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP).....	115
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) .....	116
Πυροαλληλούχιση (Pysequencing) .....	118
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	121
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	123
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	127
Ασθενείς.....	127
Κλινικές και Εργαστηριακές Εξετάσεις .....	128

Γονίδια – Πολυμορφισμοί .....	129
Μεθοδολογία προσδιορισμού των εξεταζόμενων Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών (SNPs) .....	131
Πυροαλληλούχιση .....	134
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	139
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	141
Ισορροπία Hardy-Weinberg.....	141
Χαρακτηριστικά δείγματος .....	143
Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων .....	146
Απλή λογιστική παλινδρόμηση πολυμορφισμών και Ψυχογενούς Ανορεξίας .....	148
Εκτίμηση του τρόπου κληρονομικότητας των γονοτύπων του Ctr -AluI στην πιθανή συσχέτιση με την Ψυχογενή Ανορεξία .....	149
Κατανομή συχνοτήτων αλληλόμορφων .....	150
Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση πολυμορφισμών και Ψυχογενούς Ανορεξίας.....	153
Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση αλληλίων και Ψυχογενούς Ανορεξίας .....	153
Ανάλυση ασθενών .....	154
Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων των SNPs, σε σχέση με την τιμή του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών .....	154
Απλή λογιστική παλινδρόμηση της συχνότητας εμφάνισης των SNPs των υπό εξέταση υποδοχέων και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών .....	156
Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των SNPs των υποδοχέων και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών .....	157
Εκτίμηση του τρόπου κληρονομικότητας των γονοτύπων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του υποδοχέα Esr1 και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών.....	158

Κατανομή συχνοτήτων των αλληλόμορφων των SNPs των υπό εξέταση υποδοχέων, σε σχέση με την τιμή του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών.....	159
Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των αλληλόμορφων των SNPs και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών .....	162
Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ( SNPs) των μελετώμενων υποδοχέων σε συσχέτιση με την αμηνόρροια .....	163
Έλεγχος της συσχέτισης των SNPs των εξεταζόμενων υποδοχέων και τιμής του LBMD Z-score στις ασθενείς με αμηνόρροια .....	165
Συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και τιμών του LBMD Z-score, σε συσχέτιση με τη συχνότητα των παρατηρούμενων γονότυπων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του Esr1 υποδοχέα, στην ομάδα των ασθενών.....	168
Συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και τιμών του LBMD Z-score, σε συσχέτιση με την παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλόμορφων του Esr1-XbaI SNP, στην ομάδα των ασθενών.....	170
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	173
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α .....	183
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β .....	185
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	189
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	195





## A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Από την Ελληνιστική ακόμη, περίοδο υπάρχουν αναφορές σοβαρού αυτοκινούμενου υποσιτισμού για θρησκευτικούς λόγους[1]. Με την άρνηση λήψης τροφής, οι ανορεκτικοί ασκητές, παραιτούνταν από τις ανάγκες και τις επιθυμίες του σώματός τους, προκειμένου να επιδιώξουν την τελειότητα και την καθαρότητα της ψυχής[2]. Και ενώ κατά τους Ρωμαϊκούς χρόνους οι ιστορικές αναφορές ελαττώνονται, στο Μεσαίωνα και στην Αναγέννηση η «ιερή ανορεξία» επανεμφανίζεται ως απόδειξη πίστης στον Χριστιανισμό[3]. Από 12<sup>ο</sup> έως τον 17<sup>ο</sup> αιώνα η Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία αναγνώρισε 261 γυναίκες, εμπλεκόμενες σε ακραίες νηστείες και κάθαρση, ως αγίες, ευλογημένες ή υπηρετούσες τω Θεώ[4]. Ονομαστή περίπτωση αποτελεί η Αγία Αικατερίνη της Σιένας (14<sup>ος</sup> αιώνας) της οποίας η αγιότητα υποδείχθηκε με κριτήριο την εξαντλητική νηστεία ως μέσο ύψιστης πνευματικότητας [5].

Η πρώτη ιατρική αναφορά της ασθένειας έγινε από τον Άγγλο Richard Morton το 1689 ο οποίος χρησιμοποίησε τον όρο «Νευρική Ατροφία ή Κατανάλωση» (Nervous Atrophy or Consumption) για την περιγραφή δύο εφήβων ασθενών του [1]. Θα περάσουν σχεδόν τρεις αιώνες ωστόσο σχεδόν ταυτόχρονα, δύο γιατροί δημοσιεύσουν αναφορικά με το Σύνδρομο. Ο ένας εξ αυτών είναι ο Γάλλος Ernest-Charles Laségue, ο οποίος το 1873 την αναγνωρίζει ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα και περιγράφει την εξέλιξή της, εστιάζοντας παράλληλα στα ψυχολογικά συμπτώματα και εξετάζοντας το ρόλο της γονεϊκής επιρροής και των αλληλοεπιδράσεων μέσα στην οικογένεια [6]. Ο άλλος είναι ο Sir William Gull στον οποίο και αποδίδεται η πατρότητα του όρου « Anorexia Nervosa» [7].

Παρότι ο J.A Ryle το 1936, δημοσιεύει στο Lancet μια σειρά 51 περιστατικών αναφέροντας αναλυτικά τα χαρακτηριστικά που περιγράφουν τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας, στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα η Ψυχογενής Ανορεξία συγγέεται με την πανύποφυσιακή καχεξία [8].

Καθώς ο όρος «ανορεξία» παρέπεμπε σε μια γενικευμένη αποφυγή λήψης τροφής, η σύγχυση διατηρήθηκε έως τα μέσα της δεκαετίας του '60, όταν η

εμμονή με την εικόνα του σώματος καταδείχτηκε ως η κινητήριος δύναμη για τον αυτοκινούμενο υποσπισμό.

Όμως μόλις το 1980 η διαταραγμένη σωματική εικόνα θα καταγραφεί επίσημα ως διαγνωστικό κριτήριο της νόσου από την Αμερικανική Ψυχιατρική Εταιρεία (APA). Είχαν προηγηθεί οι δημοσιεύσεις της H. Brush [9] και του A.H Crisp [10] που συνέβαλαν, ώστε να καθοριστούν τα κριτήρια ( DSMII-1980) για τη διάγνωση της [11].

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ψυχογενής Ανορεξία (ΨΑ) είναι μια σοβαρή διατροφική διαταραχή, αγνώστου αιτιολογίας που κατά κύριο λόγο εμφανίζεται σε έφηβες και νεαρές ενήλικες γυναίκες [12]. Ο όρος «ανορεξία» αναφέρεται στην απώλεια της όρεξης» και ο «ψυχογενής» υποδηλώνει το συναισθηματικό υπόβαθρο. Είναι η ψυχιατρική διαταραχή, με το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας [13] που φτάνει το 6% ανά δεκαετία [14].

Διεθνώς η επίπτωσή της στις νέες γυναίκες κυμαίνεται μεταξύ 0,3%-0,5 [14,15,16], ενώ κατά άλλους συγγραφείς είναι μεγαλύτερη και αγγίζει το 2% [17].

Χαρακτηρίζεται από διαταραγμένη εικόνα του σώματος, σοβαρό αυτό-υποκινούμενο υποσιτισμό, απώλεια σωματικού βάρους, έμμονες σκέψεις για το φαγητό, τυπολατρικά πρότυπα που αφορούν την πρόσληψη τροφής, αυξημένη φυσική δραστηριότητα, κατάθλιψη, άγχος και συναισθηματική ευερεθιστότητα [13].

Η έντονη και σοβαρή διαταραχή στην αντίληψη της εικόνας του σώματος και η ανυποχώρητη επιδίωξη της λεπτότητάς του, ο «παράλογος φόβος του πάχους» δηλαδή, οδηγεί το άτομο σε σκόπιμα αυτοεπιβαλλόμενο περιορισμό στην πρόσληψη τροφής και σε κατανάλωση βρώσιμων μετά από προσεκτική επιλογή τους, τόσο σε ότι αφορά την ποιότητα όσο και στην ποσότητα, έτσι ώστε το άτομο να οδεύσει σε σταδιακή απώλεια βάρους και τελικά σε απίσχυανση, καθώς προοδευτικά έχει οδηγηθεί σε κατάσταση λιμοκτονίας.[18,19].

Η βαρύτητα της νόσου εκτιμάται κλινικά απ' το έλλειμμα σωματικού βάρους όπως αυτό προσδιορίζεται από τον Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) επί απουσίας οιδήματος ή ασκίτου [20], και χαρακτηρίζεται μέτρια όταν το BMI είναι  $<17,5\text{Kgr/m}^2$ , σοβαρή όταν είναι  $<15\text{Kgr/m}^2$ , και εξαιρετικά επικίνδυνη για την επιβίωση της ασθενούς όταν είναι  $<12,5\text{Kgr/m}^2$  [20].

Τα επιδημιολογικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι ο επιπολασμός της ΨΑ, έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία πεντηκονταετία, αφορώντας τόσο τα θήλεα –όλο

και νεαρότερης ηλικίας, ακόμη και προεφηβικής– όσο και τους άρρηνες [19,21-23]. Το φαινόμενο αποδίδεται στις αλλαγές που έχουν σημειωθεί στα κοινωνικά «πρότυπα» σε ότι αφορά το ιδεατό-επιθυμητό βάρος και σχήμα του ανθρωπίνου σώματος [19,21,22].

Σύμφωνα με τα ισχύοντα έως σήμερα κριτήρια της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρείας (APA), απαραίτητη για την διάγνωση της νόσου είναι η αμηνόρροια για τουλάχιστον τρεις διαδοχικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους (DSM-IV 1994) [24].

Η αμηνόρροια στην Ψυχογενή Ανορεξία οφείλεται σε διαταραχή στην -μέσω νευροδιαβιβαστών- ρύθμιση, της κατά ώσεις απελευθέρωσης GnRH [15,25].

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΜΗΝΙΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η GnRH είναι μια νευρορμόνη με ρόλο “κλειδί” στην ρύθμιση των αναπαραγωγικών λειτουργιών [25].

Ανακαλύφθηκε από τον Scally και τους συνεργάτες του το 1971 [25] και είναι ένα δεκαπεπτίδιο που παράγεται από τους νευροεκκριτικούς νευρώνες της υπεροπτικής περιοχής του υποθαλάμου [15], απελευθερώνεται δε κατά ώσεις απ' τους τοξοειδείς πυρήνες [25], μέσα στα τριχοειδή της πύλης της υπόφυσης, και μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση απ' όπου και διεγείρει την παραγωγή και έκκριση των γοναδοτροπινών [15]. Η FSH διεγείρει την παραγωγή οιστρογόνων και η LH των ανδρογόνων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των μαστών και την αύξηση του μεγέθους των όρχεων του άρρενος [26].

Η ορθή λειτουργία του άξονα Υποθάλαμος -Υπόφυση- Ωθήκες, ρυθμίζεται από την ακριβή συχνότητα και το εύρος των ώσεων της GnRH, που επισυμβαίνουν κάθε 60-90 min στην ωοθυλακική φάση του καταμήνιου κύκλου και κάθε 120-360 min στην ωχρινική [25], η δε απελευθέρωσή τους υπόκειται σε ρύθμιση απ' τα κυκλοφορούντα στο πλάσμα επίπεδα των στεροειδών του φύλου [15].

Πολυάριθμοι νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές που απελευθερώνονται στον εγκεφαλικό φλοιό, τα υπερθαλαμικά κέντρα και τον υποθάλαμο, τροποποιούν την παλμική έκκριση της GnRH. Οι πιο πολλές απ' αυτές τις ουσίες όπως για παράδειγμα η CRH και το νευροπεπτίδιο Υ, δρουν απευθείας στην γεννήτρια των ώσεων της GnRH, αλλά ταυτόχρονα και στα κέντρα της όρεξης και της πρόσληψης τροφής [25].

Οι ώσεις της GnRH αυξάνουν σε συχνότητα και εύρος κατά τη διάρκεια της ήβης [15,27,28]. Και κάθε ώση της ακολουθείται από ένα κύμα της LH [15,27]. Η FSH επίσης εκκρίνεται με παλμικό τρόπο, αλλά η αιχμή της μπορεί να συγκαλυφθεί λόγω της μικρής ημισείας ζωής της [15].

Ο υποθάλαμος είναι εξαιρετικά ευαίσθητος στα κυκλοφορούντα οιστρογόνα, τα οποία και αναστέλλουν την έκκριση της GnRH με μηχανισμό αρνητικής παλινδρομής ρύθμισης και ο οποίος είναι ενεργοποιημένος καθ' όλη τη διάρκεια

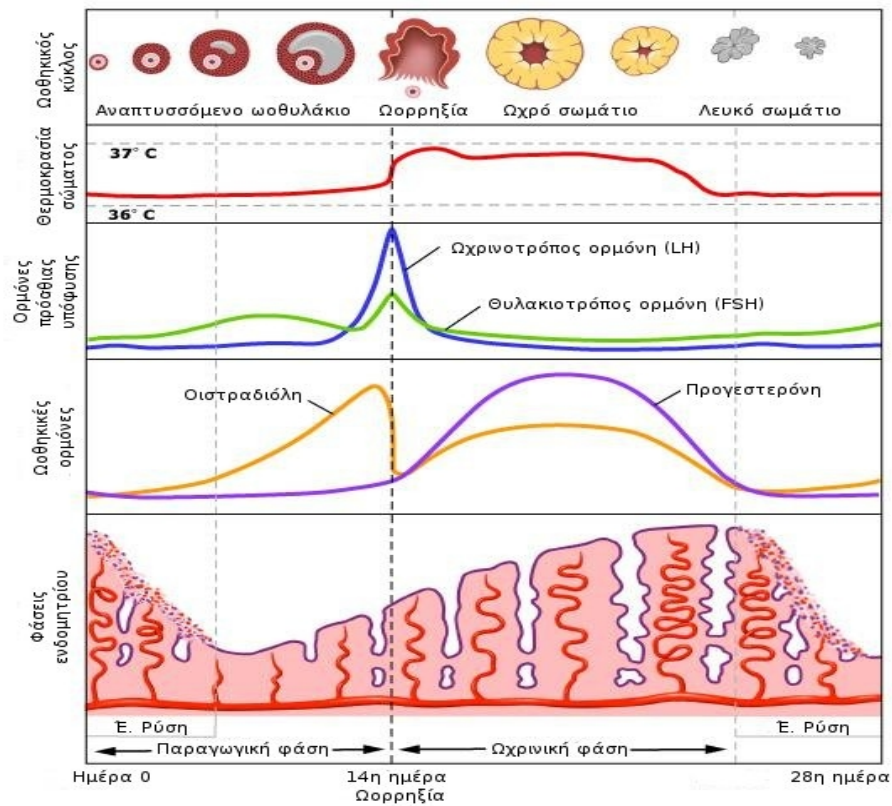
της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας [15]. Αντίθετα ο μηχανισμός της θετικής παλίνδρομης ρύθμισης, κατά τον οποίο ένα “κρίσιμο” επίπεδο οιστρογόνων διεγείρει την παλμική έκκριση της GnRH, οδηγώντας στην αιχμή της LH και στην ωοθυλακιορρηξία, αναπτύσσεται αργότερα στην όψιμη εφηβεία [15,27,28].

Στον φυσιολογικό καταμήνιο κύκλο, κατά την ωοθυλακική φάση τα αυξημένα επίπεδα της FSH διεγείρουν την εμφάνιση του κυρίαρχου ωοθυλακίου και την παραγωγή οιστρογόνων [26,29,30]. Όταν επιτευχθεί το κρίσιμο επίπεδο οιστρογόνων, η ώση της GnRH πυροδοτεί την αιχμή της LH και γίνεται ωοθυλακιορρηξία [15,30].

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ωχρό σωματίο παράγει προγεστερόνη που προετοιμάζει το ενδομήτριο για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Εάν 14 περίπου μέρες μετά δεν επιτευχθεί κύηση, το ωχρό υποστρέφει, τα επίπεδα της προγεστερόνης ελαττώνονται, το ενδομήτριο δεν υποστηρίζεται πλέον ορμονικά και επέρχεται η εμμηνορρυσία [15,26].

Σε απουσία των κατάλληλων επιπέδων οιστρογόνων, δεν υφίσταται ο μηχανισμός της θετικής παλίνδρομης ρύθμισης, με συνέπεια την αμηνόρροια λόγω ανεπάρκειας οιστρογόνων [15].





**Εικόνα 1.** Τροποποιημένη από « Μελέτη των επιπέδων της λεπτίνης και της κορτιζόλης στον φυσιολογικό τοκετό και στην καισαρική τομή», Κ. Δ. Δημόπουλος, 2011



## ΟΡΙΣΜΟΙ

Για την πλειοψηφία των κοριτσιών, η εμμηναρχή επισυμβαίνει 2-3 χρόνια μετά τη θηλαρχή [31] και ο μέσος όρος ηλικίας για τα θήλεα της Καυκάσιας φυλής είναι τα 12,7 έτη [32].

Ο **φυσιολογικός καταμήνιος κύκλος** χαρακτηρίζεται από περιοδικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 21-40 ημέρες, με διάρκεια εμμηνορρυσίας 2-7 ημέρες και απώλεια αίματος που κυμαίνεται μεταξύ 20-80 mL [33].

Ως **αμηνόρροια**: ορίζεται η απουσία αυτόματης εμμήνου ρύσεως σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας.

Στις έφηβες ταξινομείται ως πρωτοπαθής και δευτεροπαθής.

**Πρωτοπαθής** είναι η απουσία εμμηναρχής στην ηλικία των 15 ετών με καλώς ανεπτυγμένα τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου ή απουσία εντός 5 ετών μετά την θηλαρχή (Tanner II), εάν αυτή είχε επισυμβεί πριν τη ηλικία των 10 ετών, ή απουσία εμμηναρχής με ταυτόχρονη απουσία ανάπτυξης των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου μέχρι την ηλικία των 13 ετών [15,34].

Σαν **δευτεροπαθής**, ορίζεται η απουσία αυτόματης εμμηνορρυσίας για τουλάχιστον έξι μήνες ή για χρονικό διάστημα τουλάχιστον ίσο με 3 προηγούμενους καταμήνιους κύκλους σε γυναίκα, στην οποία προηγούμενα είχε εγκατασταθεί φυσιολογική περίοδος [34].

Η **υποθαλαμική αμηνόρροια** είναι μια λειτουργική και αναστρέψιμη διαταραχή που συσχετίζεται με την, διαταραγμένη, παλμική απελευθέρωση της GnRH [25].

Αποτελεί την πιο συχνή μορφή αμηνόρροιας στα έφηβα κορίτσια [15]. Οι ασθενείς που εμφανίζουν υποθαλαμικής αιτιολογίας αμηνόρροια, έχουν ελαττωμένα επίπεδα γοναδοτροφινών και οιστραδιόλης, με διατήρηση της απάντησης της LH και FSH στην χορήγηση GnRH αναλόγων (LH-RH test θετικό) [37].

Η υποθαλαμική αμηνόρροια συσχετίζεται κυρίως με το stress [25,35]. Διάφορες αγχογόνες καταστάσεις ή συνθήκες όπως η δίαιτα, το σοβαρό ψυχολογικό stress

ή η εκσεσημασμένη άσκηση, μπορούν να διαταράξουν τη δραστηριότητα του υποθάλαμο-υποφυσιακού άξονα ο οποίος ελέγχει την ωοθηκική λειτουργία [25,36,37].

Οι προαναφερθέντες παράγοντες επηρεάζουν αρνητικά την αναπαραγωγική λειτουργία είτε δρώντας απευθείας σε περιοχές του υποθαλάμου είτε σε υπερθλαμικά κέντρα στον φλοιό. Τα υπερθλαμικά κέντρα αναλύουν ορμέμφυτα που έχουν την προέλευσή τους σε ερεθίσματα έξω από τον οργανισμό.

Ο υποθάλαμος, αποτελεί το κύριο κέντρο ρύθμισης βασικών φυσιολογικών λειτουργιών όπως η πρόσληψη τροφής, η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, ο ύπνος, η σεξουαλική λειτουργία και η ορμονική ρύθμιση της αναπαραγωγής [25].

## ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ

Νευροπεπτιδία όπως το νευροπεπτιδίο Υ (NPY), η λεπτίνη, η γκρελίνη και η β-ενδορφίνη, έχουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της απελευθέρωσης της GnRH από τους τοξοειδείς πυρήνες [25].

Υπάρχουν 4 «οικογένειες» πεπτιδίων που ρυθμίζουν την ενεργειακή ομοιοστασία.

Πεπτιδία που μειώνουν την όρεξη είναι: το πεπτιδίο ΥΥ, η λεπτίνη, η προοπιομελανοκορτίνη (POMC) και η ορμόνη διέγερσης των άλφα μελανοκυττάρων (AMSH).

Πεπτιδία που αυξάνουν την όρεξη είναι: η γκρελίνη, το νευροπεπτιδίο Υ (NPY), οι ορεξίνες και η ινουλίνη [16].

### **Λεπτίνη**

Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1994 από τον Zhang και τους συνεργάτες του.

Είναι μια πρωτεΐνη με 67 αμινοξέα, που δομικά ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών και παράγεται με κερκάδιο ρυθμό. Εκκρίνεται απ' όλα τα λιποκύτταρα, αλλά επίσης απ' τον υποθάλαμο, την υπόφυση, την συγκυτιοτροφοβλάστη, τους σκελετικούς μύες, απ' το επιθήλιο του μαζικού αδένος και από τα γαστρικά κύτταρα του θόλου του στομάχου. Αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι μια ορμόνη κατά της παχυσαρκίας, που λειτουργεί σαν τον “αγγελιοφόρο” της ενεργειακής κατάστασης του οργανισμού, στον εγκέφαλο [25].

Πράγματι, μία από τις λειτουργίες της είναι να δρα μέσω υποδοχέων στους τοξοειδείς πυρήνες του υποθαλάμου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη τροφής και την αυξημένη κατανάλωση ενέργειας [13].

Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι ένας σημαντικός ενδοκρινικός παράγων που ρυθμίζει διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως: την αιμοποίηση, την

αγγειογένεση, λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος και την αναπαραγωγή [25].

Η πολυκεντρική δράση της λεπτίνης ελέγχεται από τους υποδοχείς της (ob-R). Ισομορφές τους έχουν ανακαλυφθεί σε όλα τα επίπεδα του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες. Ανευρίσκονται στους υποθαλαμικούς πυρήνες, στα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, στην ωοθήκη, το ενδομήτριο, τον προστάτη και τους όρχεις [25].

Περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω διάχυσης, ενώ ανιχνεύεται στον ορό είτε σε ελεύθερη μορφή είτε συνδεδεμένη με πρωτεΐνες οι οποίες είναι ίδιες με τις διάφορες μορφές του διαλυτού υποδοχέα της [13]. Και καθώς οι υποδοχείς διαφέρουν στο ενδοκυττάριο τμήμα τους, υπάρχουν μακρές και βραχείες ισομορφές.

Στους ανθρώπους μεταλλάξεις που αδρανοποιούν το γονίδιο της, όπως και το γονίδιο του υποδοχέα της, έχουν σαν αποτέλεσμα υπερφαγία και σοβαρή παιδική παχυσαρκία [13].

Η ύπαρξη σύνδεσης μεταξύ μεταβολικών και ορμονικών σημάτων και της επίδρασής τους στον αναπαραγωγικό άξονα τεκμηριώθηκε πρόσφατα [25].

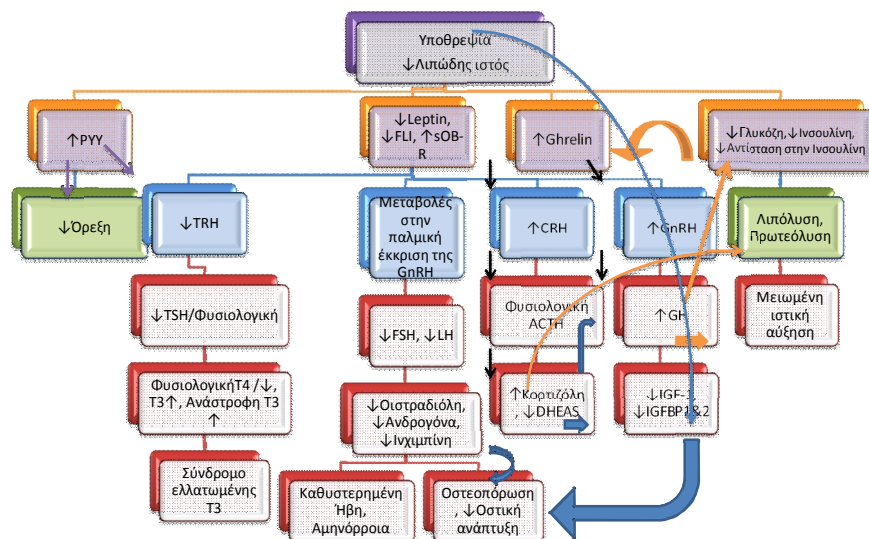
Με την λεπτίνη αυτός ο άξονας αποκτά “μπούσουλα” για την διατροφική κατάσταση και τον βαθμό αποθήκευσης λίπους στον οργανισμό [25]. Τα επίπεδα της αντανακλούν τη μάζα του λίπους και είναι υψηλότερα στις παχύσαρκες και μικρότερα στις λεπτές υγιείς γυναίκες [16].

Η λεπτίνη εκκρίνεται με παλμικό τρόπο έχοντας νυκτερινή αιχμή [13]. Δρώντας σαν υπερευαίσθητος παράγοντας κορεσμού, ρυθμίζει την μάζα του λιπώδους ιστού και τροποποιεί νευροενδοκρινικές διαδικασίες, λειτουργώντας σαν μια σύνδεση μεταξύ μεταβολικών και αναπαραγωγικών διαδικασιών στον οργανισμό [25].

Αφού διέλθει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δρα στους τοξοειδείς πυρήνες του υποθαλάμου όπου επιταχύνει την παλμική έκκριση της GnRH [25].

Οι ασθενείς με υποθαλαμική αμηνόρροια, χαρακτηρίζονται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις λεπτίνης στο ορό τους συγκρινόμενες με ευμηνορροϊκές γυναίκες ίδιας ηλικίας, ύψους και ίδιας μάζας λιπώδους ιστού [25]. Στις γυναίκες που πάσχουν από ανορεξία αλλά έχουν φυσιολογική εμμηνορρυσία, τα επίπεδα της λεπτίνης είναι χαμηλά, αλλά στις ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία και αμηνόρροια είναι ιδιαίτερα χαμηλά και έχουν απολέσει την ημερήσια (diurnal) μεταβλητότητα [16].

Τα χαμηλά επίπεδα της λεπτίνης αρχίζουν την προσαρμοσμένη απάντηση του οργανισμού στο επίπεδο του υποθαλάμου, η οποία εμπλέκει πολλές μεταβλητές του νευροενδοκρινικού άξονα[16], όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.



**Εικόνα 2.** Ορμονική προσαρμογή στην ΨΑ. Τροποποιημένη από Jayasinghe Yet al [16].

Το αποτέλεσμα είναι η μείωση της αναπαραγωγικής και θυρεοειδικής λειτουργίας, η αυξημένη έκκριση κορτιζόλης και αυξητικής ορμόνης με μείωση της έκκρισης του ηπατικού IGF-1, που οδηγεί στην κινητοποίηση των εναλλακτικών ενεργειακών αποθηκών του οργανισμού και μείωση των ενεργειακών δαπανών που αφορούν την ανάπτυξη [16].

Στην Ψυχογενή Ανορεξία εξαιτίας της ελαττωμένης λεπτίνης, της εκσεσημασμένης άσκησης, των μεταβολών στους νευροδιαβιβαστές (όπως στη μελανοκορτίνη και στη σεροτονίνη) και πιθανά λόγω ψυχολογικών παραγόντων, μεταβάλλεται η παλμική έκκριση της GnRH. Η FSH και η LH μειώνονται σε προεφηβικά επίπεδα [16].

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η λεπτίνη δρα απ' ευθείας στην υπόφυση και στην ωοθήκη λόγω της ύπαρξης υποδοχέων της στις προαναφερθείσες θέσεις, αλλά δεν έχει αποδειχθεί [38].

Είναι αξίωμα ότι σε συγκεντρώσεις λεπτίνης στον ορό μικρότερες από 1.85μg/L, η LH αδυνατεί να πυροδοτήσει εμμηνορρυσία.

Η επανεμφάνιση φυσιολογικών καταμήνιων κύκλων συσχετίζεται με [16]:

α) Επίτευξη του 90% του ιδανικού Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) όπως καθορίζεται από το μέσο βάρος για την ηλικία και το ύψος

β) Από την διατροφική κατάσταση και το ενεργειακό απόθεμα

γ) Την μάζα λίπους και ιδιαίτερα από το σπλαγχνικό λίπος

δ) Τα επίπεδα του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα (IGF-1)

ε) Το δείκτη ελεύθερης λεπτίνης (FLI) ο οποίος μπορεί να μετρηθεί με το λόγο του διαλυτού υποδοχέα της, προς την λεπτίνη

στ) Το υπερηχογράφημα πυέλου με φυσιολογική ωοθηκική μορφολογία και μέγεθος μήτρας

ζ) Τα επίπεδα της 17β-οιστραδιόλης στον ορό ( >30pg/ml συσχετίζεται με ανάκτηση της εμμηνορρυσίας ) και τα επίπεδα της LH (< 2.0IU/L, 10πλάσιος κίνδυνος να παραμείνουν αμηνorroϊκές)

η) Τα επίπεδα της β- ινχιμπίνης, για τα οποία έχει βρεθεί ότι προοδευτικά αυξάνονται με την ανάκτηση βάρους ακόμη και προτού αρχίσει ν' αυξάνεται η LH, καθώς δηλώνουν την πολύ πρώιμη ανάπτυξη των ωοθυλακίων υπό την επίδραση της FSH



θ) Την υποκείμενη καλή κατάσταση ( ανεξάρτητος παράγοντας για την επανεμφάνιση της έμμηνου ρύσεως).

## **Γκρελίνη**

Ανακαλύφθηκε από τον Kojima και τους συνεργάτες του το 1999. Είναι ένα αλκυλιωμένο πεπτιδίο 28 αμινοξέων [14,25]. Παράγεται κυρίως από τα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου, αλλά έκκρισή της έχει παρατηρηθεί επίσης στον υποθάλαμο, την υπόφυση, τους πνεύμονες και τα αναπαραγωγικά όργανα όπως η μήτρα και οι όρχεις [14,25].

Έχει σημαντικό ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες που αφορούν την πρόσληψη τροφής, την ενεργειακή ομοιοστασία και τον έλεγχο της αναπαραγωγής [25].

Επί του παρόντος είναι η μόνη γνωστή ορμόνη που αυξάνει την πρόσληψη τροφής [14], διεγείροντας την όρεξη. Επάγει την αποθήκευση λίπους και ελαττώνει την κατανάλωσή του, δρώντας κυρίως στο επίπεδο του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Τα επίπεδά της στο πλάσμα αυξάνουν μετά από απώλεια βάρους, είτε ως αποτέλεσμα δίαιτας είτε μετά από χειρουργική επέμβαση [25].

Υπεύθυνη για την ορεξιογόνο δράση της είναι η ακυλ-ομάδα της [14] και στον άνθρωπο τα επίπεδα στο πλάσμα συσχετίζονται αρνητικά με το Δείκτη Μάζας Σώματος και τα ανδρογόνα [25].

Είναι φυσικός ανταγωνιστής της λεπτίνης, του NPY και του ανταγωνιστή της μελανοκορτινής agouti-related protein (AGRP), γι αυτό και η ορεξιογόνο δράση της μετριάζεται μερικώς από τα προαναφερθέντα νευροπεπτιδία [14]. Τα κυκλοφορούντα επίπεδά της ελαττώνονται με την πρόσληψη τροφής και αυξάνουν πριν τα γεύματα [14], λειτουργώντας σαν “σήμα πείνας” [13].

Δρα στον υποθάλαμο και την υπόφυση και αυξάνει την έκκριση GH, ACTH και κορτιζόλης και, ίσως κι απευθείας, στον λιπώδη ιστό, τα οστά και τους χόνδρους των αρθρώσεων [16].

Η γκρελίνη αυξάνει στις έφηβες με Ψυχογενή Ανορεξία, ως απάντηση στον υποσιτισμό [16]. Είναι σαν ένα μεταβολικό σήμα που ανιχνεύει ανωμαλίες στο σωματικό βάρος και ακατάλληλες διατροφικές συνήθειες. Ίσως με αυτό τον τρόπο η αύξηση των επιπέδων της, να αποτελεί έναν αντιρροπιστικό μηχανισμό του οργανισμού για να αυξηθούν οι προσλαμβανόμενες θερμίδες [14].

Γενικά, στις φυσιολογικού βάρους γυναίκες, τα ολικά κυκλοφορούντα στο πλάσμα επίπεδα γκρελίνης κυμαίνονται μεταξύ 400-1.000 pg/mL, ενώ στις ανορεξικές ασθενείς αναμένεται να είναι μεγαλύτερα από 1.000 pg/mL [14].

Τα επίπεδα της γκρελίνης στους υγιείς ανθρώπους, ελαττώνονται ανάλογα με τη σύσταση και την θερμοδική αξία του γεύματος. Στις ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία αυτή η απάντηση είναι μερικώς ή πλήρως απύσαστα [14].

Επίσης η γκρελίνη έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αναπαραγωγής. Έχει προταθεί ότι υπάρχει πιθανή σύνδεση μεταξύ των αυξημένων συγκεντρώσεων γκρελίνης στο πλάσμα και μειωμένης έκκρισης των γοναδοτροφινών [25]. Στους επίμυες η έγχυση γκρελίνης στις κοιλίες του εγκεφάλου, αναστέλλει την παλμική παραγωγή της LH ενώ σε ωθηκεκτομηθέντες Rhesus πιθήκους, η περιφερική χορήγηση γκρελίνης προκαλεί ελάττωση της συχνότητας των παλμικών ώσεων της LH. Επιπλέον δρα αντίθετα απ' την λεπτίνη, αναστέλλοντας την έκκριση της GnRH [25].

Σε φυσιολογικού βάρους γυναίκες με υποθαλαμική αμηνόρροια τα επίπεδά της είναι αυξημένα, ιδιαίτερα σ' αυτές που αθλούνται [13]. Πιθανότατα είναι υπεύθυνη για την παράταση της αμηνόρροιας σε ασθενείς με ΨΑ που ανακτούν το φυσιολογικό τους βάρος και διακόπτουν την άσκηση [25].

### **Νευροπεπτίδιο Y (NPY)**

Πρωτοαπομονώθηκε το 1992 απ' την ομάδα του Tatemoto. Αποτελείται από 32 αμινοξέα και δρα σαν ρυθμιστής διαφόρων μεταβολικών λειτουργιών [25].

Παράγεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα [25,38], κύρια απ' τους τοξοειδείς και παρακοιλιακούς πυρήνες του υποθαλάμου, αλλά και από το Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα και το πάγκρεας [25].

Η δράση του στην πρόσληψη τροφής και στην θερμογένεση είναι αντίθετες από της λεπτίνης [39]. Εκτός από ρυθμιστής του ενεργειακού ισοζυγίου, επιδρά στην σεξουαλική συμπεριφορά, τον κερκάρδιο ρυθμό, την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης του αίματος, αλλά και στην λειτουργία της μνήμης και της μάθησης [25].

Η κύρια λειτουργία του είναι ο έλεγχος της πρόσληψης τροφής. Επιδρά στο κέντρο της όρεξης στον υποθάλαμο και διεγείρει την λειτουργία που σχετίζεται με αυτή την φυσιολογική διαδικασία. Από κλινικές μελέτες σε πειραματόζωα γνωρίζουμε, ότι έγχυση NPY μέσα στις κοιλίες του εγκεφάλου προκαλεί αύξηση της όρεξης [25].

Επίσης συμμετέχει και στην ρύθμιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας. Μέσω της επίδρασής του στην έκκριση της GnRH, ρυθμίζει την παραγωγή της LH [25]. Εάν οι συγκεντρώσεις των στεροειδών του φύλου και κυρίως της οιστραδιόλης είναι αρκετά υψηλές, επάγει την παραγωγή GnRH ενώ εάν οι συνθήκες είναι υποοιστρογονικές δρα ανασταλτικά. Ακόμη, διεγείρει την στερεοειδογένεση απ' τα επινεφρίδια επάγοντας την έκκριση της CRH, με συνέπεια την αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων της ACTH [25].

Διαμέσου της δράσης του στην έκκριση της GnRH επεμβαίνει στην δράση της λεπτίνης, η οποία επίσης αναστέλλεται απ' την παραγωγή του νευροπεπτιδίου απ' τους τοξοειδείς πυρήνες του υποθαλάμου [25].

Αύξηση του NPY έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς που βιώνουν έντονο φυσικό ή ψυχολογικό stress.

Στον ορό ασθενών με υποθαλαμική αμηνόρροια, οι βασικές συγκεντρώσεις του NPY είναι ελαττωμένες, ενώ η παλμική του έκκριση είναι συχνότερη σε σύγκριση με των γυναικών που έχουν φυσιολογική εμμηνορρυσία. Στις ίδιες ασθενείς έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη συχνότητα των ώσεων της LH.

Κατά τη διάρκεια θεραπείας με υπερθερμιδική δίαιτα, ψυχοθεραπεία και συμπληρώματα διατροφής σε έφηβες που πάσχουν από ΨΑ, ο λόγος λεπτίνη /

BMI παρέμεινε σταθερός, ενώ ο λόγος NPY / BMI ελαττώθηκε [39]. Στον ορό των ιδίων ασθενών οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης αυξήθηκαν, ενώ του NPY ελαττώθηκαν, αλλά αυτές οι μεταβολές δεν συσχετίζονται με την αύξηση του σωματικού βάρους και του BMI, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν την όρεξη και το σωματικό βάρος στην Ψυχογενή Ανορεξία δυσλειτουργούν [39].

Το 86% των ασθενών με αμηνόρροια, επανεμφανίζουν εμμηνορρυσία εντός εξαμήνου απ' την ανάκτηση του 90% του μέσου βάρους για την ηλικία και το ύψος τους. Στις εναπομείνουσες περιπτώσεις στις οποίες δεν ομαλοποιήθηκε ο καταμήνιος κύκλος μετά την αποκατάσταση του σωματικού βάρους, πιθανά συνεισφέρει και η τροποποιημένη ρύθμιση της έκκρισης της λεπτίνης και του NPY [15].

### **Πεπτιδίο ΥΥ (PYY)**

Είναι μία πρωτεΐνη 36 αμινοξέων με ανορεξιογόνο δράση που παράγεται απ' τα L κύτταρα του παχέος εντέρου (κόλον), σαν απάντηση στην πρόσληψη θερμίδων και αυξάνει μετά το φαγητό [40]. Συνδέεται με υποδοχείς στον υποθάλαμο, αναστέλλει την έκκριση του NPY και διεγείρει την έκκριση της προπιομελανοκορτίνης (POMC) απ' τους τοξοειδείς πυρήνες [16,41].

Χαμηλά επίπεδα του πεπτιδίου ΥΥ συσχετίζονται με παχυσαρκία, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ελαττωμένα ανορεξιογόνα σήματα σ' αυτή την περίπτωση, μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη τροφής [41].

Πειραματικές μελέτες καταδεικνύουν ότι η χορήγησή του, σε παχύσαρκους ενήλικες οδηγεί σε μείωση της τροφής που καταναλίσκεται [39], όπως και σε μείωση των επιπέδων της γκρελίνης [40,42].

Σε έφηβες με Ψυχογενή Ανορεξία οι συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ΥΥ είναι σημαντικά υψηλότερες και πιθανά η μειωμένη πρόσληψη τροφής να είναι αποτέλεσμα αυτών των υψηλών επιπέδων [16].

Υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του πεπτιδίου ΥΥ με την πρόσληψη λιπαρών και την κατανάλωση ενέργειας σε ηρεμία. Πιθανά ο συνδυασμός χαμηλής πρόσληψης λιπαρών σε συνδυασμό με την υπερδραστηριότητα, που παρατηρείται στην νόσο, αυξάνει τις συγκεντρώσεις του πεπτιδίου, με αποτέλεσμα να συνεχίζεται περαιτέρω η καταστολή της όρεξης [16].

## **Β-ενδορφίνη**

Ανακαλύφθηκε το 1970 από τον Goldstein. Αποτελείται από 31 αμινοξέα και προέρχεται από τον πρόδρομο της προοπιομελανοκορτίνης (POMC) [44].

Είναι ενδογενές νευροπεπτίδιο που απαντάται στον υποθάλαμο και την υπόφυση και δρα σε πολλαπλές κατευθύνσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, Επίσης έχει αναλγητικές και εθιστικές ιδιότητες. Οι τοξοειδείς πυρήνες του υποθαλάμου εκτός από GnRH παράγουν και μεγάλο αριθμό οπιοειδών πεπτιδίων.

Η πιο σημαντική δράση της β-ενδορφίνης που αφορά την αναπαραγωγή, είναι η ανασταλτική δράση που ασκεί στην κατά ώσεις απελευθέρωση της GnRH. Όμως τα οπιοειδή πεπτίδια αναστέλλουν την έκκριση της LH και με απευθείας δράση στην υπόφυση. Χορηγώντας ενδοφλεβίως β-ενδορφίνη μειώνεται η απελευθέρωση LH στον ορό, ενώ αν χορηγηθεί μορφίνη η πτώση της LH είναι αιφνίδια [25].

Η δράση των οπιοειδών στο επίπεδο Υποθάλαμος – Υπόφυση ελαττώνεται από τους ανταγωνιστές των υποδοχέων τους, όπως πχ από τη ναλοξόνη. Τα οιστρογόνα σε επίπεδο υπόφυσης διεγείρουν την έκκριση β- ενδορφίνης. Πάντως η χορήγηση ναλοξόνης αυξάνει την παλμική έκκριση της LH απ' την υπόφυση, μόνο εάν τα επίπεδα των οιστρογόνων στον υποθάλαμο είναι αρκετά υψηλά [25].

Η εκσεσημασμένη άσκηση αυξάνει τα επίπεδα β-ενδορφίνης στο πλάσμα και κύριος υπεύθυνος είναι η CRH. Σε περιπτώσεις ασθενών με αμηνόρροια επαγόμενη από stress ή από άσκηση, η CRH μπορεί και απ' ευθείας να

αναστείλει την έκκριση της GnRH και να διεγείρει την παραγωγή β-ενδορφίνης. Η β-ενδορφίνη διασπά την παραγωγή της GnRH και γι' αυτό εξασθενεί την απελευθέρωση της LH [25].

Αναφορικά με τα κυκλοφορούντα επίπεδα β-ενδορφίνης στον ορό γυναικών με αμηνόρροια προερχόμενη από απώλεια βάρους, τα δεδομένα απ' την διεθνή βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα. Οι περισσότερες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι σε αμηνόρροϊκές ασθενείς με απώλεια βάρους, η β-ενδορφίνη είναι ελαττωμένη [25,43]. Μια πιο πρόσφατη όμως υποστηρίζει ότι σε νέες γυναίκες που πάσχουν από ΨΑ, τα επίπεδα της β-ενδορφίνης είναι σημαντικά υψηλότερα απ' ότι σε υγιείς με φυσιολογικό βάρος σώματος ή σε παχύσαρκες που δεν εμφανίζουν όμως μεταβολικές διαταραχές [44].

## ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΑ

Η ψυχιατρική νοσηρότητα είναι σημαντική, τόσο στα μερικό όσο και στο πλήρες σύνδρομο, με ισόβιο κίνδυνο κατάθλιψης σε ποσοστό 50-80%, αγχώδους διαταραχής στο 30-65% και κατάχρησης ουσιών στο 12-21% [16]. Θάνατος μπορεί να επισυμβεί στο 8% των περιστατικών, μετά από 10-15 έτη διάρκειας της νόσου [20].

Οι έφηβες που εμφανίζουν ΨΑ έχουν χαμηλότερα ποσοστά χρονιότητας της νόσου (περίπου 17%) συγκρινόμενες με τις ενήλικες, ενώ η μέση συχνότητα θνησιμότητας είναι επίσης χαμηλή, περί το 1.8% [16].

Σε ότι αφορά την αναπαραγωγική λειτουργία και την υγεία του εριστικού συστήματος, τα κλινικά επακόλουθα στην πραγματικότητα, εξαρτώνται από την χρονική εμφάνιση της νόσου σε συνάρτηση με την ήβη [16].

Συνεπώς, μπορεί να συμπεριλαμβάνονται η καθυστέρηση της εφηβείας, η πρωτοπαθής αμηνόρροια, η αναστολή της ενήβωσης -με πιθανή την αποτυχία επίτευξης του βέλτιστου ύψους- και η δευτεροπαθής αμηνόρροια. Από τις έφηβες που λαμβάνουν θεραπεία, το 50-70% αναρρώνει πλήρως, με ανάκτηση του βάρους και επανεμφάνιση της εμμηνορρυσίας [16].

Δυνητικοί απώτεροι κίνδυνοι για την γονιμότητα χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση και εκτίμηση. Σύμφωνα με μία δημοσίευση υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επανεμφάνισης της νόσου κατά τη διάρκεια της κύησης [45]. Οι μέλλουσες μητέρες με ιστορικό Ψυχογενούς Ανορεξίας, έχουν αυξημένη επικινδυνότητα να γεννήσουν νεογνά με μικρότερο βάρος για την ηλικία κύησης, ενώ αυτές με ενεργό νόσο ν' αποκτήσουν απογόνους με μικρότερη περίμετρο κεφαλής ή μικροκεφαλία [45].

Η χαμηλή οστική πυκνότητα είναι ένας υπαρκτός κίνδυνος στην συγκεκριμένη διατροφική διαταραχή, καθώς το 50% των ασθενών εμφανίζει οστεοπενία σε χρονικό διάστημα 20 μηνών απ' την εμφάνιση αμηνόρροιας και το 38% πάσχει από οστεοπόρωση, ακόμη και σε διάστημα μικρότερο των 24 μηνών απ' την διακοπή της εμμηνορρυσίας [16].

Και ενώ οι ενήλικες ασθενείς έχουν σημαντικά ελαττωμένη οστική μάζα [46], οι έφηβες έχουν αυξημένο κίνδυνο για ελαττωμένη οστική πυκνότητα [47], συγκρινόμενες με φυσιολογικά άτομα, κυρίως όταν η νόσος ξεκινά πριν την εφηβεία. Η μείωση στην οστική μάζα μπορεί να ξεπερνάει το 25% της φυσιολογικής, για την ηλικία της ασθενούς, και συσχετίζεται επίσης με την διάρκεια της αμηνόρροιας [46].

Τα χρόνια της εφηβείας είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη των οστών και αποτυχία επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας ( peak bone mass ) προδιαθέτει σε αυξημένο ισόβιο κίνδυνο για κατάγματα. Τα κορίτσια που πάσχουν από ΨΑ έχουν 2-3 [16] φορές μεγαλύτερο εφόρου ζωής κίνδυνο καταγμάτων, συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά άτομα [15].

Η πρόληψη της οστεοπόρωσης ξεκινά με την έναρξη της εμμηναρχής. Ο συνδυασμός άσκησης, κατάλληλης διατροφής και υγιεινού τρόπου ζωής, βοηθούν στην επίτευξη της κορυφαίας αύξησης της οστικής μάζας, και απαραίτητη σ' αυτή την διαδικασία είναι η φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία [46].



## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Το οστόν είναι ένας ζωντανός ιστός που ανανεώνεται συνέχεια, καθόλη τη διάρκεια της ζωής, προκειμένου να ανταποκριθεί στις συνεχώς μεταβαλλόμενες μηχανικές συνθήκες λειτουργίας. Παλιό οστόν αντικαθίσταται από νέο, έτσι που υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ρυθμός απορρόφησης και νεοσχηματισμού, να βρίσκεται σε ισορροπία. Με αυτό τον τρόπο η συνολική μάζα του οστού διατηρείται σταθερή [48].

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από οργανικό και ανόργανο μέρος σε ποσοστό 1/3 και 2/3 περίπου αντίστοιχα [49]. Τα ανόργανα συστατικά είναι κυρίως το φωσφορικό ασβέστιο που βρίσκεται με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, το ανθρακικό ασβέστιο και σε μικρότερα ποσοστά το χλωριούχο και φθοριούχο ασβέστιο, το φθορικό μαγνήσιο και τα αλκαλικά άλατα [48]. Το οργανικό μέρος αποτελείται από τα κύτταρα του οστίτη ιστού και την μεσοκυττάρια ουσία. Η μεσοκυττάρια ουσία ή οστεοειδές, συνίσταται από τα κολλαγόνα ινίδια και τη θεμέλιο ουσία (πρωτεογλυκάνες και άλλες πρωτεΐνες).

Τα κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες. Από τους οστεοβλάστες το οστόν συντίθεται, ενώ συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποικοδομείται από τους οστεοκλάστες.

### **Οστεοβλάστες**

Προέρχονται από αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα του μυελού των οστών και οι βασικές λειτουργίες τους είναι η παραγωγή του οστεοειδούς και η απελευθέρωση αλκαλικής φωσφατάσης για τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Η οστεογένεση μπορεί να γίνει σε έδαφος χόνδρου ή στον ινώδη συνδετικό ιστό, αλλά και στις δύο περιπτώσεις οι οστεοβλάστες εκκρίνουν κολλαγόνο στο οποίο εν συνεχεία εναποτίθενται ανόργανα άλατα. Η πρόσληψη και κατακρήμνιση των ανόργανων αλάτων στο οστεοειδές (μεταλλοποίηση) γίνεται και πάλι με τη βοήθεια των οστεοβλαστών [50].

## Οστεοκύτταρα

Οι οστεοβλάστες παράγοντας αποπιτανωμένο κολλαγόνο εγκλωβίζονται τελικά σε μια κυψελίδα της θεμέλιου ουσίας και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα δημιουργούν αποφυάδες που φέρονται μέσα στα οστικά σωληνάρια και έτσι τα οστεοκύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους, συμμετέχοντας ενεργά στον μεταβολισμό και την ομοιοστασία του ασβεστίου [49]. Διατηρούν την ικανότητα να συνθέτουν θεμέλιο ουσία, η οποία προοδευτικά επιμεταλλώνεται, λαμβάνοντας κατ' αυτό τον τρόπο μέρος στην οστική ανακατασκευή [51].

## Οστεοκλάστες

Είναι πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα που προέρχονται από την οικογένεια των μακροφάγων, και σαν κύρια λειτουργία έχουν την απορρόφηση του οστίτη ιστού μέσω της παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων και ιόντων υδρογόνου. Με αυτό τον τρόπο διαλύονται οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη (αφαλάτωση) και πέπτεται το οστεοειδές [49]. Για την ωρίμανση των μακροφάγων σε οστεοκλάστες είναι απαραίτητη η παρουσία του παράγοντα ενεργοποίησης των αποικιών των μακροφάγων (M-CSF) και του συνδέτη (RANKL) του υποδοχέα για την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα Kappa B(RANK) [51].

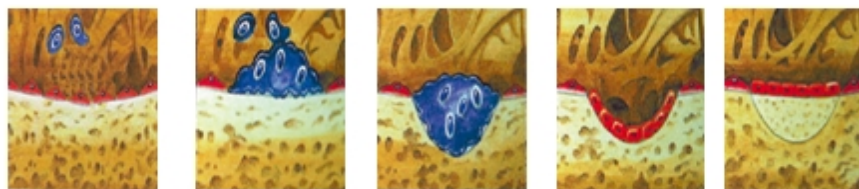
Η οστεοκλαστογένεση ελέγχεται επίσης από μια πρωτεΐνη την οστεοπρωτεγερίνη (OPG), η οποία αναστέλλει τη δράση του RANKL προλαμβάνοντας τη σύνδεση του συνδέτη με τον υποδοχέα του (RANKL/RANK) [52, 53]. Συνεπώς η ισορροπία μεταξύ της έκφρασης του RANKL και της έκφρασης της OPG έχει ιδιαίτερη σημασία για τον έλεγχο του οστού που απορροφάται [53]. Παράγοντες που αυξάνουν το λόγο OPG/RANKL είναι τα οιστρογόνα και ο τροποποιητικός αυξητικός παράγων β (TGF-β) [54]. Μελέτες σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, κατέδειξαν ότι η έλλειψη οιστρογόνων συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση του RANKL, μεγαλύτερο αριθμό πρόδρομων οστεοκλαστών στο αίμα, αυξημένη οστική απορρόφηση και απώλεια οστικής μάζας [55,56]. Από την άλλη, στον ορό

των ασθενών που πάσχουν από ΨΑ, παρά την υποοιστρογοναιμία, οι συγκεντρώσεις του ΟΡG είναι αυξημένες σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες [57].



## ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ

Όπως προαναφέρθηκε το οστόν είναι ένας ζωντανός ιστός που βρίσκεται σε μια δυναμική κατάσταση. Η οστική ανακατασκευή είναι μια συνεχής διαδικασία που ξεκινά από την εμβρυική ζωή και συνεχίζεται έως το θάνατο. Σαν σκοπό έχει την καλή συντήρηση του σκελετού, τη διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων του, αλλά και τη σταθερότητα των τιμών του ιονισμένου ασβεστίου κυρίως, αλλά και του φωσφόρου στο αίμα (ομοιοστασία). Η διαδικασία αυτή επιτελείται με διαδοχική ενεργοποίηση και λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών και προϋποθέτει απόλυτη συνεργασία και ισορροπία μεταξύ τους (φαινόμενο σύζευξης), ώστε μετά την ολοκλήρωσή της το ποσό του οστού που εναποτέθηκε να είναι ίσο με αυτό που απορροφήθηκε. Πάντα προηγείται η απορρόφηση και έπεται η σύνθεση (Εικόνα 3). Όταν διαταραχθεί η ισορροπία υπέρ του ενός ή του άλλου κυττάρου, έχουμε το φαινόμενο της αποσύζευξης το οποίο σχεδόν πάντα, οδηγεί σε έλλειμμα στην ποσότητα του οστίτη ιστού που εναποτίθεται. Η αποσύζευξη είναι η κύρια αιτία πρόκλησης της οστεοπόρωσης.



1η Φάση:  
Ηρεμίας.  
Επίστρωση  
από  
επενδυματικά  
κύτταρα.

2η Φάση:  
Οστεοκλάστες  
προσκολλώνται  
στην οστική  
επιφάνεια.

3η Φάση:  
Απορρόφησης  
Οστεοκλάστες  
απορροφούν  
οστό

4η Φάση:  
Κυτταρικής  
αναστροφής.  
Εξαφάνιση  
οστεοκλαστών  
και  
εγκατάσταση  
οστεοβλαστών  
στο βοθρίο.

5η Φάση:  
Σχηματισμού  
οστού. Παραγωγή  
και πλήρωση του  
βοθρίου με  
νεοσχηματιζόμενο  
οστό. Εξαφάνιση  
οστεοκλαστών και  
εγκατάσταση  
οστεοβλαστών  
στο βοθρίο.

**Εικόνα 3.** Φάσεις της φυσιολογικής οστικής ανακατασκευής

Η σύζευξη οστεοβλάστη-οστεοκλάστη είναι ένα φαινόμενο χρονικά περιορισμένο και αφορά κατά κύριο λόγο τους μη αναπτυσσόμενους νεαρούς ενήλικες. Στην παιδική ηλικία και μέχρι την επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας,

(περίπου στην ηλικία των 25-30 ετών για τα δοκιδωδή οστά ) [58], υπάρχει φυσιολογικά μια υπεροχή των οστεοβλαστών, ενώ μετά την ωρίμανση του σκελετού αρχίζει σταδιακά η φυσιολογική οστική απώλεια.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την οστική ανακατασκευή όπως φαίνεται και στον Πίνακα1, μπορούμε να τους διακρίνουμε σε: συστηματικούς και τοπικούς [59]

### Πιν . 1 Παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή

<b>Ορμονικοί</b>	<b>Τοπικοί</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Παραθορμόνη</li><li>• 1,25 Διυδροξείη Βιταμίνη D3</li><li>• Καλσιτονίνη</li><li>• Αυξητική Ορμόνη</li><li>• Ινσουλίνη</li><li>• Οιστρογόνα</li><li>• Τεστοστερόνη</li><li>• Κορτιζόλη</li><li>• Θυροξίνη</li><li>• Τριωδοθυρονίνη</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ινσουλινομιμητικός Αυξητικός Παράγοντας ( IGF-1)</li><li>• Τροποποιητικοί αυξητικοί παράγοντες β</li><li>• Αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών</li><li>• Αυξητικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων</li><li>• Ιντερλευκίνες 1,4,6,11</li><li>• Παράγων νέκρωσης των όγκων ( TNF)</li><li>• Παράγοντες ενεργοποίησης των αποικιών των μακροφάγων και των κοκκιοκυττάρων</li></ul>

#### **Ινσουλινομιμητικός Αυξητικός παράγων (IGF-1)**

Φυσιολογικά κατά την εφηβεία παρατηρείται αύξηση του IGF-1, ο οποίος συσχετίζεται θετικά με αύξηση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας [60]. Συνδέεται με την ανάπτυξη των οστών επηρεάζοντας το μήκος και το πάχος τους, ενώ υποδοχείς του εντοπίζονται στα νεφρικά κύτταρα, δρώντας έμμεσα στην συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα, καθώς ρυθμίζουν την παραγωγή

της 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνης D[61]. Είναι ένας σημαντικός δείκτης οστεοσύνθεσης που επηρεάζεται άμεσα από τη διατροφή και τη φυσική δραστηριότητα[62].

Στην Ψυχογενή Ανορεξία, ο IGF-1 ελαττώνεται λόγω υποθρεψίας. Η οστεοπενία των νοσούντων εφήβων από ΨΑ, πιθανά συσχετίζεται με την μείωσή του την κρίσιμη αυτή περίοδο, της οστικής αύξησης και ανάπτυξης[63].

## **Ανδρογόνα**

Στο οστόύν έχουν αναγνωρισθεί ειδικοί υποδοχείς για την τεστοστερόνη, την διϋδροτεστοστερόνη και την δεϋδροεπιανδροστερόνη. Η δράση τους περιλαμβάνει την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών, την διαφοροποίησή τους, την σύνθεση πρωτεϊνών και τη διέγερση της μεταλλοποίησης. Έχουν προ-αποπτωτική δράση στους οστεοκλάστες και αντί-αποπτωτική στους οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα. Ενδέχεται να δρουν και σε ιστικό επίπεδο ελατώνοντας την οστική απορρόφηση [46].

## ΚΟΡΥΦΑΙΑ ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Ο σκελετός κατά τη διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας παρουσιάζει ταχεία γραμμική αύξηση, μέχρι την ηλικία των 16-20 ετών όπου και λαμβάνει χώρα η ολοκλήρωση του σχηματισμού των οστών. Ο μεγαλύτερος ρυθμός οστικής ανάπτυξης, στα κορίτσια παρατηρείται στην ηλικία των 11-14 ετών και μέχρι την ηλικία των 16 χρόνων έχει επιτευχθεί περισσότερο από το 90% της κορυφαίας οστικής πυκνότητας, που θα διαμορφωθεί μέχρι το τέλος της δεύτερης δεκαετίας της ζωής [64]. Σ' αυτή την περίοδο τα οστά επιμηκύνονται, αυξάνουν σε διάμετρο και υφίστανται δομικές αλλαγές. Είναι η περίοδος που η οστική σύνθεση προηγείται της απορρόφησης, με υπεροχή της δράσης των οστεοβλαστών έναντι των οστεοκλαστών. Αυτή η περίοδος για τα μεν θήλεα ολοκληρώνεται περί το 18<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας, για τα άρρενα στο 20ο.

Παρότι όμως η ανάπτυξη καθ' ύψος και οι δομικές αλλαγές έχουν ολοκληρωθεί (σκελετική ωρίμανση), η οστική μάζα συνεχίζει να αυξάνεται με εναπόθεση νέων στιβάδων οστίτη ιστού (πύκνωση οστού) και σταματάει όταν επιτευχθεί η μέγιστη οστική πυκνότητα.

Ο όρος **οστική πυκνότητα** αναφέρεται στην επιμετάλλωση του οστού, δηλαδή τη ποσότητα των ανόργανων αλάτων και συγκεκριμένα του υδροξυαπατίτη, ανά μονάδα όγκου, και μετράται σε γραμμάρια ανά κυβικό εκατοστό ( $\text{g/cm}^3$ ).

Το υψηλότερο επίπεδο οστικής πυκνότητας που επιτυγχάνει ένα άτομο κατά τη διάρκεια της ζωής του ονομάζεται κορυφαία οστική πυκνότητα.

Η χρονική περίοδος που επιτυγχάνεται η κορυφαία οστική πυκνότητα και για τα δύο φύλα είναι η ηλικία των 25-35 ετών, και εξαρτάται από τον οστικό μεταβολισμό.

Η κορυφαία οστική μάζα εμφανίζεται με την ολοκλήρωση της σκελετικής ανάπτυξης, η οποία εξαρτάται κυρίως από το χρόνο σύγκλεισης των συζευκτικών χόνδρων [65].

Συνεπώς σε οποιαδήποτε ηλικία η «ποσότητα» και η «ποιότητα» του σκελετού ενός ανθρώπου, μαρτυρά οτιδήποτε συνέβη κατά την ενδομήτριο ζωή και την

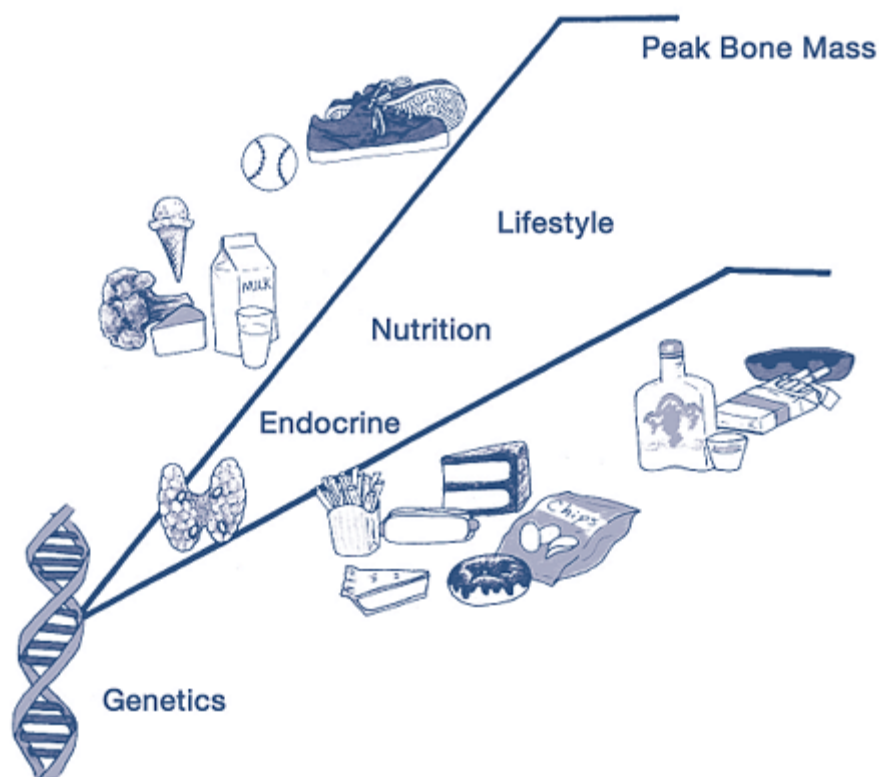


περίοδο της ανάπτυξης καθώς η οστική πυκνότητα στην ενήλικη ζωή, σε κάθε χρονική στιγμή εξαρτάται από τη μέγιστη οστική πυκνότητα που έχει επιτύχει ο οργανισμός, ως ένα είδος παρακαταθήκης.



## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΟΣΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Η επίτευξη της μέγιστης οστικής πυκνότητας κατά τη διάρκεια της παιδικής, εφηβικής και ενήλικης ζωής εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ ορμονών, διατροφικών παραγόντων και τρόπου ζωής (lifestyle) [66] (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Παράγοντες που επηρεάζουν την κορυφαία οστική πυκνότητα.

Το 45% της μεταλλοποίησης των οστών επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της εφηβείας [67] και η εμφάνιση της Ψυχογενούς Ανορεξίας σ' αυτή την κρίσιμη περίοδο, αλληλεπιδρά με την επίτευξη της μέγιστης οστικής μάζας.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν αυτή τη διαδικασία, είναι η οστική μάζα τη χρονική στιγμή της έναρξης της νόσου [68,69], η φυσική δραστηριότητα και οι γενετικοί παράγοντες [68].

Μελέτες σε διδύμους [70-72], υποδεικνύουν ότι οι γενετικοί παράγοντες έχουν ουσιώδη ρόλο στην παθογένεση της οστεοπόρωσης καθώς πάνω από το 85% της κορυφαίας οστικής μάζας (peak bone mass) και της οστικής πυκνότητας (BMD) είναι γενετικά καθορισμένη [73,74]. Εξαρτάται δε από την σκελετική θέση και την ηλικία [72].

Διάφοροι πολυμορφισμοί γονιδίων και των υποδοχέων αυτών, πιθανώς σχετιζόμενοι με την οστική πυκνότητα (BMD) ή τα οστεοπορωτικά κατάγματα, έχουν εκτενώς μελετηθεί σε φυσιολογικό ενήλικο πληθυσμό (διαφορετικών εθνικοτήτων), κυρίως σε περί και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά επίσης και σε φυσιολογικά παιδιά και εφήβους [73,75-89].

### **Γονιδιακοί πολυμορφισμοί**

Πολυμορφισμός είναι μια αλλαγή της αλληλουχίας του γονιδίου που απαντάται με συχνότητα μεγαλύτερη του 1% στο γενικό πληθυσμό. Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί κληρονομούνται με τους νόμους του Mendel και είναι υπεύθυνοι για τη γενετική ποικιλότητα και μοναδικότητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκπροσωπείται από πολυμορφισμούς του ενός μόνο απλού νουκλεοτιδίου (SNPs). Απαντώνται κάθε 300-1000 βάσεις και αντιπροσωπεύουν το 90% των διαφοροποιήσεων [90]. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί είναι το αποτέλεσμα παρελθόντων μεταλλάξεων, που μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά έχοντας ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα και με μειωμένες πιθανότητες μιας επόμενης μετάλλαξης.

Οι περισσότεροι κοινοί πολυμορφισμοί έχουν μόνο 2 αλληλόμορφα (αλληλία). Αυτά μπορούν να εντοπίζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (ιντρόνια), σε περιοχές ρύθμισης των γονιδίων, σε περιοχές μεταξύ των γονιδίων καθώς και σε κωδικοποιούσες περιοχές (εξόνια) [91]. Λιγότερο από 1% των SNPs βρίσκονται σε κωδικοποιούσες περιοχές. Σ' αυτούς οφείλονται οι διαφοροποιήσεις στο φαινότυπο. Παρόλα αυτά και οι υπόλοιπες μεταλλάξεις μπορεί να επιδρούν σε μηχανισμούς που αφορούν τη συναρμολόγηση ή τους μεταγραφικούς

παράγοντες σύνδεσης, επηρεάζοντας κατ' αυτό τον τρόπο το βαθμό έκφρασης του γονιδίου.

### **Πολυμορφισμοί των Γονιδίων των Υποδοχέων των Οιστρογόνων**

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες [92,93], συμπεριλαμβανομένου της κυτταρικής αύξησης και ανάπτυξης και της ρύθμισης των γονιδίων με ειδικότητα ιστού στο αναπαραγωγικό, στο κεντρικό νευρικό και στο εριστικό σύστημα [92]. Επηρεάζουν τις λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, του καρδιαγγειακού, την ακεραιότητα του οστίτη ιστού, αλλά και τις λειτουργίες της γνώσης και της συμπεριφοράς [92].

Επίσης επηρεάζουν την παθολογική διαδικασία των ορμονοεξαρτώμενων ασθενειών, όπως είναι οι νεοπλασίες του μαστού, των ωοθηκών, του ενδομητρίου αλλά και η οστεοπόρωση [93].

Οι βιολογικές τους δράσεις, κύρια ρυθμίζονται από την σύνδεσή τους σε έναν ή δύο ειδικούς υποδοχείς (ERs), Esr1 ή Esr2 οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR) [93].

Με τον “κλασσικό” γονιδιακό μηχανισμό τα οιστρογόνα διαχέονται στο κύτταρο και συνδέονται με τον υποδοχέα τους, ο οποίος εντοπίζεται στον κυτταρικό πυρήνα. Διαμέσου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, δρουν στην περιοχή του υποκινητή του οιστρογόνο-ευαίσθητου γονιδίου, αυξάνοντας ή ελαττώνοντας τα επίπεδα του m-RNA και τη σχετιζόμενη με αυτά πρωτεϊνική παραγωγή και φυσιολογική απάντηση. Αυτός ο τρόπος δράσης τυπικά συμβαίνει σε διάστημα μερικών ωρών. Αλλά μπορούν να δράσουν και πιο γρήγορα (σε δευτερόλεπτα ή λεπτά), μη γονιδιακός μηχανισμός, είτε μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα που εντοπίζεται μέσα ή πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες, είτε μέσω συνδετικών πρωτεϊνών που οδηγούν σε κυτταρικές απαντήσεις, όπως αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου ή του μονοξειδίου του αζώτου και ενεργοποίηση των κινασών [92].

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων έχουν εντοπιστεί σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται με την συμπεριφορά και την πρόσληψη τροφής [94].

Τόσο οι Esr1 όσο και οι Esr2 εντοπίζονται στον υποθάλαμο, στον ιππόκαμπο, στον φλοιό, στον μεσεγκέφαλο και αλλού, η δε δράση τους φαίνεται να' ναι η παροχή νευροπροστασίας [92,95].

Συνεντοπίζονται με τον παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRF), υποδεικνύοντας μια αλληλεπίδραση μεταξύ οιστρογόνων και CRF που πιθανά έχει ρυθμιστική δράση στον άξονα Υποθάλαμος -Υπόφυση- Επινεφρίδια [94].

Και στα δύο φύλα τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την ομοιοστασία του Εριστικού Συστήματος. Η οστεοπόρωση οφείλεται στην αύξηση οστικής απορρόφησης και συσχετίζεται με την ένδεια οιστρογόνων [92].

Τα οιστρογόνα αναστέλλουν την οστική ανακατανομή, μειώνοντας την οστική απορρόφηση απ' τους οστεοκλάστες και επαυξάνοντας την οστική ανακατασκευή απ' τους οστεοβλάστες, είναι δε πολύ σημαντικά για την σύγκλιση των επιφύσεων και στα δύο φύλα όπως και για την ώση (spruit) της ανάπτυξης που παρατηρείται στην εφηβεία [96].

Οι κύριοι ρυθμιστές της δράσης των οιστρογόνων στο σκελετό φαίνεται να' ναι οι υποδοχείς τύπου alpha (Esr1) [97]. Οι οστεοβλάστες εκφράζουν επίσης Esr2, αλλά αυτών η δράση είναι πολύ λιγότερο γνωστή [16,92].

Από δεκαετίας είναι γνωστό ότι η ευεργετική δράση των οιστρογόνων οφείλεται, μερικώς, στην ικανότητά τους να καταστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών απ' τα T κύτταρα και τους οστεοβλάστες [98]. Η μία υπόθεση είναι ότι τα οιστρογόνα μέσω γονιδιακού μηχανισμού επάγουν την απόπτωση, χωρίς να υπάρχει ανάγκη για απευθείας σύνδεση στο DNA με τον α υποδοχέα τους. Μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι η διέγερση του Esr1 στους οστεοκλάστες, επάγει την έκφραση του συνδέτη του Fas (Fas Ligand/FasL), ο οποίος με την σειρά του οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, μέσω αυτοκρινούς μηχανισμού. Ενώ η τρίτη αναφέρει ότι με γονιδιακή ρύθμιση επάγεται η σύνδεση του Esr1 στις μεταγραφικές περιοχές του γονιδίου του Fas Ligand, με αποτέλεσμα οι οστεοβλάστες μέσω παρακρινικής ρύθμισης να επάγουν την απόπτωση των οστεοκλαστών [98].

Πολυμορφισμοί των υποδοχέων μπορεί να επηρεάσουν την ευθραυστότητα των οστών [96]. Μια μετανάλυση των δημοσιεύσεων, έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση

μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI του Esr1, της οστικής πυκνότητας και της εμφάνισης καταγμάτων, με υψηλότερες τιμές πυκνοτήτων στους XX (wt) ομοζυγώτες και ελαττωμένο κίνδυνο οστικού κατάγματος, σε άτομα που φέρουν το συγκεκριμένο γονότυπο [99].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι στα κορίτσια η οστική πυκνότητα στην παιδική ηλικία, αλλά και η μεταλλοποίηση των οστών στα τέλη της εφηβείας, συσχετίζεται με τους πολυμορφισμούς του Esr1 (PvuII-XbaI) [100,89].

Τέλος η παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων ποικίλλει με την ηλικία και τον τύπο του οστού ( σπογγώδες ή συμπαγές ) [92].

### **Πολυμορφισμοί των Γονιδίων του Κολλαγόνου τύπου Ια Ι**

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου Ι (COLIA 1 και COLIA 2) κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοπόρωσης [101]. Το γονίδιο του κολλαγόνου τύπου Ι alpha 1 (COLIA I) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q21.31-q22 και κωδικοποιεί την alpha 1 αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου Ι, την πιο σημαντική πρωτεΐνη για τη θεμέλια ουσία των οστών. Μετάλλαξη σ' αυτό το γονίδιο προκαλεί το Σύνδρομο ατελούς οστεογένεσης (osteogenesis imperfecta) που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευθραυστότητα των οστών και ελαττωμένη οστική πυκνότητα [102].

Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της οστικής πυκνότητας και πολυμορφισμών εντός του εγγύς υποκινητή του COLIA I και πολυμορφισμών μέσα στο ιντρόνιο 1 του COLIA I. Εν συνεχεία η έρευνα εστιάστηκε σε έναν πολυμορφισμό μέσα στο ιντρόνιο 1, που εδράζεται στη θέση σύνδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 [99]. Αυτός ο πολυμορφισμός (rs 1800012), που ανακαλύφθηκε από τους Grant et al [103], εμπλέκει μια θέση σύνδεσης για την μεταγραφή του παράγοντα Sp1 που είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της σύνθεσης του προκολλαγόνου τύπου 1, στο πρώτο ιντρόνιο του COLIA I. Κατ' αυτό τον τρόπο επηρεάζει την ρύθμιση

του γονιδίου του κολλαγόνου, τροποποιώντας τη συγγένεια δέσμευσης του Sp 1 στο DNA, αυξάνοντας τη μεταγραφή αλλά και την παραγωγή του COLIA I mRNA και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Προκαλείται κατ' αυτό τον τρόπο ανισορροπία μεταξύ των αλυσίδων 1 και 2 . Και αυτό έχει σαν συνέπεια να μεταβάλλεται η μεταλλοποίηση και η αντοχή των οστών [99]. Ο πολυμορφισμός αυτός αλληλεπιδρά με την οστική πυκνότητα για να αυξήσει τον κίνδυνο οστεοπορωτικού κατάγματος [101].

Το συγκεκριμένο γονίδιο είναι απ' τα πιο εκτενώς μελετημένα στη διεθνή βιβλιογραφία, ως υποψήφιο για τη γενετική διάγνωση της οστεοπόρωσης γιατί συσχετίστηκε με ελαττωμένη οστική πυκνότητα (BMD) και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων, ιδίως σπονδυλικών, στους Καυκάσιους πληθυσμούς. Πράγματι στην ευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη GENOMOS ( Genetic Markers for Osteoporosis ) με συμμετοχή και από την Ελλάδα, στην οποία έγινε γονοτύπηση του COLIA I Sp1 σε 26.242 συμμετέχοντες, καταδείχθηκε ότι οι φέροντες τη μετάλλαξη T σε ομοζυγωτία (TT), έχουν ελαττωμένη οστική πυκνότητα τόσο στα οστά της σπονδυλικής στήλης όσο και αυχένα του μηριαίου, συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες που φέρουν το μη μεταλλαγμένο άγριο τύπο (GG wild type) αλλά και με τους ετεροζυγώτες (GT).

Σε ότι αφορά τα σπονδυλικά κατάγματα οι γυναίκες που φέρουν τον TT ή TG γονότυπο φαίνεται να έχουν 1.40 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για σπονδυλικά κατάγματα σε σύγκριση με τις GG ομοζυγώτριες [102]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μεταγενέστερη μελέτη που αφορούσε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (The Rotterdam Study) [105].

Λίγες μελέτες έχουν εκπονηθεί σε παιδιά και εφήβους. Οι πολυμορφισμοί του COLIA 1 φαίνεται να επηρεάζουν την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά των οστών και στην πρώιμη εφηβεία [78,106]. Ιδιαίτερος ενδιαφέρον είναι ότι αναφέρεται πως η μετάλλαξη του COL1A1 Sp1 φαίνεται να συσχετίζεται με τριπλασιασμό της συχνότητας της εμφάνισης καταγμάτων σε παιδιά προεφηβικής ηλικίας [107].



## Πολυμορφισμοί των Γονιδίων του Υποδοχέα της Βιταμίνης D

Η Βιταμίνη D διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων των οστών, την εντερική του απορρόφηση και την έκκριση της παραθορμόνης (PTH) [101].

Για την βιολογική ενεργοποίησή της (1,25-διϋδροξύ βιταμίνη D<sub>3</sub>), απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η σύνδεσή της με τον ειδικό υποδοχέα της (VDR ) που δρα ως εξαρτημένος απ' αυτή μεταγραφικός παράγοντας [108]. Ο υποδοχέας της Βιταμίνης D ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, όπου ανήκουν και οι υποδοχείς των στεροειδών. Υποδοχείς της Βιταμίνης D εντοπίζονται σε περισσότερα από 36 όργανα και ιστούς όπως το έντερο, οστά, εγκέφαλος, παραθυρεοειδείς αδένες, νεφρός, μήτρα, ωθήκες, προστάτης κλπ. Γενετικές τροποποιήσεις του, μπορεί να οδηγήσουν σε ελαττωμένες γονιδιακές ενεργοποιήσεις, που επιδρούν κυρίως στο μεταβολισμό του ασβεστίου, αλλά και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αυτοανοσία κ.α.

Το γονίδιο του υποδοχέα της Βιταμίνης D (VDRG) ανακαλύφθηκε το 1997 από τους Miyamoto και συν [109]. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση q12-q14 και είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 200 πολυμορφισμοί, ως επί το πλείστον μονονουκλεοτιδικοί και οι περισσότεροι εντοπίζονται σε μη κωδικοποιημένες περιοχές (ιντρόνια).

Το γονίδιο VDR είναι εκείνο απ' το οποίο ξεκίνησε η μελέτη της γενετικής της οστεοπόρωσης [110]. Πολυμορφισμοί που έχουν μελετηθεί αναφορικά με τη συσχέτισή τους με την οστική πυκνότητα, την οστεοπόρωση και τους σκελετικούς φαινοτύπους είναι οι: BsmI, ApaI, TaqI, FokI και ο Cdx-2. Οι τρεις πρώτοι εντοπίζονται στην περιοχή 3' και καθώς εδράζονται σε ιντρόνια δεν μεταβάλλουν την πρωτεϊνική δομή του υποδοχέα ούτε τη δεσμευτική του ικανότητα [111-113].

Ο BsmI εντοπίζεται, όπως αναφέρθηκε στο 3' άκρο του γονιδίου στο ιντρόνιο 8 και στον οποίο μία βάση γουανίνης (G) έχει αντικατασταθεί από αδενίνη (A).

Ο FokI εδράζεται στο εξόνιο 2 και είναι αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη (T/C). Καθώς η αλλαγή γίνεται στο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η μετάφραση να ξεκινά από ένα εναλλακτικό κωδικόνιο και συνεπώς η παραγόμενη πρωτεΐνη να είναι κατά 3 αμινοξέα μικρότερη.

Παράγονται λοιπόν 2 ισομορφές (F και f) που διαφέρουν ως προς τη μεταγραφική τους δραστικότητα με αποτέλεσμα να επιδρούν στη λειτουργικότητα του υποδοχέα [114,115].

Το 1994 για πρώτη φορά, στη μελέτη των Morrison και συνεργατών, το αλληλόμορφο B του BsmI συσχετίστηκε με μειωμένη οστική πυκνότητα σε υγιείς Καυκάσιους [113]. Ακολούθησαν αρκετές δημοσιεύσεις που στην πλειονότητά τους αφορούσαν λευκές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που επιβεβαίωναν το παραπάνω αποτέλεσμα [117-119], αλλά και άλλες που δεν κατέδειξαν συσχέτιση του SNP με ελαττωμένη οστική πυκνότητα στο ισχίο ή τη σπονδυλική στήλη [120-123].

Επίσης, ελέγχθηκε η συσχέτισή του με το ρυθμό οστικής απώλειας όπως και οι αλληλεπιδράσεις του με άλλα υποψήφια για οστεοπορωτική νόσο, γονίδια. Οι πιο πολλές δημοσιεύσεις αφορούν την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα του κολλαγόνου τύπου I (COL1A1) και τον alpha υποδοχέα των οιστρογόνων (Esr1) [116,124-126].

Λόγω των αντικρουόμενων στη βιβλιογραφία αποτελεσμάτων έγιναν μεταanalύσεις. Η πλειοψηφία αυτών καταδεικνύει συσχέτιση του γονιδίου VDR με την οστική πυκνότητα [127-129].

Έχει αναφερθεί ότι οι έφηβες πάσχουσες από αβιταμίνωση D, έχουν αυξημένο κίνδυνο να μην πετύχουν την κορυφαία οστική πυκνότητα γεγονός που καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο της βιταμίνης D, στην οστική αύξηση και ανάπτυξη στην εφηβεία και υποδεικνύει ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στον ενδοκρινικό καταρράκτη που αφορά την παθοφυσιολογία της, είναι υποψήφιοι τόποι μελέτης της γενετικά οφειλόμενης οστεοπόρωσης [130]. Πράγματι οι πολυμορφισμοί BsmI και FokI φαίνεται να εμπλέκονται στη διαμόρφωση της οστικής πυκνότητας παιδιών, εφήβων και νεαρών ενηλίκων γυναικών. Το B αλληλόμορφο του BsmI, συσχετίστηκε με ελάττωση αυτής στα οστά της

σπονδυλικής στήλης, σε λευκά θήλεα παιδικής και εφηβικής ηλικίας [131,132], ενώ για τον Fokl οι δημοσιεύσεις ανέφεραν αντικρουόμενα αποτελέσματα, εξαρτώμενα από τη σύσταση του πληθυσμού (αμιγή θήλεα ή μικτός Καυκάσιος παιδικός πληθυσμός) [ 85,86,133,134]. Από την άλλη η χορήγηση συμπληρωμάτων περιέχοντα βιταμίνη D, πιθανά συσχετίζεται θετικά με την αύξηση της οστικής πυκνότητας σε λευκές υγιείς έφηβες που φέρουν το F αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία [81]. Τέλος στις Γιαπωνέζες έφηβες το F αλληλόμορφο του Fokl φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένη οστική πυκνότητα, τόσο στη σπονδυλική στήλη όσο και στο ισχίο [135].

### **Πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα της Καλσιτονίνης (CTR)**

Η καλσιτονίνη ανακαλύφθηκε από τον Coop και τους συνεργάτες του το 1962 [136]. Συντίθεται κυρίως από τα θυλακιώδη κύτταρα (C) του θυρεοειδή αδένου, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ύπαρξης και μη θυρεοειδικής προέλευσης καλσιτονίνης [137-140].

Ο κύριος ρόλος της καλσιτονίνης είναι η βραχύχρονη ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου. Στο μεγαλύτερο ποσοστό η λειτουργία αυτή επιτυγχάνεται με άμεση δράση πάνω στους οστεοκλάστες, όπου προκαλεί απώλεια μεγάλου μέρους του κροσσωτού τους επιθηλίου [141,142], ελάττωση του αριθμού τους και της εκκριτικής τους ικανότητας, γεγονός που συνεπάγεται αναστολή της οστικής απορρόφησης [143,144]. Σύγχρονα ως απάντηση στην ελάττωση της οστικής απορρόφησης, μειώνει τα επίπεδα φωσφόρου στον ορό, την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, ενώ παράλληλα αυξάνει την απέκκρισή του από τους νεφρούς και τη φωσφατουρία. Η καλσιτονίνη αν και αναστέλλει την οστεοκλαστική δραστηριότητα, εντούτοις φαίνεται πως ευνοεί την επιβίωση των οστεοκλαστών και αποτρέπει την απόπτωσή τους [145,146]. Είναι ενδιαφέρον ότι η έλλειψη (σε θυρεοειδεκτομή) ή η υπερέκκρισή της (μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένου) δεν προκαλεί διαταραχή στο μεταβολισμό του ασβεστίου, ούτε σημαντικές αλλαγές στο οστόν [147].

Επίσης επηρεάζει έμμεσα τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής, αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου της 1-α υδροξυλάσης που καταλύει την μετατροπή της βιταμίνης D στην δραστική της μορφή (1, 25-διϋδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>) [148]. Οι δυο τους, σε συνδυασμό με την παραθορμόνη πιστεύεται ότι προστατεύουν το σκελετό σε συνθήκες «stress», που δημιουργούνται σε περιόδους μεγάλων αναγκών του οργανισμού σε ασβέστιο, όπως για παράδειγμα στην ανάπτυξη, στην κύηση και τη γαλουχία [149,150].

Άλλη δράση της καλσιτονίνης είναι η αναλγητική, σε πολλά είδη πόνου αλλά ιδιαίτερα στον οστικό. Η αναλγησία που προσφέρει σε οστικές παθήσεις δεν συσχετίζεται με τη δράση της στους οστεοκλάστες και την οστική απορρόφηση [151], αλλά με κεντρική ρύθμιση μέσω της σεροτονίνης [152-154]. Η καλσιτονίνη είναι αποτελεσματική επίσης στον σπλαγχνικό πόνο (πεπτικό έλκος, οξεία παγκρεατίτιδα), στον μετεγχειρητικό πόνο (μετά από ακρωτηριασμό ή μετά από υστερεκτομία) και στην ημικρανία. Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης της δεν είναι πλήρως γνωστός. Πιθανολογείται ότι οφείλεται στην απευθείας δράση στο κέντρο της αντίληψης του πόνου, στην αύξηση της διέγερσης των β-ενδορφινών, στην αναστολή της σύνθεσης της PGE<sub>2</sub> προσταγλανδίνης και στην επίδραση της καλσιτονίνης στο χοληνεργικό σύστημα [151,155-157].

Υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτιση της καλσιτονίνης με τον κυτταρικό κύκλο, τους αυξητικούς παράγοντες και την καρκινική βιολογία. Αναστέλλει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού [158,159], αλλά προάγει την ανάπτυξη του όγκου στον καρκίνο του προστάτη [160].

Η καλσιτονίνη καθώς και οι υποδοχείς της έχουν ανιχνευθεί σε περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος σχετικές με τη ρύθμιση της όρεξης, τη βρώση και την εκκριτική λειτουργία του γαστρεντερικού. Συγκεκριμένα φαίνεται να προκαλεί καταστολή της όρεξης (calcitonin induced anorexia), των γαστρικών εκκρίσεων και της πρόσληψης τροφής [161-163].

Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (CTR) είναι μια επταδιαμεμβρανική πρωτεΐνη, που ανήκει στην τάξη II της οικογένειας των υποδοχέων στους οποίους δεσμεύονται οι G-πρωτεΐνες (Seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor superfamily, GPCR). Οι G-πρωτεΐνες είναι μια υπεροικογένεια

πρωτεϊνών, της οποίας τα μέλη εμφανίζουν κυτταροπλασματική αντιστρεπτή δέσμευση με τους υποδοχείς τους. Όταν η πρωτεΐνη δεσμευτεί με τον υποδοχέα της, ενεργοποιείται. Η οικογένεια των GPRC περιλαμβάνει το πεπτιδίο PTH/PTHrP [164], τη σεκρετίνη [165], το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτιδίο (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) [166], το glucagon like πεπτιδίο [167], τον παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GHRF) [168], το γλυκαγόνο [169], το πολυπεπτιδίο ενεργοποίησης της υποφυσιακής αδενυλικής κυκλάσης (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) [170], τον υποδοχέα του παράγοντα απελευθέρωσης της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (CRF) [171] και υποδοχείς γαστρικών ανασταλτικών πεπτιδίων [172].

Οι υποδοχείς GPRC αντιδρούν μ' ένα εξωκυττάριο ερέθισμα, με το οποίο συνδέονται και μεταφέρουν ενδοκυτταρικά. Και παρά το ότι έχουν παρόμοια δομή έχουν διαφορετική ακολουθία αμινοξέων. Οι πιο χαρακτηριστικοί υποδοχείς GPCR για την οικογένεια των CGRP (calcitonin-gene related peptide), είναι η οικογένεια II, ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (CTR), και ο calcitonin receptor-like receptor (CL) [173]. Εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αίσθηση της όρασης και της όσφρησης, στη συμπεριφορά και τη διάθεση δεσμεύοντας νευροδιαβιβαστές όπως η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και το γλουταμικό [174-176], στη ρύθμιση της ανοσίας και της φλεγμονής [174,176], και μέσω της ρύθμισης του αυτόνομου νευρικού συστήματος, στη λειτουργία της πέψης, του καρδιακού ρυθμού και της αρτηριακής πίεσης [174,175].

Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (CTR), όπως και ο υποδοχέας calcitonin receptor-like receptor (CL), ελέγχεται από πρωτεΐνες (συνεργές) που ρυθμίζουν την ενεργότητα και τον τρόπο δράσης τους (receptor activity modifying proteins-RAMP) [173,177]. Η καλσιτονίνη μπορεί και συνδέεται με τον υποδοχέα της χωρίς την παρεμβολή των RAMPs. Παρόλα αυτά αν συνδεθεί μαζί τους επιτυγχάνεται η διαμόρφωση διαφόρων τύπων υποδοχέων που έχουν υψηλή συγγένεια με την αμυλίνη και ποικίλη με τον CGRP. Την υψηλότερη όμως συγγένεια την έχουν με την καλσιτονίνη. Ο CTR όταν συνδέεται με τους RAMP-1,-2,-3 ονομάζεται AMY-1, AMY-2 και AMY-3 αντίστοιχα [173]. Όμως αντιδρούν και με άλλα πεπτιδία με τους αντίστοιχους συνδέτες τους [178].

Υποδοχείς της καλσιτονίνης υπάρχουν μεν κυρίως στα οστά - όπου υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου ένα εκατομμύριο σε κάθε οστεοκλάστη [179] - αλλά και στους νεφρούς, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους σκελετικούς μύες, στα λεμφοκύτταρα, στον πλακούντα, στις γονάδες, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα όπως στις κακοήθεις νεοπλασίες του μαστού και του προστάτη [180].

Το γονίδιο του υποδοχέα της καλσιτονίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q21 και υπάρχουν τουλάχιστον 5 ισομορφές που εμφανίζουν διαφορετική ανταπόκριση στην ορμόνη, πιθανά ως μηχανισμό ρύθμισης της βιολογικής απόκρισης σ' αυτήν.

Λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου. Ο παράγοντας διέγερσης των αποικιών των μακροφάγων (M-CSF), και ο πυρηνικός παράγοντας κ B (NFκB) ρυθμίζουν την έκφραση και τη λειτουργία των υποδοχέων. Η έκφραση του γονιδίου μπορεί και αναστέλλεται από την καλσιτονίνη, ενώ διεγείρεται από τα γλυκοκορτικοειδή. Τέλος η έκφραση των υποδοχέων στους οστεοκλάστες ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της οστεοκλαστογένεσης [181].

Εκτός όμως από τις ισομορφές έχουν εντοπιστεί και αρκετοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο CTR. Οι περισσότεροι είναι αλλαγής ενός μόνο νουκλεοτιδίου (SNP). Το 1997 ανακαλύφθηκε ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση AluI [182]. Το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία AGCT. Η ύπαρξη πολυμορφισμού μετατρέπει την αλληλουχία σε AGCC- η θυμίνη αντικαθίσταται από κυτοσίνη- και συνεπώς χάνεται η θέση αναγνώρισης του ενζύμου. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στο σχηματισμό προλίνης (CCG) αντί για λευκίνη (CTG) . Από αυτή την αλλαγή προκύπτουν 3 γονότυποι (TT,TC,CC). Σε πολλές περιπτώσεις μόνο μία μετάλλαξη σε γονίδιο υποδοχέα που λειτουργεί με μεσολάβηση G-πρωτεϊνών, οδηγεί σε νόσο. Η βιβλιογραφία σε ότι αφορά τη λειτουργικότητα, την βιοενεργότητα, αλλά και την πιθανή μεταβολή του σημείου δέσμευσης των δύο υποδοχέων είναι αντικρουόμενη [179,182,183].

Παρόλα αυτά, πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι 3 γονότυποι σχετίζονται με διαφορές στην οστική μάζα [184,185], στην οστική πυκνότητα [185,186], στον κίνδυνο καταγμάτων [183 ] και στο σωματικό βάρος [184]. Το πλείστο των

δημοσιεύσεων αφορά περί- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διαφορετικών εθνικοτήτων με αντικρουόμενα αποτελέσματα [184,185,187-191]. Μια μελέτη σε περί- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Κάτω Ιταλία συσχετίζει τον CC γονότυπο με ελαττωμένη οστική πυκνότητα στα οστά της σπονδυλικής στήλης και τη νεαρότερη ηλικία εμφάνισης οστεοπορωτικής νόσου. Σύμφωνα με τους συγγραφείς το αποτέλεσμα υποδηλώνει την πιθανότητα μεγαλύτερης επίδραση του πολυμορφισμού του CTR στην απόκτηση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας [186].

Μελέτες που αφορούν την επίδραση αυτού του πολυμορφισμού του CTR στην οστική μάζα και πυκνότητα σε υγιή παιδιά και εφήβους δεν έχουν εκπονηθεί.

### **Πολυμορφισμοί του γονιδίου του Ινσουλινομιμητικού Αυξητικού Παράγοντα (IGF-1)**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο IGF-1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την αύξηση των μακρών οστών, γιατί διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων στις επιφύσεις [192,193]. Έχει αναβολική δράση στην οστική μάζα, τόσο στην αναπτυξιακή περίοδο όσο και στην ενήλικη ζωή [194-197], γιατί προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκυττάρων, την αύξηση της σύνθεσης του κολλαγόνου τύπου I, την δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και την παραγωγή οστεοκαλσίνης [198]. Είναι επίσης σημαντικός στην ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου μέσω της δράσης του στα νεφρικά κύτταρα (επαναρρόφηση φωσφορικών, παραγωγή καλσιτριόλης) και στα κύτταρα του γαστρεντερικού (απορρόφηση ασβεστίου) [199,200]. Τα οστεογόνα κύτταρα του περιοστέου όχι μόνο εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς για τον IGF-1, αλλά μαζί με αυτόν συνεργατικά αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου αλλά και μη κολλαγόνων πρωτεϊνών [201,202].

Το 1989 αναγνωρίστηκε μια δινουκλεοτιδική ακολουθία κυτοσίνης-αδενοσίνης (C/A) κοντά στον υποκινητή, 1 kb από το σημείο έναρξης της μεταγραφής [203]. Διάφορα αλληλόμορφα αναγνωρίστηκαν με βάση τον αριθμό των επαναλήψεων

της ακολουθίας (C/A η repeat). Ο γονότυπος που φέρει το αλληλίο 192 C/A repeat σε ομοζυγωτία συσχετίστηκε στους άρρενες με χαμηλές συγκεντρώσεις του IGF-1 στον ορό και ιδιοπαθή οστεοπόρωση [204]. Αυτός ο γονότυπος επίσης συσχετίστηκε με χαμηλά επίπεδα IGF-1 και ελαττωμένη οστική μάζα σε μια μελέτη που αφορούσε αγόρια και κορίτσια εφηβικής ηλικίας [205]. Πάντως, αυτά τα ευρήματα δεν επιβεβαιώθηκαν και από άλλες δημοσιεύσεις [206-209]. Το 2005 ο van Heemst και οι συνεργάτες του, σε εργασία που εκπόνησαν σε γυναίκες τρίτης ηλικίας, συσχέτισαν την ύπαρξη του πολυμορφισμού IGF-1 CA repeat (rs 2665802) σε ετεροζυγωτία, με κοντότερο ανάστημα και μακροβιότερο προσδόκιμο ζωής [210]. Παρότι ο ρόλος του άξονα GH - IGF-1 στην επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας είναι αποσαφηνισμένος, η σημασία των πολυμορφισμών IGF-1 CA repeat, στην οστική μάζα - ελαττωμένη οστική πυκνότητα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση [211].



### Λεπτίνη και οστικός μεταβολισμός

Η λεπτίνη υπεισέρχεται στο μεταβολισμό των οστών μέσω σύνθετης περιφερικής και κεντρικής ρύθμισης της οστικής αναδιαμόρφωσης. Θεωρείται ότι υπάρχει μια περιφερική τοπική, θετική δράση μέσω αυτοκρινικών ή παρακρινικών μηχανισμών, και μια κεντρική, αρνητική μέσω νευροενδοκρινικών "μονοπατιών". Είναι γνωστή η συσχέτιση του δείκτη μάζας σώματος (BMI) και της οστικής πυκνότητας (BMD) [212] και σε συνδυασμό με μελέτες σε υποσιτιζόμενους πληθυσμούς, όπου η οστική πυκνότητα ανευρίσκεται ελαττωμένη [67,213], και σε παχύσαρκους όπου είναι αυξημένη [214], υποδεικνύεται ότι η λεπτίνη ασκεί προστατευτική δράση στα οστά του ανθρώπινου σκελετού.

Παρόλα αυτά η συνολική επίδραση της λεπτίνης στο οστόν είναι ασαφής, ενώ ενδέχεται να εξαρτάται και από τη θέση στο σκελετό [215].

Η δράση της λεπτίνης έχει ως επί το πλείστον μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα επίμυων. Σε ποντίκια με ανεπάρκεια λεπτίνης (ob/ob) οι δείκτες οστικής διαμόρφωσης είναι αυξημένοι, όπως αυξημένη είναι η οστική μάζα παρά τον υπογοναδισμό και την υπερκορτιζολαιμία. Η λεπτίνη έχει ισχυρή ανασταλτική δράση στο οστόν μέσω απευθείας ρύθμισης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, όπως υποδεικνύεται από πειραματικά μοντέλα επίμυων, στους οποίους χορηγήθηκε λεπτίνη εντός των κοιλιών του εγκεφάλου και είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της οστικής μάζας τόσο στα μεταλλαγμένα (ob/ob), όσο και στα άγριου τύπου ποντίκια (wild type) [216]. Υποδοχείς της εκφράζονται στο χοριοειδές πλέγμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου, όπου πιθανώς διευκολύνουν τη μεταφορά της στο Κεντρικό Νευρικό [217,218].

Σε αντίθεση με την κεντρική της δράση οι *-in vivo* και *in vitro* -μελέτες στα πειραματικά μοντέλα, υποδεικνύουν ότι η περιφερική δράση της λεπτίνης είναι αναβολική για τα οστά, καθώς επάγει την διαφοροποίηση των πολυδύναμων στρωματικών κυττάρων προς οστεοβλάστες και αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση [219-221].

Σε έφηβα κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία τα ελαττωμένα κυκλοφορούντα επίπεδα λεπτίνης, συσχετίστηκαν με διαταραγμένη μικροαρχιτεκτονική στα σπογγώδη οστά, ακόμη και αν η οστική πυκνότητα ήταν φυσιολογική για την ηλικία [222].

### **Νευροπεπτίδιο Υ (NPY) και οστικός μεταβολισμός**

Στους επίμυες υπάρχουν τουλάχιστον 5 διαφορετικοί υποδοχείς μέσω των οποίων ασκείται η δράση του NPY και των δύο άλλων μελών της οικογένειας της πεπτιδής (PYY) και της παγκρεατικής πεπτιδής (PP). Από αυτούς οι  $Y_1$  και οι  $Y_2$  υποδοχείς εμπλέκονται στον οστικό μεταβολισμό μέσω ρύθμισης της οστεοβλαστικής δραστηριότητας [223].

Σε πειραματικά μοντέλα η εξάλειψη των  $Y_2$  υποθαλαμικών υποδοχέων, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου των σπογγωδών οστών λόγω της αυξημένης δραστηριότητας των οστεοβλαστών, που οδήγησε τόσο σε οστεοσύνθεση όσο και σε επιμετάλλωση [224]. Καθώς οι  $Y_2$  υποδοχείς δεν υπάρχουν στον οστίτη ιστό η εντολή διαβιβάζεται με κεντρική δράση ακολουθώντας όμως διαφορετικό «μονοπάτι» απ' αυτό της λεπτίνης [224]. Εξάλειψη των  $Y_1$  υποδοχέων, που υπάρχουν στους οστεοβλάστες οδηγεί επίσης σε αύξηση της μάζας του σπογγώδους οστού, αν και με διαφορετική οδό δράσης [225].

### **Πεπτίδιο ΥΥ (PYY) και οστικός μεταβολισμός**

Όπως προαναφέρθηκε το PYY ανήκει στην ίδια οικογένεια με το NPY και για τη δράση τους χρησιμοποιούν κοινούς υποδοχείς. Η σύνδεση του PYY με τους  $Y_2$  υποθαλαμικούς υποδοχείς, αναστέλλει την έκκριση του NPY [41]. Από πειραματικά μοντέλα πάλι στους επίμυες, προκύπτει ότι το πεπτίδιο ΥΥ συσχετίζεται αρνητικά με την οστεοβλαστική δραστηριότητα, καθώς αυξάνει την επιφάνεια των οστεοκλαστών μεταβάλλοντας την οστική απορρόφηση στα σπογγώδη οστά [226].

Στις ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία οι υψηλές τιμές κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων ΡΥΥ συσχετίζονται με μειωμένο ρυθμός οστικής αντικατάστασης και με ελαττωμένη οστική πυκνότητα, ιδίως στα οστά της σπονδυλικής στήλης [41,227].

### **Γκρελίνη και οστικός μεταβολισμός**

Γκρελίνη συντίθεται και από τα κύτταρα των οστών, όπως από τα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες [228]. Ακυλιωμένη ή μη, η γκρελίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αυξάνει τους δείκτες οστεοβλαστικής δραστηριότητας, όπως την οστεοκαλσίνη και τη αλκαλική φωσφατάση και καταστέλλει την απόπτωση των οστεοβλαστών μέσω της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3-κινάσης και της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνα (MAPK) [229]. Σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (GH), η χορήγηση γκρελίνης επαυξάνει την διατήρηση του ασβεστίου στο σκελετό, αυξάνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την οστική πυκνότητα [228]. Η κλινική σημασία αυτών των επιδράσεων δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί [230]. Στους ανθρώπους η επίδραση της γκρελίνης στην οστική πυκνότητα φαίνεται να' ναι σε συσχέτιση με τα στεροειδή του φύλου και την αυξητική [13].



## ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ

Οι αρχικές προσπάθειες εκτίμησης της οστικής πυκνότητας στηρίχτηκαν στις ακτινογραφίες. Όμως ο απλός ακτινολογικός έλεγχος έχει χαμηλή ποιοτική ευαισθησία και συνεπώς ελαττωμένη διαγνωστική αξία. Ελαττωμένη διαγνωστική αξία έχει και η χρήση των ακτινολογικών μορφομετρικών δεικτών όπως ο σπονδυλικός, μηριαίος, μετακάρπιος κλπ, γιατί εξαρτώνται από την υποκειμενικότητα του παρατηρητή. Η οπτική φωτοπυκνομετρία επίσης, εξαρτάται άμεσα απ' τις συνθήκες λήψης της απλής ακτινογραφίας.

Αυτές οι πλέον πεπαλαιωμένες μέθοδοι αντικαταστάθηκαν στην κλινική πράξη το 1970, από την Απλή γ-Φωτονιακή Δέσμη (Single Photon Absorptiometry –SPA) [231], όπου εξετάζονται μόνο περιφερικά οστά με τη χρήση ραδιενεργού Ιωδίου 125 που εκπέμπει μονοχρωματική δέσμη φωτονίων, και αργότερα στις αρχές της δεκαετίας του 1980 από την Διπλή γ-Φωτονιακή Δέσμη (Dual Photon Absorptiometry-DPA) [232], που χρησιμοποιεί Γαδολίνιο-153 και εκπέμπει δύο δέσμες φωτονίων, μία που απορροφάται από τα μαλακά μόρια και μία δεύτερη που απορροφάται από τα οστά. Με την DPA κατέστη δυνατή η μέτρηση της οστικής πυκνότητας στα οστά της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου.

Σήμερα η μέτρηση της οστικής πυκνότητας γίνεται με την εφαρμογή μηχανημάτων Διπλής Ενέργειας Χ-Φωτονιακής Δέσμης (Dual Energy X-Ray Absorptiometry - DXA), που ως πηγή χρησιμοποιούν λυχνία ακτίνων Χ, με την Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (Quantitative Computed Tomography-QCT), όπου με τη χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας μπορεί και μετράται η οστική πυκνότητα στο σπογγώδες οστό των σπονδύλων ή στο μηριαίο, αλλά με σημαντικό λαμβανόμενο ποσό ακτινοβολίας, και με την περιφερική Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (peripheral Quantitative Computed Tomography - pQCT) για μετρήσεις στο αντιβράχιο.

Στις μεθόδους μέτρησης της οστικής μάζας περιλαμβάνονται ακόμη αυτές που κάνουν χρήση των υπερήχων, όπως η ποσοτική υπερηχοτομογραφία (QUS), ή

μαγνητικού συντονισμού (NMR) και οι οποίες δεν κάνουν χρήση ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Από τις προαναφερθείσες μεθόδους η ευρύτερα διαδεδομένη είναι η Διπλή Φωτονιακή Απορρόφηση DXA ή DEXA.

### **Διπλή Φωτονιακή Απορρόφηση (DXA ή DEXA)**

Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος μέτρησης οστικής πυκνότητας παγκοσμίως, γιατί έχει μικρό λάθος επαναληψιμότητας, χαμηλή δόση ακτινοβολήσης του εξεταζομένου, μικρή χρονική διάρκεια εκτέλεσης της εξέτασης και δυνατότητα μέτρησης σε αρκετές θέσεις του σώματος [233].

Εφαρμόζεται για την παραγωγή προσθιοπίσθιας αλλά και πλάγιας προβολής στους τέσσερις πρώτους οσφυϊκούς σπονδύλους. Η προσθιοπίσθια προβολή έχει ορισμένους περιορισμούς όταν συνυπάρχει και άλλη παθολογία όπως τα οστεόφυτα, οι επασβεστώσεις και η σπονδυλική σκολίωση.

Στην κατ' ισχίον άρθρωση η εφαρμογή της γίνεται σε πολλές περιοχές όπως στον αυχένα του μηριαίου οστού, στον τροχαντήρα, στο τρίγωνο του Wald ή όλο το ισχίο και πάλι με ορισμένους περιορισμούς (διαφορετικά ποσοστά φλοιώδους και σπογγώδους οστού ανά περιοχή με αποτέλεσμα να υπάρχουν περιοχές στο ίδιο οστό με διαφορετική απώλεια οστικής μάζας).

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα μηχανήματα αυτά χρησιμοποιούν ως πηγή λυχνία παραγωγής ακτίνων X. Η δέσμη που παράγεται από την λυχνία περιέχει φωτόνια δύο διαφορετικών ενεργειών. Τα χαμηλής ενέργειας απορροφώνται από τα μαλακά μόρια, ενώ τα υψηλής από τα οστά. Τα αποτελέσματα της μέτρησης δίδονται ως ποσότητα των περιεχομένων στο οστό αλάτων (bone mineral content - BMC) σε γραμμάρια ή ως οστική πυκνότητα (bone mineral density - BMD), που είναι το πηλίκο της BMC προς την επιφάνεια του οστού που μετρήθηκε εκφρασμένο σε  $\text{gr}/\text{cm}^2$  [233].

Η BMD είναι η ποσότητα των περιεχόμενων αλάτων στη εξετασθείσα περιοχή ανά επιφάνεια σάρωσης. Στα σύγχρονα μηχανήματα η σάρωση ολοκληρώνεται πολύ γρήγορα. Η μέτρηση της σπονδυλικής στήλης διαρκεί 30-35 sec ενώ η ολόσωμη σε 5 min, γεγονός που ελαχιστοποιεί το χρόνο έκθεσης στην ακτινοβολία.

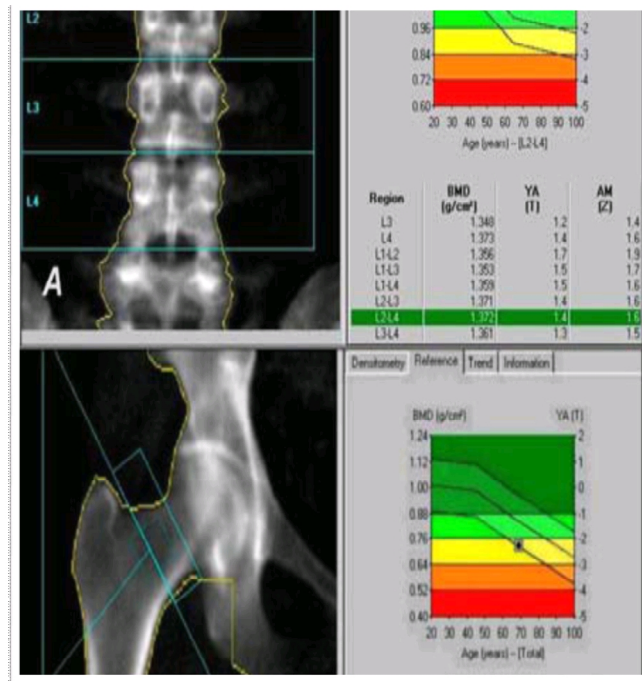
Η δόση ιοντίζουσας ακτινοβολίας που προσλαμβάνει ο εξεταζόμενος εξαρτάται κυρίως από την διάρκεια και τη γεωμετρία της σάρωσης (μονή δέσμη – pencil beam ή βεντάλια- fan) και εκφράζεται σε  $\mu\text{Sv}$  [234]. Γενικά η δόση που αντιστοιχεί σε μία μέτρηση οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (ΟΜΣΣ) ή ισχίου δεν υπερβαίνει το ήμισυ της δόσης που προσλαμβάνει ο γενικός πληθυσμός από την φυσική ακτινοβολία του περιβάλλοντος [234].

Ο βαθμός επαναληψιμότητας είναι το κατά πόσον με το ίδιο μηχάνημα λαμβάνεται η ίδια τιμή όταν επαναλαμβάνεται η ίδια μέτρηση και εκφράζεται ως αριθμός σταθερών αποκλίσεων (SD) [235]. Ως ακρίβεια ορίζεται ο βαθμός, στον οποίο μια μέτρηση προσεγγίζει την πραγματική τιμή. Η ακρίβεια στα μηχανήματα οστικής πυκνομετρίας εξαρτάται κυρίως από την ακρίβεια της βαθμονόμησης του καθενός. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις όπου χρειάζεται να ερμηνεύσουμε τις μεταβολές της οστικής μάζας ανάμεσα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, όταν οι μετρήσεις δεν επαναλαμβάνονται στο ίδιο μηχάνημα και στις ίδιες συνθήκες [236,237]. Στην DEXA η ακρίβεια μέτρησης είναι 5-10% και η επαναληψιμότητα 1-2% [238,239].

Θα πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι η ακρίβεια είναι ιδιαίτερα σημαντική, αν ανιχνεύουμε χαμηλή οστική πυκνότητα ή αν θέλουμε να καθορίσουμε την κορυφαία οστική μάζα, οπότε τότε θα πρέπει να επιλέξουμε ένα μηχάνημα με αρκετά χαμηλό (κάτω του 2%) σφάλμα ακρίβειας [240].

Ιδανικά για την αρχική εκτίμηση της οστικής πυκνότητας, απαιτούνται δύο μετρήσεις σε διαφορετικές περιοχές. Το 25% των ασθενών με χαμηλή οστική πυκνότητα δεν διαγιγνώσκεται αν πραγματοποιηθεί μέτρηση σε μία μόνο θέση [241]. Ο συνδυασμός δύο μετρήσεων, συνήθως στην προσθιοπίσθια προβολή της ΟΜΣΣ και στο ισχίο, διαγιγνώσκει σωστά τους περισσότερους ασθενείς [242].

Πολλές φορές η εκτέλεση μέτρησης σε δύο διαφορετικές θέσεις δεν είναι δυνατή, κυρίως για οικονομικούς λόγους.



**Εικόνα 5:** Α εξέταση DEXA στην ΟΜΣΣ

Β εξέταση DEXA στο ισχίο

## Ανάγνωση αποτελεσμάτων μέτρησης της οστικής πυκνότητας

Τα αποτελέσματα μέτρησης της οστικής πυκνότητας μπορούν να εκφραστούν ως ποσοστό της μέσης φυσιολογικής τιμής, ως T- score, ως Z- score, είτε τέλος, λιγότερο συχνά, σε σχέση με το κατώφλι κατάγματος (fracture threshold) για την ηλικία και το φύλο του εξεταζομένου.

Το ποσοστό της μέσης φυσιολογικής τιμής εξάγεται από τη σύγκριση της τιμής του εξεταζομένου, με τη μέση τιμή φυσιολογικών νεαρών ενηλίκων ή τη μέση τιμή φυσιολογικών συνομηλίκων ίδιου φύλου. Είναι ο πιο κατανοητός τρόπος έκφρασης από τον γενικό πληθυσμό.



Το T-score αναφέρεται, σε πόσες σταθερές αποκλίσεις (SD) απέχει η τιμή του εξεταζομένου, από την αντίστοιχη τιμή της κορυφαίας οστικής πυκνότητας νεαρών ενήλικων ατόμων του ίδιου φύλου.

Το Z-score περιγράφει πόσες σταθερές αποκλίσεις (SD) απέχει η τιμή του εξεταζομένου, από τις αντίστοιχες τιμές φυσιολογικών ατόμων ίδιου φύλου και ηλικίας.

Η σύγκριση με το κατώφλι κατάγματος, είναι μία αυθαίρετη τιμή που διαφέρει στον υπολογισμό της, ανάλογα με τον τύπο του μηχανήματος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της οστικής μάζας, και ορίζεται περίπου στις 2 σταθερές αποκλίσεις (SD), κάτω από τη μέση τιμή νεαρών ατόμων του ίδιου φύλου. Περίπου το 90% των οστεοπορωτικών καταγμάτων επισυμβαίνουν όταν οι τιμές της οστικής πυκνότητας είναι κάτω απ' αυτό το επίπεδο.

Για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες λευκής φυλής, φυσιολογική θεωρείται η οστική πυκνότητα όταν το T-score είναι +2,5 έως -1 σταθερές αποκλίσεις (SD), ενώ τιμές T-score μεταξύ -1 και -2,5 SD χαρακτηρίζονται ως οστεοπενία. Η οστεοπόρωση αναφέρεται σε τιμές οστικής πυκνότητας με T-score < -2,5 SD, εάν συνυπάρχει δε και ένα τουλάχιστον κάταγμα, η οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται ως εγκαταστημένη (Πίνακας 2) [243].

**Πίνακας 2:** Κατάταξη αποτελεσμάτων οστικής πυκνομετρίας

Διάγνωση	T-score
Φυσιολογική	0 έως -0.99
Οστεοπενία	-1 έως -2.99
Οστεοπόρωση	≤ -2.5
Σοβαρή ή εγκατεστημένη Οστεοπόρωση	≤ -2.5 και ένα τουλάχιστον οστεοπορωτικό κάταγμα

## Διπλή Φωτονιακή Απορροφησιομετρία (DEXA) σε παιδιά και εφήβους

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μέτρηση οστικής μάζας (BMC) είναι μια μέτρηση 2 διαστάσεων επιφανειακής προβολής και ορίζεται ως η μέση συγκέντρωση των περιεχομένων αλάτων ανά μονάδα εμβαδού εκφραζόμενη σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό ( $\text{gr}/\text{cm}^2$ ).

Οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας που λαμβάνονται με τη χρήση της μεθόδου DEXA, αντικατοπτρίζουν μια δισδιάστατη και όχι μια τρισδιάστατη προβολή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα γεωμετρικές αλλαγές ή αυξήσεις στο μέγεθος των οστών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, σε κάποιες περιπτώσεις να αποτυπώνονται ανακριβώς. Ακόμη, σε μικρόσωμα άτομα η δισδιάστατη DEXA μέτρηση μπορεί δώσει ψευδώς μικρότερη οστική πυκνότητα [244]. Επιπλέον, η πυκνότητα των οστών και η συσσώρευση αλάτων ασβεστίου ποικίλλουν ανάλογα με τη θέση μέτρησης, ενώ τέλος μικρές μεταβολές στη BMD μπορεί να οφείλονται στην τυχαία μεταβλητότητα κατά τη ρύθμιση. Συνεπώς μεταβολές μικρότερες από 5,6% θα πρέπει να ερμηνεύονται ως σφάλμα ακρίβειας [244].

Άλλες τεχνικές όπως η υπολογιστική τομογραφία, που μετρούν τον όγκο των οστών ( $\text{gr}/\text{cm}^3$ ) μπορούν να εκτιμήσουν ικανοποιητικότερα τις μεταβολές που συμβαίνουν στη μάζα των οστών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αλλά σ' αυτές τις ηλικίες έχουν περιορισμένη εφαρμογή λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης σε ακτινοβολία [244].

Παρότι για τα παιδιά και τους εφήβους ισχύουν οι ίδιες γενικές αρχές πυκνομετρίας που ισχύουν και για τους ενήλικες, η εκτέλεση της εξέτασης και η συγγραφή πορίσματος είναι περισσότερο σύνθετη.

Μέχρι σχετικά πρόσφατα δεν υπήρχαν διεθνώς αναγνωρισμένες κατευθυντήριες οδηγίες (guidelines) για την οστική πυκνομετρία σε παιδιατρικά περιστατικά.

Το 2007 η Διεθνής Εταιρεία Κλινικής Πυκνομετρίας (ISCD) εξέδωσε επίσημες οδηγίες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πυκνομετρίας σε παιδιά και εφήβους, καθορίζοντας τις καταλληλότερες θέσεις μέτρησης στον αναπτυσσόμενο σκελετό, ποιες προσαρμογές προαπαιτούνται γι' αυτές τις

μετρήσεις, τις κατάλληλες παιδιατρικές βάσεις αναφοράς σε φυσιολογικό αντίστοιχο πληθυσμό με τις οποίες θα γίνουν οι απαραίτητες συγκρίσεις και τα στοιχεία που θα πρέπει να συμπεριληφθούν κατά τη συγγραφή της αναφοράς των αποτελεσμάτων της DEXA απορροφησιομετρίας [245].

Σύμφωνα με αυτές:

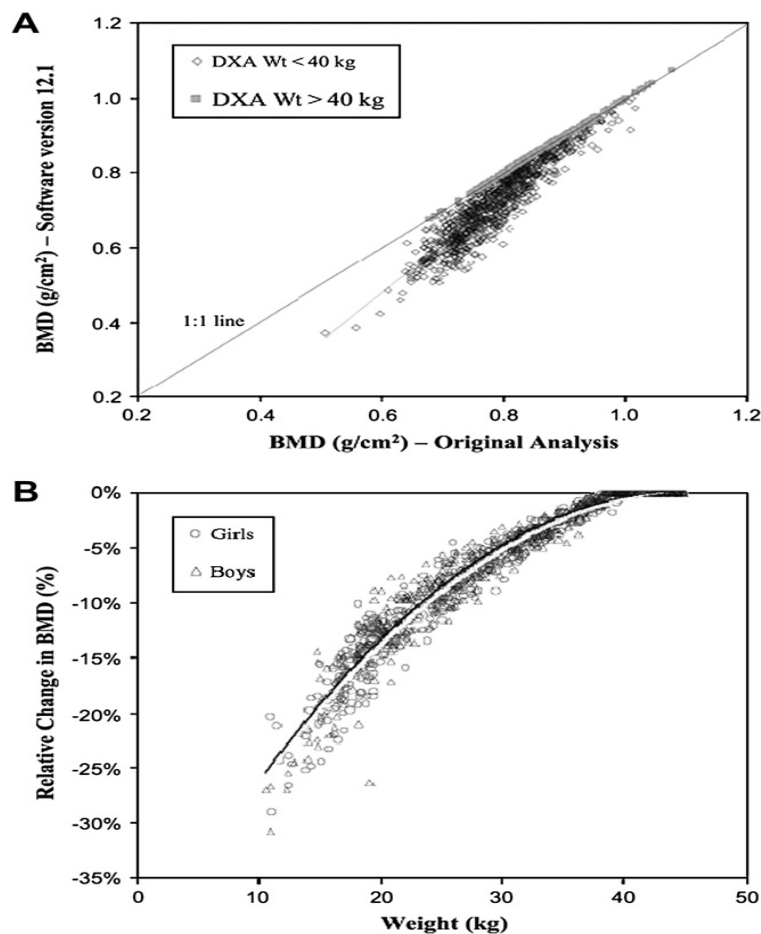
- Η προτιμητέα μέθοδος για τον υπολογισμό της BMC και της περιοχικής BMD είναι η DEXA.
- Οι πιο ακριβείς και αναπαραγώγιμες σκελετικές θέσεις είναι η προσθιοπίσθια προβολή της σπονδυλικής στήλης και η ολόσωμη με εξαίρεση το κρανίο (TBLH)
- Μετρήσεις που αφορούν τους μαλακούς ιστούς σε συνδυασμό με ολόσωμη σάρωση, ενδέχεται να συνεισφέρουν επιπλέον στην εκτίμηση χρονίων παθολογικών καταστάσεων που συσχετίζονται με υποθρεψία όπως είναι η Ψυχογενής Ανορεξία, οι φλεγμονώδεις εντερικοί νόσοι, η κυστική ίνωση αλλά και σε διαταραχές του Εριστικού Συστήματος, όπως στην ιδιοπαθή νεανική οστεοπόρωση
- Το ισχίο δεν θεωρείται κατάλληλη θέση για τον αναπτυσσόμενο πληθυσμό λόγω σημαντικών παραλλαγών που εμφανίζει κατά την σκελετική αύξηση και ανάπτυξη και χαμηλής αναπαραγωγιμότητας (επαναληψιμότητας)
- Σε παιδιά που βρίσκονται σε περίοδο γραμμικής (καθ' ύψος) ανάπτυξης ή εμφανίζουν καθυστέρηση σκελετικής ωρίμανσης, τα αποτελέσματα τόσο της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης όσο και της ολόσωμης, εκτός κρανίου (TBLH), οστικής μάζας (BMC) πρέπει να προσαρμόζονται σε σχέση με την απόλυτη τιμή του ύψους ή του ύψους αναφορικά με την ηλικία ή να συγκρίνονται με παιδιατρικά δεδομένα από υγιή πληθυσμό που παρέχουν στοιχεία που αφορούν την ηλικία το φύλο και Z- scores αναφορικά με το ύψος
- Σε παθήσεις που αφορούν την καθυστέρηση της ανάπτυξης ή της σκελετικής ωρίμανσης, η χρήση της οστικής ηλικίας ή της ηλικίας - ύψους αντί της χρονολογικής ηλικίας, είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις έλλειψης δεδομένων αναφοράς που συμπεριλαμβάνουν το ύψος ή τη σκελετική ωριμότητα. Πληροφορίες που αφορούν τη σταδιοποίηση των χαρακτηριστικών του φύλου (pubertal stage) είναι χρησιμότερες για την ερμηνεία παρά για την τυποποίηση των μετρήσεων

- Η κατάλληλη βάση δεδομένων αναφοράς, περιλαμβάνει ένα αρκετά μεγάλο δείγμα του υγιούς γενικού πληθυσμού, που χαρακτηρίζεται από τη φυσιολογική διακύμανση οστικών μετρήσεων σε συνάρτηση με το φύλο, την ηλικία και την εθνικότητα/φυλή
- Στην αναβάθμιση των μηχανημάτων και του λογισμικού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων έγκυρες για τις συγκεκριμένες αναβαθμίσεις.

Υπάρχουν αρκετές βάσεις δεδομένων παιδιών και εφήβων από διαφορετικές περιοχές και ποικίλων εθνικοτήτων σε συνδυασμό με τους 3 κύριους κατασκευαστές μηχανημάτων DEXA (Πίνακας 3), ώστε να μπορεί ο κλινικός να επιλέξει τη βέλτιστη για τον πληθυσμό των ασθενών του σε συσχέτιση με τον DEXA σαρωτή [68,246-273].

- Στη βασική μέτρηση DEXA θα πρέπει να αναφέρονται πληροφορίες σχετικές με:
  1. την προέλευση του μηχανήματος, το μοντέλο και την έκδοση του λογισμικού που χρησιμοποιεί,
  2. τον ιατρό
  3. στοιχεία του ασθενούς αναφορικά με την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα/φυλή, το ύψος και το βάρος
  4. τις ενδείξεις για την εκτέλεση της μέτρησης
  5. την οστική ηλικία, εφόσον είναι διαθέσιμη
  6. στοιχεία που πιστοποιούν την τεχνολογική ποιότητα
  7. την BMC και την περιοχική BMD
  8. τα Z- scores της BMC και της περιοχικής BMD
  9. την προέλευση της βάσης δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των Z-scores
  10. τις προσαρμογές που έγιναν αναφορικά με το στάδιο ανάπτυξης και τη σκελετική ωρίμανση
  11. την εκτίμηση
  12. προαιρετικά τις συστάσεις για την αναγκαιότητα και το χρόνο διεξαγωγής επόμενης DEXA μέτρησης

- Σε ότι αφορά επαναλαμβανόμενες εκτιμήσεις:
  1. η ακριβής εκτίμηση των αποτελεσμάτων σειριακών DEXA μετρήσεων απαιτεί γνώση των ελαχίστων σημαντικών αλλαγών (least significant change-LSC) για όλες τις θέσεις μέτρησης
  2. πρέπει να γίνεται μόνο εφόσον η εκτιμώμενη μεταβολή είναι ίση ή μεγαλύτερη της ελάχιστης σημαντικής
  3. η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τις ίδιες πληροφορίες με την βασική, αλλά επιπλέον την ένδειξη για την τέλεση της επανεκτίμησης, τη συμβατότητα, τις αλλαγές στο ύψος και στο βάρος που έλαβαν χώρα στο ενδιάμεσο διάστημα, τα Z-scores της BMC και της περιοχικής BMD προσαρμοσμένα και μη για το ύψος κλπ, την αλλαγή στη BMC και την BMD εκφρασμένες σε εκατοστιαία αναλογία και τις ενδιάμεσες μεταβολές στα Z-scores και τέλος προαιρετικά την αναγκαιότητα και τον εκτιμώμενο χρόνο επανεξέτασης.



**Εικόνα 6 :** Απεικονίζονται διαφορές στην οστική πυκνότητα σε παιδιατρικούς ασθενείς ανάλογα με το βάρος σώματος και την έκδοση του λογισμικού του

σαρωτή. Στην A, απεικονίζονται οι BMD εξετασθέντων με βάρος σώματος μεγαλύτερο των 40 kg όπου δεν υπάρχει σημαντική διαφορά, αν και σε ασθενείς με βάρος σώματος μικρότερο των 40 kg η BMD ήταν χαμηλότερη στην νεώτερη έκδοση. Στο B η εκατοστιαία μείωση της BMD όταν εκτιμήθηκε με την νεώτερη έκδοση λογισμικού ήταν προοδευτικά μεγαλύτερη σε παιδιά με μικρό βάρος σώματος [274].

### **Ορολογία για την εκτίμηση των DEXA αποτελεσμάτων σε παιδιά και εφήβους σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ISCD το 2007**

- Εκτιμήσεις που αφορούν το T-score δεν θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στις εκθέσεις των παιδιατρικών DEXA μετρήσεων
- Επίσης σε αυτές τις εκθέσεις δεν θα πρέπει να αναγράφεται ο όρος οστεοπενία
- Σ' αυτές τις εκθέσεις, ο όρος οστεοπόρωση δεν θα πρέπει να αναγράφεται εκτός και συνυπάρχει κλινικά βεβαιωμένο σημαντικό ιστορικό καταγμάτων
- «Χαμηλή οστική μάζα ή χαμηλή οστική πυκνότητα για την χρονολογική ηλικία» είναι οι προτιμώμενοι όροι όταν το Z-score της BMC ή της περιοχικής BMD είναι μικρότερο ή ίσο με την τιμή -2

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το Z-score υπολογίζεται βάση του μαθηματικού τύπου:

$$\text{Z-score: } \frac{(\text{Παρατηρηθειςα Τιμη} - \text{Μεση Τιμη})}{\text{Σταθερη Αποκλιση (SD)}}$$

Όπου SD ο αριθμός των τυπικών αποκλίσεων (SD) κατά τον οποίο η μετρούμενη τιμή αποκλίνει, από τη μέση τιμή των ατόμων της ίδιας ηλικίας και φύλου[275].

## **Τυποποίηση των μετρήσεων της οστικής πυκνότητας (Standardized Bone Mineral Density- sBMD), Εξισώσεις και Υπολογισμοί**

Αν και τόσο η ISCD όσο και η NOS (National Osteoporosis Society) [276] του Ηνωμένου Βασιλείου, συστήνουν οι επαναληπτικές εξετάσεις που αφορούν τη μέτρηση της BMD, να γίνονται σε σαρωτή της ίδιας κατασκευαστικής εταιρείας, με τον ίδιο τρόπο σάρωσης και να χρησιμοποιείται το ίδιο λογισμικό με των προηγούμενων μετρήσεων, εν τούτοις σε αρκετές περιπτώσεις δεν είναι πάντα εφικτό, ιδιαίτερα στα χρόνια περιστατικά.

Οι σαρωτές DEXA προέρχονται από 3 κατασκευάστριες εταιρείες και παρότι βασίζονται στις ίδιες αρχές, εν τούτοις τα μηχανήματα διαφέρουν ως προς τον τύπο σάρωσης, στη βαθμονόμηση και στους αλγόριθμους που χρησιμοποιούν για την ανάλυση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εντοπίζονται διαφορές που αφορούν τον καθορισμό της περιοχής στο υπό εξέταση οστό ( $\text{gr}/\text{cm}^2$ ), στην οστική περιεκτικότητα (BMC, gr), και εν τέλει ουσιαστικά στην οστική πυκνότητα (BMD,  $\text{gr}/\text{cm}^2$ ).

Ήδη από τη δεκαετία του 1990, οι ερευνητές αναγνωρίζοντας ότι ανακύπτει μεθοδολογικό πρόβλημα, τόσο στην κλινική πράξη, όσο και στην έρευνα προσπάθησαν να αναπτύξουν εξισώσεις τυποποίησης ώστε τα αποτελέσματα που αφορούν τον ίδιο εξεταζόμενο να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με αξιοπιστία για σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται αν χρησιμοποιηθεί άλλο σύστημα DEXA πυκνομετρίας [277].

Αργότερα η ICSBM (International Committee for Standards in Bone Measurements), δημοσίευσε διεθνής εξισώσεις τυποποίησης των BMD μετρήσεων, ώστε τα αποτελέσματα που αφορούν τη οστική πυκνότητα του ισχίου και της σπονδυλικής στήλης και προέρχονται από διαφορετικά συστήματα, να μετατρέπονται σε τυποποιημένη BMD (sBMD).

Για να υπερκεραστεί το υπολειπόμενο σφάλμα που υπάρχει στις δημοσιευμένες εξισώσεις τυποποίησης της ICSBM, οι Hui και συνεργάτες δημοσίευσαν τις βελτιωμένες (optimized) εξισώσεις αρχικά, για την σπονδυλική sBMD, το 1997, και εν συνεχεία για το ισχίο το 2001 [279,280]. Είναι αυτές που

χρησιμοποιούνται συχνότερα σε πολυκεντρικές, κλινικές αλλά και σε επιδημιολογικές μελέτες (Πίνακας 3) [281].

Με την εξέλιξη στην τεχνολογία των DEXA συστημάτων, τόσο στον τρόπο σάρωσης (η pencil beam δέσμη ακτίνων Χ αντικαταστάθηκε από την δέσμη τύπου βεντάλιας και μια πολλαπλή διάταξη ανιχνευτή στοιχείου) όσο και στο λογισμικό που χρησιμοποιούν (με αυτόματη μετατροπή της περιοχής εξέτασης) και παρότι οι κατασκευάστριες εταιρείες προσπάθησαν να κρατήσουν τη βαθμονόμηση στα νεώτερα μοντέλα τους, σε συμφωνία με τα προγενέστερα, εκ νέου ανέκυψε το θέμα της τυποποίησης και κατά πόσο οι εξισώσεις από τους παλαιότερους μονής δέσμης σαρωτές, εξακολουθούν να είναι κατάλληλες και για τα νεώτερα συστήματα.

Μια πρόσφατη δημοσίευση αναφέρει ότι ναι μεν οι αξιοσημείωτες διαφορές στην τιμή της BMD ελαττώθηκαν στα σύγχρονα συστήματα μέτρησης, αλλά οι εναπομείνουσες (υπολειπόμενες) διαφορές παραμένουν, ειδικά όταν οι περιοχές εξέτασης (regions of interest) αφορούν τη σπονδυλική στήλη [281].

Οι εξισώσεις τυποποίησης προέκυψαν από ενήλικους πληθυσμούς. Δεν υπάρχουν αντίστοιχες εξισώσεις που να αναφέρονται σε παιδιά ή εφήβους.

**Πίνακας 3.** Εξισώσεις Τυποποίησης για τις Σπονδυλικές μετρήσεις BMD (Τροποποιημένος από Hui SL et al ,1997)

$sBMDH(O) = 1.0550 (X - 0.972) + 1.0436$	για	Hologic
$sBMDL(O) = 0.9683 (Y - 1.100) + 1.0436$	για	Lunar
$sBMDN(O) = 0.9743 (Z - 0.969) + 1.0436$	για	Norland



## ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ (BMI) ΚΑΙ BMI Z-SCORE

Ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index-BMI), αποτελεί μια αξιόπιστη ένδειξη για το ποσό του σωματικού λίπους και χρησιμοποιείται στην καθ' ημέρα κλινική πράξη ευρέως σε ενήλικες για την ανίχνευση κατηγοριών σωματικού βάρους, που μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρά προβλήματα υγείας, αλλά και σε επιδημιολογικές μελέτες.

Είναι ένας αριθμός που υπολογίζεται από το λόγο του σωματικού βάρους σε χιλιόγραμμα, προς το τετράγωνο του ύψους σε εκατοστά :

$$\text{BMI} = \text{ΒΑΡΟΣ} / \text{ΥΨΟΣ} \text{ Kgr/cm}^2$$

Ο BMI είναι ένα φθινό εργαλείο προληπτικού πληθυσμιακού ελέγχου, αλλά όχι κατ' ανάγκη διαγνωστικό. Η χρήση του επιτρέπει τη σύγκριση του βάρους του εξεταζομένου με το γενικό πληθυσμό, και καθώς συσχετίζεται άμεσα με τις μετρήσεις του σωματικού λίπους, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας εναλλακτικός τρόπος μέτρησης αυτού.

Για τους ενήλικες, ο BMI ερμηνεύεται με βάσεις τυποποιημένες κατηγορίες σωματικού βάρους ίδιες τόσο για άνδρες όσο και για γυναίκες (Πίνακας 4) [282].

Πίνακας 4. Συσχέτιση BMI με το σωματικό πρότυπο

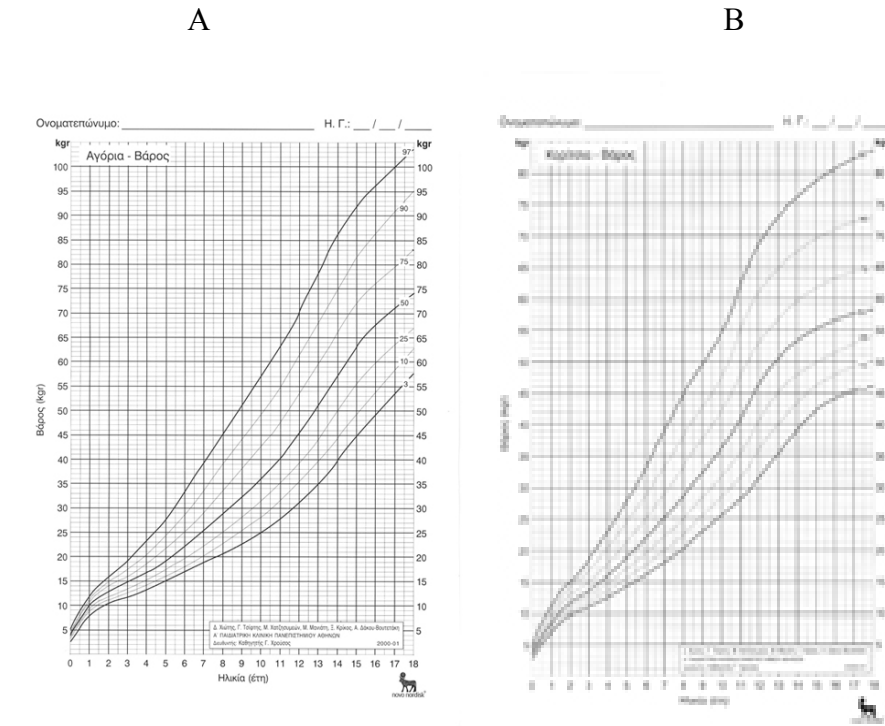
BMI	ΚΑΘΕΣΤΩΣ
Μικρότερο από 18.5	Ελλιποβαρής
18.5 έως 24.9	Φυσιολογικός
25.0 έως 29.9	Υπέρβαρος
Μεγαλύτερο του 30.0	Παχύσαρκος

Η συσχέτιση μεταξύ του BMI και της παχυσαρκίας είναι αρκετά ισχυρή. Παρόλα αυτά μπορεί να μεταβάλλεται ως προς το φύλο, την εθνικότητα και την ηλικία. Επί παραδείγματι με το ίδιο BMI, οι γυναίκες τείνουν να έχουν περισσότερο σωματικό λίπος σε σύγκριση με τους άνδρες ή οι ηλικιωμένοι, γενικά, τείνουν να έχουν περισσότερο σωματικό λίπος συγκριτικά με νεαρούς ενήλικες.

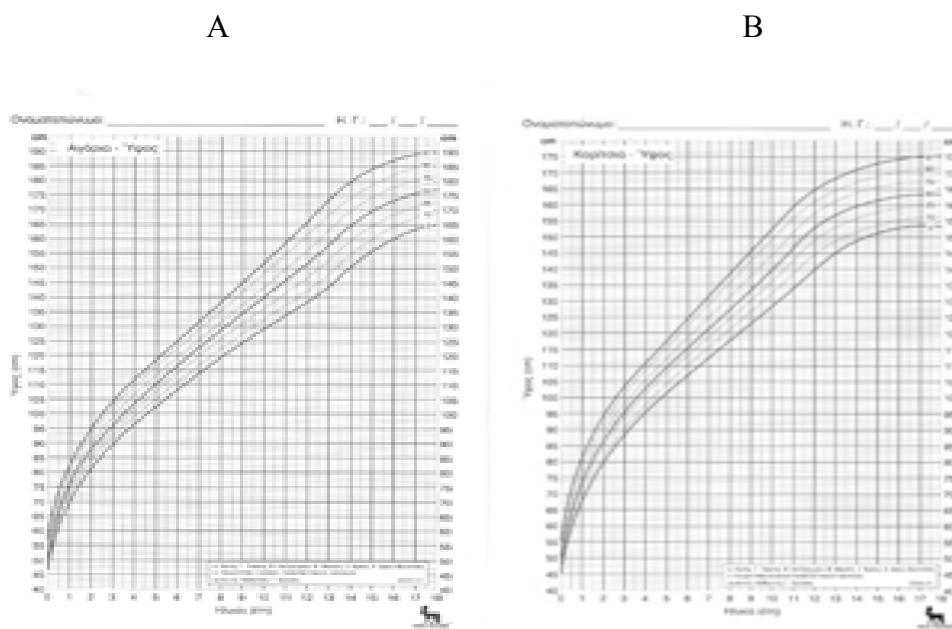
Στα παιδιά και τους εφήβους η συσχέτιση του BMI με το σωματικό λίπος είναι πιο περίπλοκη και η ερμηνεία της τιμής του, θα πρέπει να γίνει αναφορικά με την ηλικία και το φύλο.

Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι διαφορετικός στην βρεφική, παιδική και εφηβική ηλικία. Το ύψος και το βάρος μεταβάλλονται στην αναπτυξιακή περίοδο και για την σωστή αξιολόγησή του χρησιμοποιούνται οι ειδικές καμπύλες ανάπτυξης - γραφική αναπαράσταση του βάρους και του ύψους σε συνάρτηση με την ηλικία- που αφορούν τις εκατοστιαίες αναλογίες του συγκεκριμένου ύψους ή βάρους για ορισμένη ηλικία. Κάθε χώρα έχει τις δικές της καμπύλες ανάπτυξης, διαφορετικές για αγόρια και κορίτσια, που αντικατοπτρίζουν το ρυθμό ανάπτυξης του πληθυσμού, και ο οποίος εξαρτάται από γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κλίμα, τις συνθήκες διαβίωσης και διατροφής και την υγιεινή. Ιδιαίτερη σημασία στον καθορισμό του BMI σε παιδιά και εφήβους έχει επίσης η εθνικότητα/φυλή [283-288].

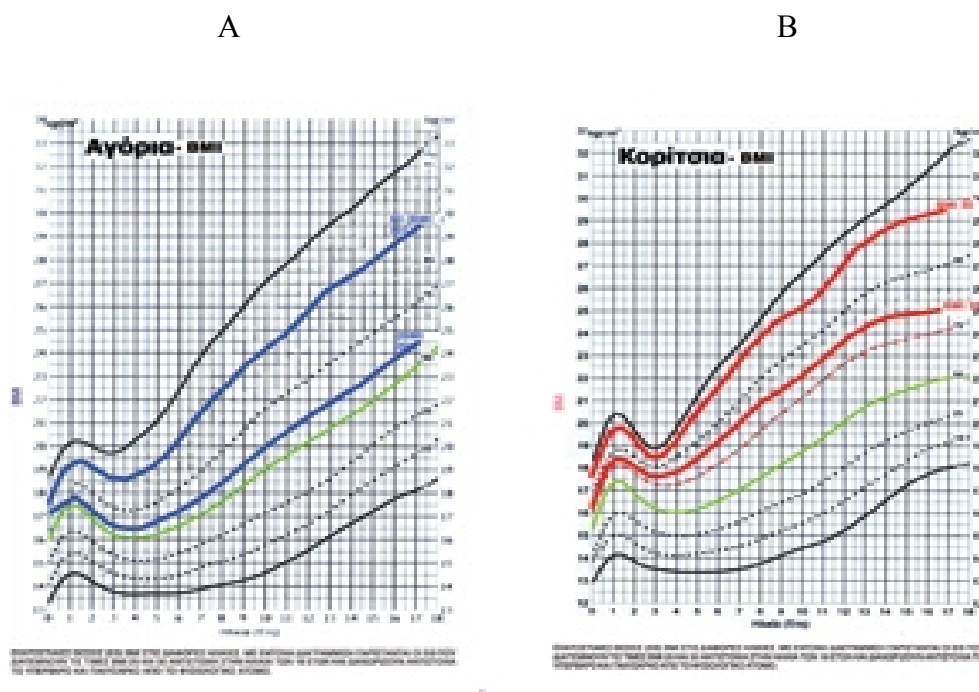
**Εικόνα 7.** Αναπτυξιακές καμπύλες Βάρους Σώματος σε συνάρτηση με την ηλικία για αγόρια (A) και κορίτσια (B) στον ελληνικό πληθυσμό



**Εικόνα 8.** Αναπτυξιακές καμπύλες ύψους σε αγόρια (A) και κορίτσια (B) σε συνάρτηση με την ηλικία στον ελληνικό πληθυσμό



**Εικόνα 9.** Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI) σε συνάρτηση με την ηλικία σε αγόρια (A) και κορίτσια (B) στον ελληνικό πληθυσμό



Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, η κατηγοριοποίηση γίνεται με βάση την τιμή του BMI ως προς την εκατοστιαία θέση για την ηλικία (Πίνακας 5.)

**Πίνακας 5.** Ερμηνεία αποτελεσμάτων του BMI σε συνάρτηση με τη εκατοστιαία θέση για την ηλικία

Σωματικό Καθεστώς	BMI
Ελλιποβαρή	BMI < 5 <sup>η</sup> εκ. θέση για την ηλικία
Φυσιολογικά	5 <sup>η</sup> > BMI < 85 <sup>η</sup> εκ θέση για την ηλικία
Υπέρβαρα	BMI 85 <sup>η</sup> έως < 95 <sup>η</sup> εκ θέση για την ηλικία
Παχύσαρκα	BMI > 95 <sup>η</sup> εκ θέση για την ηλικία

Στο διαδίκτυο υπάρχουν αρκετοί αυτόματοι υπολογιστές του BMI σε σχέση με την ηλικία και οι οποίοι λαμβάνουν υπόψην τους το φύλο και την εθνικότητα [289,290].

Συνήθως αυτοί αυτόματοι υπολογιστές χρησιμοποιούν τους πίνακες ανάπτυξης του CDC (Centers of Disease Control and Prevention) που αναφέρονται στον παιδικό και εφηβικό πληθυσμό των ΗΠΑ (Εικόνα 10).

1. Birth Date: m/d/y

2. Date of Measurement: m/d/y

3. Sex:

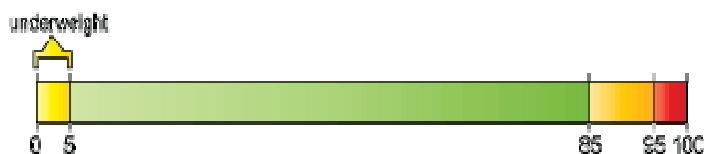
boy girl

4. Height, to nearest .1 cm:

cm

5. Weight, to nearest .1 kg:

kg



**Εικόνα 10:** Παράδειγμα αυτόματου υπολογιστή BMI με τα συνοδά αποτελέσματα

Ένας άλλος τρόπος, εκτίμησης του σωματικού καθεστώτος, είναι να γίνει σύγκριση του βάρους του εξεταζόμενου παιδιού ή εφήβου, με το μέσο όρο συγκρίσιμων για την ηλικία, το φύλο και την εθνικότητα ατόμων, από βάσεις δεδομένων πληθυσμών αναφοράς.

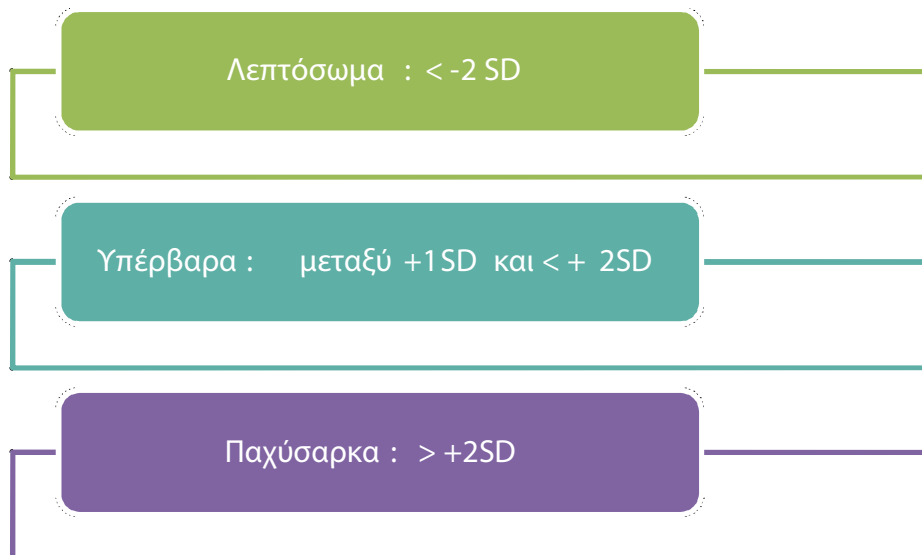
Το BMI Z-score υποδεικνύει πόσες μονάδες (Σταθερής Απόκλισης -SD) βρίσκεται το βάρος ενός παιδιού ή εφήβου πάνω ή κάτω από τη μέση τιμή BMI φυσιολογικών παιδιών ίδιου φύλου και ηλικίας.

Μπορούμε να υπολογίσουμε το BMI Z-score χρησιμοποιώντας τον κάτωθι μαθηματικό τύπο:

$$\text{BMI Z-score} = \frac{\text{Παρατηρηθείσα Τιμή} - \text{Μέση Τιμή Πληθυσμού αναφοράς}}{\text{Σταθερή Απόκλιση (SD) του πληθυσμού αναφοράς}}$$

Η μέση τιμή και η Σταθερή Απόκλιση μπορεί να εξαχθούν από υπάρχοντες ανθρωπομετρικούς πίνακες. Οι πλέον έγκυροι και παγκόσμια διαδεδομένοι ανθρωπομετρικοί πίνακες, παρέχονται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) και από τη Διεθνή Ομάδα Εργασίας κατά της Παχυσαρκίας (International Obesity Task Force -IOTF) και περιέχουν δεδομένα που αφορούν ηλικίες παιδιών 2 έως 20 ετών και των δύο φύλων.

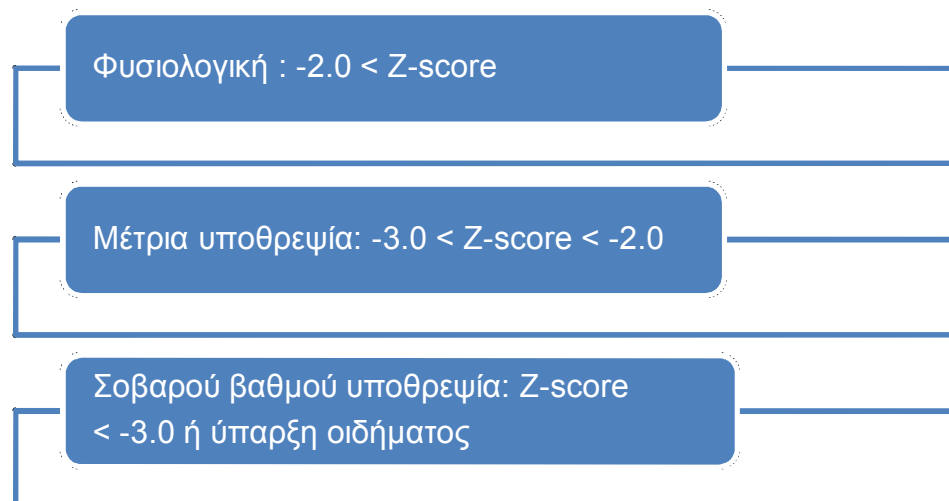
Η WHO προτείνει μια κατάταξη ορίων βασισμένη στο διάστημα μίας μόνο Σταθερής Απόκλισης (SD) [291]:



Το BMI Z-score αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τις ακραίες θέσεις βάρους (μεγαλύτερη από την 99<sup>η</sup> εκ θέση ή μικρότερη από την 1<sup>η</sup>), αλλά και για την

παρακολούθηση των μεταβολών του BMI αυτών των παιδιών ή των εφήβων [292].

Σε καταστάσεις υποθρεψίας οι τιμές του Z-score ταξινομούνται ως εξής [293]:



Εάν υπάρχει εντύπωμα οιδήματος, το BMI Z-score δεν μπορεί να καθορίσει αξιόπιστα το διατροφικό καθεστώς και συνεπώς το παιδί ή ο έφηβος αυτόματα κατατάσσεται στην κατηγορία της σοβαρής υποθρεψίας, ανεξαρτήτως του BMI Z-score [293].

Στο διαδίκτυο υπάρχουν αρκετοί αυτόματοι υπολογιστές του BMI Z-score [294-297] οι οποίοι χρησιμοποιούν τις πληθυσμιακές βάσεις δεδομένων του Αμερικανικού Εθνικού Κέντρου Στατιστικής της Υγείας (National Center for Health Statistics - NCHS), των Κέντρων ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Diseases Control and Prevention- CDC) και της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO).





## ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η πρόληψη της οστεοπόρωσης ξεκινά με την έναρξη της εμμηναρχής. Για την επίτευξη της βέλτιστης οστικής μάζας είναι απαραίτητος ο συνδυασμός καλής διατροφής, υγιεινής διαβίωσης και άσκησης.

Από την άλλη πλευρά είναι πλέον καλά τεκμηριωμένη η σχέση του Δείκτη Μάζας Σώματος και της οστικής πυκνότητας. Μετεμμηνοπαυσιακές παχύσαρκες γυναίκες, έχουν κατά τεκμήριο υψηλότερο BMD Z-score σε σύγκριση με συνομήλικές τους της ίδιας εθνικότητας, αλλά και το αντίστροφο, λεπτόσωμες έχουν συγκριτικά χαμηλότερο. Επιπλέον δε, εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς οστικής απορρόφησης [298].

Ένα σημαντικό ποσοστό πασχόντων από Ψυχογενή Ανορεξία εμφανίζει οστεοπενία ή οστεοπόρωση, εξαρτώμενη από τη διάρκεια της αμηνόρροιας [16]. Όμως ακόμη και αν δεν κατατάσσονται επισήμως στις παραπάνω κατηγορίες, οι γυναίκες που πάσχουν από ΨΑ έχουν ελαττωμένη οστική πυκνότητα σε όλες τις σκελετικές θέσεις, σε σύγκριση με συνομήλικές τους υγιείς γυναίκες [299]. Επίσης γυναίκες που νόσησαν κατά την εφηβική ηλικία και εν συνεχεία αποθεραπεύτηκαν, πιθανά εξακολουθούν να έχουν μικρότερη οστική πυκνότητα σε σχέση με γυναίκες ίδιας ηλικίας που ποτέ δεν νόσησαν, πολλά χρόνια μετά και στην σπονδυλική στήλη, αλλά κυρίως στον περιφερικό σκελετό [300 301].

Τα έφηβα κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία, έχουν ελαττωμένο ρυθμό αύξησης οστικής μάζας, με αποτέλεσμα να υπολείπονται σε σχέση με τις υγιείς συνομήλικές τους όπως αποδεικνύεται από το BMD Z-score και συν τω χρόνω ακόμη και αν αποκαταστήσουν το σωματικό τους βάρος, η διαφορά στο Z-score να εμφανίζει περαιτέρω αύξηση [302].

Στις έφηβες ασθενείς αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες της σκελετικής υγείας, αποτελούν η καθυστέρηση της ενήβωσης και η χρονική διάρκεια της νόσου [303].

Φυσιολογικά η εφηβεία είναι η περίοδος όπου λόγω της σκελετικής αύξησης και ανάπτυξης, ο ρυθμός οστικής ανακατασκευής είναι αυξημένος με υπεροχή της σύνθεσης σε βάρος της απορρόφησης [58]. Στις έφηβες με Ψυχογενή Ανορεξία

και οι δύο δείκτες οστικής ανακατασκευής (σύνθεσης και απορρόφησης) είναι μειωμένοι [302,304].

Η αποτυχία επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας (peak bone mass) στα χρόνια της εφηβείας, προδιαθέτει σε αυξημένο ισόβιο κίνδυνο για κατάγματα. Πράγματι οι ανορεξικές έφηβες έχουν 2-3 φορές μεγαλύτερο εφόρου ζωής κίνδυνο καταγμάτων, συγκρινόμενες με φυσιολογικές συνομήλικές τους [15,16] ενώ ο κίνδυνος αυξάνει προϊούσης της ηλικίας [305].

Ο παραμένων αυξημένος κίνδυνος κατάγματος αρκετά χρόνια μετά τη διάγνωση της ΨΑ υποδεικνύει εμμένουσα σκελετική βλάβη [305], ενδεχομένως οφειλόμενη στην αποτυχία επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Η διάγνωση της νόσου σε πρώιμο στάδιο, ειδικά αν αφορά ασθενή εφηβικής ή προεφηβικής ηλικίας, έχει μεγάλη σημασία προκειμένου εάν δεν είναι δυνατό να προληφθούν, τουλάχιστον να ελαχιστοποιηθούν οι απώτερες συνέπειες στα οστά.

### **Επανασίτιση - Επανάκτηση βάρους**

Ο πρωταρχικός στόχος της θεραπείας στην ΨΑ είναι η επανάκτηση βάρους και συνεπώς η αύξηση του λιπώδους ιστού μέσω, επανασίτισης. Είναι κοινή πρακτική να τίθεται ένα βάρος στόχος στην αρχή της θεραπείας, ει δυνατό εκμαιεύοντας και τη σύμφωνη γνώμη των πασχόντων. Παρότι δεν υπάρχει ομοφωνία για το ποιο είναι αυτό εξατομικευμένα, συνήθως τίθεται το κατώτερο όριο του ελάχιστου υγιούς Δείκτη Μάζας Σώματος με βάση το μέσο όρο του πληθυσμού (BMI: 19-20 kgr/cm<sup>2</sup>) [306].

Τα παιδιά και οι έφηβοι διαφέρουν από τους ενήλικες και γι αυτό προκαλούν μεγαλύτερη ανησυχία στους επαγγελματίες υγείας. Αφυδατώνονται γρηγορότερα από τους ενήλικες, οι ενεργειακές τους αποθήκες είναι μικρές και η απίσχναση μπορεί να επέλθει γρηγορότερα.

Μια αλλαγή στο ΔΜΣ, σ' αυτές τις ηλικιακές ομάδες όπως έχει προαναφερθεί δεν αποτελεί αξιόπιστη πηγή για τη μεταβολή στις αποθήκες λίπους ή πρωτεϊνών.

Εάν η ΨΑ εμφανιστεί σε ηλικία προτού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη, τότε θα ελαττωθεί ο ρυθμός αύξησης, το ύψος μπορεί να παραμείνει σταθερό και συνεπώς η μεταβολή του βάρους αν εκτιμηθεί μόνο με το BMI μπορεί να υποεκτιμηθεί.

Επίσης η ΨΑ στους εφήβους δεν είναι απαραίτητο να εκδηλώνεται με απώλεια βάρους. Πολλές φορές είναι αρκετό, αυτό να παραμένει σταθερό σε ένα ορισμένο στάδιο ανάπτυξης αντί να αυξάνεται. Η αξιολόγηση είναι προτιμότερο να γίνεται σε συσχέτιση με τη ηλικιακές καμπύλες, αναφορικά με το φύλο ή με το BMI Z-score [306]. Επιπλέον, λόγω της διαφορετικής ψυχοκοινωνικής ανάπτυξης, η αντιμετώπιση είναι καλύτερα να γίνεται σε κέντρα διάφορα από αυτά των ενηλίκων. Σύμφωνα με τις συστάσεις [306]:

- η αύξηση του βάρους σε γενικές γραμμές πρέπει να είναι της τάξης του 0.5 -1 kgf την εβδομάδα , τουλάχιστον στα αρχικά στάδια επανασίτισης
- να γίνεται σε ειδικά κέντρα κατάλληλα για την ηλικία τους και με προσωπικό έμπειρο στη συνεργασία με αυτές τις ηλικιακές ομάδες
- η αξιολόγηση του αναμενόμενου βάρους πρέπει να λαμβάνει υπόψη τις εκατοστιαίες θέσεις ύψους και βάρους προ νόσησης, το βάρος και το ύψος των γονέων και το φυσιολογικό βάρος για την εκατοστιαία θέση του ύψους
- ο στόχος του βάρους θα πρέπει να επανεκτιμάται ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνοντας υπόψη την ανάπτυξη
- αυτή θα πρέπει να διατηρείται, ει δυνατό, ανάμεσα σε δύο Σταθερές Απόκλισης (SD) των καμπύλων αναφοράς

Η ανάκτηση της εμμηνορρυσίας, όπου έχει διακοπεί, είναι ένας επαρκής δείκτης για την επίτευξη επαρκούς επανάκτησης βάρους, αν και απαραίτητα δεν καταδεικνύει το ιδανικό βάρος για μακρόχρονη υγεία. Επίσης μπορεί η επάνοδος της εμμηνορρυσίας να καθυστερήσει για αρκετούς μήνες [12] μετά την επίτευξη ενός φυσιολογικού, για το ύψος ,την ηλικία και το φύλο, βάρους σώματος. Μια διαφορετική προσέγγιση είναι να επιτύχουμε ένα BMI 19kgf/cm<sup>2</sup> και εν συνεχεία να ζητήσουμε από την ασθενή να ξεκινήσει διαδοχικά επαναλαμβανόμενα υπερηχογραφήματα των ωοθηκών, ενώ ταυτόχρονα να συνεχίζεται η αύξηση του βάρους έως ότου παρατηρηθεί κυρίαρχο ωοθυλάκιο [306].

Τα αρχικά υπερηχογραφικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι ακόμη κι αν έχουν επανακτήσει το σωματικό βάρος δεν εμφανίζουν ακόμη πλήρη ανάρρωση σε ότι αφορά την ωοθηκική λειτουργία. Οι ωοθήκες έχουν μορφολογία πολλαπλών κύστεων (multicystic), με 6 ή περισσότερα ωοθυλάκια διαμέτρου 4mm ή μεγαλύτερης [307]. Είναι σημείο χρόνιας ανωοθυλακιορρηξίας αλλά διαφέρει από την πολυκυστική απεικόνιση των ωοθηκών [12,307]. Αυτή η μορφολογία είναι επίσης πάντοτε παρούσα σε έφηβες που πάσχουν από κεντρική πρόωμη ήβη, αλλά όχι σε κορίτσια με φυσιολογική εφηβεία. Υποδηλώνει νυκτερινή κατά ώσεις έκκριση των γοναδοτροφινών και το επόμενο στάδιο, είναι η εμφάνιση ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου, αποτέλεσμα της αύξησης του εύρους της παλμικής έκκρισης αυτών [307].

Υποσχόμενος δείκτης ομαλοποίησης της ωοθηκικής λειτουργίας μετά την επίτευξη φυσιολογικού -για την ηλικία και το ύψος-βάρους σώματος, είναι η Αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH) η οποία φαίνεται να έχει ισχυρή συσχέτιση με την επανεμφάνιση εμμηνορρυσίας, στις περιπτώσεις στις οποίες το σωματικό βάρος ανακτάται στα φυσιολογικά όρια [12]. Χρειάζεται περαιτέρω επιβεβαίωση προτού εφαρμοστεί στη καθημέρα κλινική πράξη.

Αν και στις ενήλικες γυναίκες η επανάκτηση του 90% του ιδανικού τους βάρους, έχει σαν αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της οστικής πυκνότητας είτε έχει επανέλθει η εμμηνορρυσία είτε όχι [308,309], στα έφηβα κορίτσια η αλληλουχία γεγονότων φαίνεται να είναι πιο περίπλοκη, κυρίως λόγω του ότι αναμένεται αύξηση των οστικών παραμέτρων αλλά και λόγω των τεχνικών δυσκολιών στις μετρήσεις της BMD με τη DEXA, όπως έχει ήδη αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Παρόλα αυτά η διεθνής βιβλιογραφία είναι σαφής. Ο πρώτος στόχος για τη μελλοντική οστική υγεία των νεαρών ασθενών με ΨΑ είναι η αποκατάσταση του σωματικού βάρους και η επανάκτηση της εμμηνορρυσίας [16,308,310-322]. Παρόλα αυτά η αύξηση της BMD στη σπονδυλική στήλη φαίνεται να οφείλεται σε αύξηση της επιμετάλλωσης, παρά στη καθεαυτού αύξηση του μεγέθους των οστών [323].

**Πίνακας 6.** Αναφορά πρόσληψης θρεπτικών συστατικών για βιταμίνες και μέταλλα στις νεαρές γυναίκες\*

Βιταμίνες ή μέταλλα	Ηλικία 11-14 ετών	Ηλικία 15-18 ετών
Θειαμίνη, mg	0.7	0.8
Ριβοφλαβίνη, mg	1.1	1.1
Νιασίνη, mg	12	14
Βιταμίνη B <sub>6</sub> , mg	1.0	1.2
Βιταμίνη B <sub>12</sub> , μg	1.2	1.5
Φολικό οξύ, μg	200	200
Βιταμίνη C, mg	35	40
Βιταμίνη A, μg	600	600
Ασβέστιο, mg (mmol)	800 (20.0)	800 (20)
Φώσφορος, mg (mmol) <sup>1</sup>	625 (20.0)	625 (20.0)
Μαγνήσιο, mg (mmol)	280 (11.5)	300 (12.3)
Νάτριο, mg (mmol) <sup>2</sup>	1600 (70)	1600 (70)
Κάλιο, mg (mmol) <sup>3</sup>	3100 (80)	3500 (90)
Χλώριο, mg (mmol) <sup>4</sup>	2500 (70)	2500 (70)
Σίδηρος, mg (μmol)	14.8 (260)	14.8 (260)
Ψευδάργυρος, mg (μmol)	9.0 (140)	7.0 (110)
Χαλκός, μg (μmol)	0.8 (13)	1.0 (16)
Σελήνιο, μg (μmol)	45 (0.6)	60 (0.8)
Ιώδιο, μg (μmol)	130 (1.0)	140 (1.1)

1. Αναφορά πρόσληψης θρεπτικών συστατικών για το φώσφορο έχει τεθεί ίση με το ασβέστιο σε μοριακό επίπεδο

2. Νάτριο 1 mmol=23 mg

3. Κάλιο 1 mmol=39 mg

4. Αντιστοιχεί στο νάτριο, 1 mmol=35.5 mg

\*Τροποποιημένος από: Royal College of Psychiatrists, London. Council Report CR130, July 2005. Guidelines for the nutritional management of anorexia nervosa.

<b>Πίνακας 7. Μέση Εκτιμώμενη Ανάγκη*</b>		
Ημερήσια Ενεργειακή Πρόσληψη Kcal		
Ηλικία	Γυναίκες	Άντρες
• 15-18	• 2110	• 2755
• 19-50	• 1940	• 2550

\*Τροποποιημένος από: Royal College of Psychiatrists, London. Council Report CR130, July 2005. Guidelines for the nutritional management of anorexia nervosa.

### **Συμπληρώματα Ασβεστίου και Βιταμίνης D**

Από όλα τα διατροφικά συμπληρώματα, απαραίτητα για το μεταβολισμό των οστών τα πιο εκτενώς μελετημένα είναι αυτά του ασβεστίου [317].

Η βέλτιστη πρόσληψη του, αυξάνει την οστική πυκνότητα στα παιδιά και στους εφήβους [324,325-327], βοηθά στη διατήρησή της στους ενήλικες και μειώνει το ρυθμό οστικής απώλειας στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [317]. Παιδιά και έφηβοι με ελαττωμένη πρόσληψη ασβεστίου αναπτύσσονται ταχύτερα μετά τη χορήγηση συμπληρωμάτων [324-327]. Οι παράμετροι που υποδεικνύουν το ρυθμό οστικής απορρόφησης ελαττώνονται 4 ώρες μετά την per os χορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου, ενώ φαίνεται ότι διατηρούνται τα ευεργετικά αποτελέσματα της συμπληρωματικής του χορήγησης στην οστική πυκνότητα, επί τουλάχιστον ένα χρόνο μετά τη διακοπή τους [317].

Η χαμηλή συγκέντρωση βιταμίνης D, συσχετίζεται με ελαττωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Η ανεπάρκεια της, ιδιαίτερα σε μη

Καυκάσιες φυλές είναι πολύ συχνή [310]. Η βιταμίνη D, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία των οστών και στην οστική υγεία [312,328].

Παρόλα αυτά, η χορήγηση συμπληρωμάτων της στις συνιστώμενες δόσης πρόληψης ανεπάρκειας στο γενικό πληθυσμό, δεν φαίνεται βελτιώνει την οστική απώλεια σε ανορεκτικές ασθενείς [310,315,329]. Η συμπληρωματική χορήγηση, γίνεται στα πλαίσια του να μην επιδεινωθεί περαιτέρω η οστική υγεία από την πιθανή ανεπάρκεια της, που συνυπάρχει στις καταστάσεις υποθρεψίας.

Ειδικά στις έφηβες η συγχορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D δεν φαίνεται να βελτιώνει το Z-score της οστικής πυκνότητας στη σπονδυλική στήλη, καθώς δεν ανευρίσκεται διαφορά μεταξύ των ανορεκτικών εφήβων που λαμβάνουν τη συμπληρωματική αγωγή στη συνιστώμενη ημερήσια δοσολογία, και αυτών που υπολείπονται [330].

Πιθανά η συμπληρωματική αγωγή δεν επαρκεί από μόνη της να βελτιώσει την οστική πυκνότητα, είναι όμως απαραίτητη στο στάδιο της επανασίτισης [331].

### **Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης**

Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης με οιστρογόνα, βελτιώνει την οστική πυκνότητα και μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης σπονδυλικών καταγμάτων μεταβάλλοντας την απορρόφηση οστού από τους οστεοκλάστες, αλλά έχει περιορισμένη επίδραση στην οστική ανακατασκευή [310].

Η ελάττωση της οστικής πυκνότητας, ως επακόλουθο της ΨΑ, οφείλεται στην αποσύζευξη της οστεοβλαστικής και οστεοκλαστικής δραστηριότητας, που έχει σαν αποτέλεσμα τόσο τη μείωση της οστικής ανακατασκευής όσο και την αύξηση της οστικής απορρόφησης. Παρά το ότι η συσχέτιση μεταξύ οστικής νόσου και υποοιστρογοναιμίας είναι καλά τεκμηριωμένη, η βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενη [46,332-335] με μάλλον τις περισσότερες μελέτες να καταδεικνύουν αδυναμία βελτίωσης της οστικής μάζας με την ορμονοθεραπεία [67,332,336-339], και στις δύο συχνότερα μελετώμενες σκελετικές θέσεις.

Πολλές μελέτες διαφέρουν στην διάρκεια εκπόνησής τους, στην παρουσία ή απουσία ομάδας ελέγχου, στο μέγεθος του δείγματος και στην χορηγούμενη δόση [340-343]. Όμως το κοινό σ' όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές είναι η από του στόματος χορήγηση οιστρογόνων [15].

Τα *per os* (orally) οιστρογόνα έχουν πρώτη οδό δράσης το ήπαρ, με αποτέλεσμα την αύξηση της δεσμευτικής των ορμονών του φύλου σφαιρίνης (SHBG) και την μείωση του IGF-1. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η από του στόματος χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων δεν προσφέρει στην αύξηση της οστικής πυκνότητας στην ΨΑ, λόγω περαιτέρω μείωσης του IGF-1 και της τεστοστερόνης, και για τον ίδιο λόγο δεν την βελτιώνει ούτε *per os* χορήγηση αντισυλληπτικών δισκίων (OCPs) [337].

Οι έφηβες με ΨΑ έχουν ιδιαίτερα ελαττωμένα επίπεδα ολικής και ελεύθερης τεστοστερόνης, με την ελεύθερη να είναι μη ανιχνεύσιμη στην πλειονότητα των ασθενών [63]. Στην ΨΑ, ο IGF-1 ελαττώνεται λόγω υποθρεψίας. Η μείωσή του κατά την κρίσιμη περίοδο της οστικής ανάπτυξης, συσχετίζεται με την οστεοπενία των νοσούντων ανορεκτικών εφήβων [63] όπως αναλύθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Όταν χορηγούνται από το στόμα οιστρογόνα σε αυτή την κατηγορία ασθενών, για την πρόληψη των οστικών μεταβολών, είναι πιθανόν η μείωση του IGF-1 και η αύξηση της δεσμευτικής των ορμονών του φύλου σφαιρίνης (SHBG), ν' ανταγωνίζονται τη θετική τους δράση [15].

### **Θεραπεία με χορήγηση ανασυνδυσασμένου IGF-1 (r-IGF1)**

Ο IGF-1 διεγείρει τους οστεοβλάστες, συνεισφέροντας στην αύξηση των οστών, αλλά οι ασθενείς με ΨΑ έχουν ελαττωμένες συγκεντρώσεις αυτού.

Σε μια δημοσιευμένη μελέτη, η χορήγηση ανασυνδυσασμένου παράγοντα σε ενήλικες γυναίκες πάσχουσες από ΨΑ, αύξησε την ολική οστική μάζα, σε σύγκριση με ομάδα γυναικών που λάμβανε εικονικό φάρμακο. Σε συγχορήγηση με OCPs είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης, συγκριτικά με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου [344]. Σε



άλλη, η αναβολική δράση στα οστά του ανασυνδυασμένου IGF-1, φαίνεται να εξαρτάται από τη δόση χορήγησης. Δόση των 100 μg/kg προκάλεσε αύξηση τόσο των δεικτών απορρόφησης, όσο και των δεικτών οστικής παραγωγής, ενώ δόση μικρότερη (30μg/kg), είχε σαν αποτέλεσμα να αυξηθεί μόνο η οστική παραγωγή, χωρίς να επηρεαστεί το σκέλος της οστικής απορρόφησης [345].

Στις έφηβες με ΨΑ δεν υπάρχουν πολλές μελέτες χορήγησης ανασυνδυασμένου IGF-1, αλλά τα μέχρι στιγμής δεδομένα υποστηρίζουν τη βραχύχρονη χρήση του ως πιθανό θεραπευτικό παράγοντα [346,347]. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προτού θεωρεί κατάλληλη εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για τους εφήβους. Αντίθετα στους ενήλικες η χρήση μόνου του ή σε συνδυασμό με αντισυλληπτικά είναι καλύτερα τεκμηριωμένη [348].

### **Θεραπεία με διφωσφονικά**

Στις προεμμηνόπαυσιες γυναίκες στις ΗΠΑ, έχουν πάρει έγκριση μόνο οι αυτές που κάνουν θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή [310]. Αν και η επίδραση τους, στην οστική πυκνότητα ανορεκτικών γυναικών είναι θετική [349-351], εντούτοις η χρήση τους δεν ενδείκνυται στην αναπαραγωγική ηλικία, λόγω πιθανής τερατογένεσης. Πρέπει να συνυπολογιστεί ότι τα διφωσφονικά έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής και πιθανά εξακολουθούν να επηρεάζουν την οστική ανακατασκευή έως και δύο χρόνια μετά τη διακοπή τους [352]. Επιπλέον σε καθαρτικού τύπου περιστατικά ΨΑ δεν ενδείκνυνται λόγω του κινδύνου δημιουργίας οισοφαγικών ελκώσεων [310].

Υπάρχει μεγάλος σκεπτικισμός αναφορικά με τη χρήση τους σε νεαρότερες ηλικίες, και οι μελέτες που αναφέρονται στη χορήγησή τους σε παιδιά και έφηβους, πάσχοντα από δευτεροπαθή οστεοπόρωση είναι σπάνιες [353-355]. Στις ανορεκτικές έφηβες τα πιθανά οφέλη είναι μάλλον μικρά [354]. Δεν είναι τεκμηριωμένη η καταλληλότητά τους σε ανήλικο πληθυσμό.

## Άλλες Θεραπευτικές επιλογές

Μερικές άλλες πιθανές θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν τη χορήγηση τεριπαρατίδης, λεπτίνης, τετραϋδροκαναβινόλης, αντικαταθλιπτικών και γκρελίνης [310]. Αν και κάποιες από αυτές φαίνεται να μεταβάλλουν ή όχι την όρεξη, τις διαταραχές του ύπνου ή να βελτιώνουν τη διάθεση [13,356,357], εντούτοις δεν παρέχουν ενδείξεις ότι μπορούν να συνεισφέρουν στην αύξηση του σωματικού βάρους. Μια μικρή μελέτη σε μόλις 5 ασθενείς με ΨΑ, υποδεικνύει την πιθανή βελτίωση που έχει η χορήγηση ραλοξιφαίνης στην εμμένουσα, στα συμβατικά αντικαταθλιπτικά, κατάθλιψη [358].

Η πιθανή θεραπευτική τους δράση στα οστά ασθενών με ΨΑ πρέπει να διαλευκανθεί με περαιτέρω μελέτες. Τέλος επίσης υπό διερεύνηση είναι η επίδραση της χορήγησης τεστοστερόνης [358].

## ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΨΥΧΟΓΕΝΗ ΑΝΟΡΕΞΙΑ ΜΕ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΟΡΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε η *per os* χορήγηση οιστρογόνων, είτε με τη μορφή της κλασσικής θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, είτε σαν συνδυασμένα από του στόματος αντισυλληπτικά δισκία δεν θεωρούνται στη διεθνή βιβλιογραφία επιλογή που βελτιώνει την οστική πυκνότητα των γυναικών που πάσχουν από Ψυχογενή Ανορεξία. Οι σχετικά υψηλές δόσεις οιστρογόνων που περιέχονται στα αντισυλληπτικά δισκία καταστέλλουν την έκκριση του IGF-1 [359-361], ο οποίος είναι ήδη κατεσταλμένος, λόγω της υποθρεψίας, και αυτός είναι πιθανά ο λόγος αποτυχίας των από του στόματος οιστρογόνων [63]. Σε αντίθεση οι μικρές δόσεις οιστρογόνων που μιμούνται την αύξηση των στεροειδών στην πρώιμη εφηβική περίοδο [362,363] ή η διαδερμική οδός χορήγησης δεν καταστέλλουν περαιτέρω τον IGF-1 [359-361].

Ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 2000 οι ερευνητές λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, κατεδείκνυαν μέσα από τη διεθνή βιβλιογραφία την αναγκαιότητα εκπόνησης μελετών ιδιαίτερα σε εφήβους πάσχοντες από ΨΑ, ώστε αφενός να τεκμηριωθεί η λογικοφανής υπόθεση και αφετέρου να ανευρεθεί μία ασφαλής θεραπευτική επιλογή που να συνεισφέρει στην αποκατάσταση της οστικής πυκνότητας, σ' αυτό τον ιδιαίτερο πληθυσμό.

Το 2011 μια ομάδα ερευνητών από την Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου του Harvard δημοσίευσε τα αποτελέσματα ενός διπλού τυχαιοποιημένου με ομάδα ελέγχου ερευνητικού πρωτοκόλλου, που περιελάμβανε 110 έφηβες με ΨΑ και 40 φυσιολογικού βάρους κορίτσια όμοιας σκελετικής ωριμότητας [364]. Τα κορίτσια με οστική ηλικία μεγαλύτερη των 15 ετών (n =96) τυχαιοποιήθηκαν για 18 μήνες ή σε διαδερμική χορήγηση 100mcg 17-β οιστραδιόλης, (με κυκλική χορήγηση προγεστερόνης) ή σε εικονικό φάρμακο. Τα ανορεκτικά κορίτσια με οστική ηλικία μικρότερη των 15 χρόνων τυχαιοποιήθηκαν επίσης είτε σε από του στόματος σχήμα βαθμιαίας αύξησης ανά εξάμηνο, χαμηλής δόσης αιθυνολοιστραδιόλης, (3.75mcg ημερησίως για τους πρώτους 6 μήνες, 7.5mcg στους μήνες 6-12 και 11.25 mcg μέχρι των ολοκλήρωση του διαστήματος των 18 μηνών) σε

απομίμηση του τρόπου αύξησης των οιστρογόνων όπως συμβαίνει στην εφηβεία, είτε σε εικονικό φάρμακο για 18 μήνες. Κατά την εισαγωγή στο ερευνητικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε βασική μέτρηση της BMD στη σπονδυλική στήλη και το ισχίο, όπου οι ασθενείς με ΨΑ είχαν σημαντικά μικρότερη τιμή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη οι ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν στη χορήγηση οιστρογόνων δεν διέφεραν από αυτές που τυχαιοποιήθηκαν στο εικονικό φάρμακο, σε παραμέτρους που αφορούσαν την ηλικία, τη σκελετική ωρίμανση, το ύψος, το Δείκτη Μάζας Σώματος, τη διάρκεια της αμηνόρροιας και την οστική πυκνότητα.

Συν τω χρόνω παρατηρήθηκε αύξηση των BMD Z-scores των εφήβων που λάμβαναν οιστραδιόλη σε σύγκριση με αυτών που τυχαιοποιήθηκαν στο εικονικό φάρμακο. Η αύξηση στο BMD Z-score παρέμεινε ακόμη και μετά την πολυπαραγοντική ανάλυση για την ηλικία, τις αλλαγές του βάρους, το ύψος, τη γυναικολογική ηλικία και τη διάρκεια της αμηνόρροιας. Το BMD Z-score αυξήθηκε και στο ισχίο, αλλά η συσχέτιση με τη σπονδυλική BMD μετά την παραπάνω προσαρμογή κατέσκει ισχυρότερη [364].

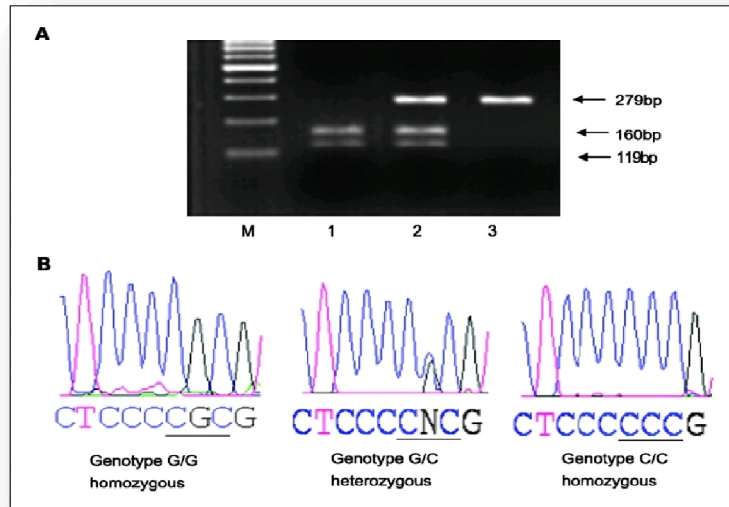
## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΗ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (GSNPs Genotyping)

### **Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικού Θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP)**

Οι συνήθεις μεθοδολογίες που συναντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία για την ανίχνευση των πολυμορφισμών, στηρίζονται στην μοριακή τεχνική RFLP (restriction fragment length polymorphism). Είναι η απλούστερη και η παλαιότερη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs). Η τεχνική βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού (DNA) στόχου (με PCR) και στη συνέχεια στην πέψη αυτού του στόχου, με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία.

Αυτό δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου. Έτσι πχ όταν εξετάζεται ένας γονιδιακός πολυμορφισμός, που περιέχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού, τότε το τμήμα DNA που περιέχει αυτήν την αλληλουχία θα κοπεί σε μικρότερα κομμάτια, ενώ το άλλο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού θα διατηρήσει το αρχικό του μέγεθος.

Τα δείγματα του DNA που υφίστανται πέψη αναλύονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους σε πηκτή (gel) αγαρόζης (πολυσακχαρίτης) με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Τα μόρια του DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, διαχωρίζονται κατά μήκος του πηκτώματος. Το πήκτωμα βάφεται με μια χρωστική ουσία, η οποία συνδέεται στα μόρια του DNA, και εν συνεχεία γίνεται ορατή υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) [365].



**Εικόνα 11.** Παράδειγμα γονοτύπησης πολυμορφισμού με PCR-RFLP

### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η μέθοδος PCR είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική βασισμένη στο πρότυπο αντιγραφής του DNA, που επιτρέπει τη δημιουργία απεριόριστων αντιγράφων γενετικού υλικού από ένα μόνο κύτταρο. Η PCR ανακοινώθηκε για πρώτη φορά το 1985 και σήμερα θεωρείται μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές ανακαλύψεις στο τομέα της Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής. Ο εφευρέτης της μεθόδου K.Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993.

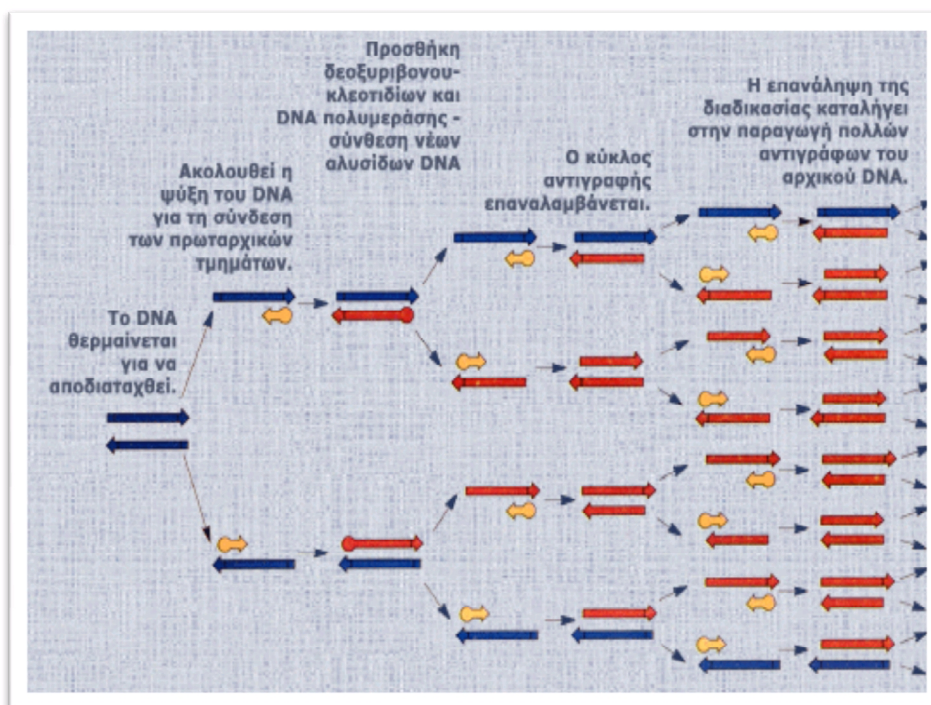
Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της, είναι να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων, που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγουμε το DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε μαζί με τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, μια ειδική DNA πολυμεράση, ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες, που καταλύει

τη σύνθεση του DNA και ιχνοστοιχεία που βελτιώνουν την απόδοσή της. Θερμαίνοντας το δοκιμαστικό σωλήνα, το DNA αποδιατάσσεται (Denaturation Step). Ακολουθεί η ψύξη του, έτσι ώστε τα ολιγονουκλεοτίδια να συνδεθούν στις συμπληρωματικές περιοχές του DNA κάθε αλυσίδας (Annealing Step). Σταδιακά και με τη συμμετοχή της DNA πολυμεράσης γίνεται η σύνθεση δύο νέων αλυσίδων συμπληρωματικών των αρχικών (Elongation Step). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται συμπληρώνοντας νέους κύκλους αντιγραφής (Εικόνα 6). Κάθε κύκλος αντιγραφής διαρκεί περίπου πέντε λεπτά.

Η ευαισθησία της τεχνικής PCR είναι σημαντική, αφού επιτυγχάνει την ταχύτατη ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών του DNA, που βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα.

Η μέθοδος PCR, βρίσκει εφαρμογές στην ανίχνευση γενετικών ασθενειών, των αρχικών σταδίων ιικών λοιμώξεων, στην εξακρίβωση της πατρότητας και στην εγκληματολογία, αφού απαιτεί ελάχιστες ποσότητες αίματος ή άλλων ιστικών προϊόντων για την ανάλυση του DNA [366].

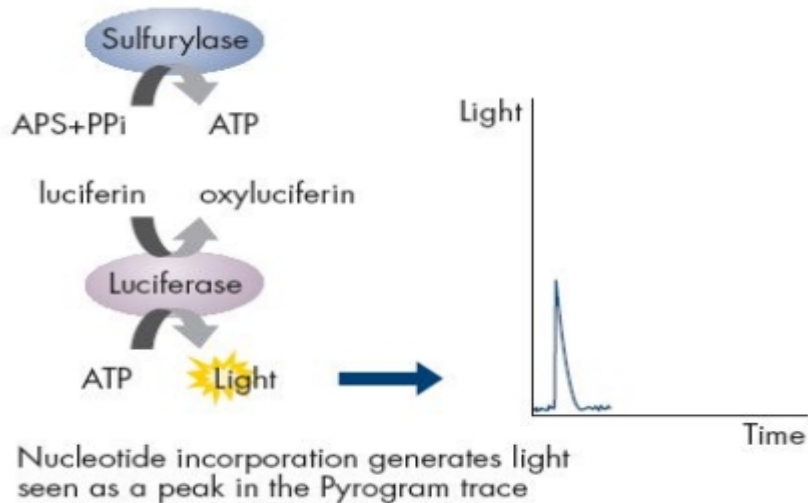


**Εικόνα 12.** Τα τρία στάδια της μεθόδου. Αποδιάταξη (Denaturation), Σύνδεση (Annealing), Σύνθεση (Elongation).

## Πυροαλληλούχιση (Pysequencing)

Η πυροαλληλούχιση, είναι μια σύγχρονη τεχνική της Μοριακής Βιολογίας, που επιτρέπει την ακριβή και ποσοτική ανάλυση γονιδιακών αλληλουχιών (DNA sequencing). Βασίζεται στην αρχή "Αλληλούχιση με σύνθεση" (sequencing by synthesis), σε αντίθεση με την παλαιότερη μέθοδο Sanger η οποία είναι μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination).

Η πυροαλληλούχιση, εκμεταλλεύεται την ανίχνευση της απελευθέρωσης μορίων πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου (Εικόνα13). Αντίθετα η Sanger στηρίζεται στον τερματισμό της σύνθεσης της νουκλεοτιδικής αλυσίδας από την ενσωμάτωση τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (dideoxynucleotide TriPhosphates, ddNTPs).



**Εικόνα 13.** Απελευθέρωση μορίων πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου, και απελευθέρωση φωτός που απεικονίζεται ως κορυφή, στο πρόγραμμα ανάλυσης της αντίδρασης.

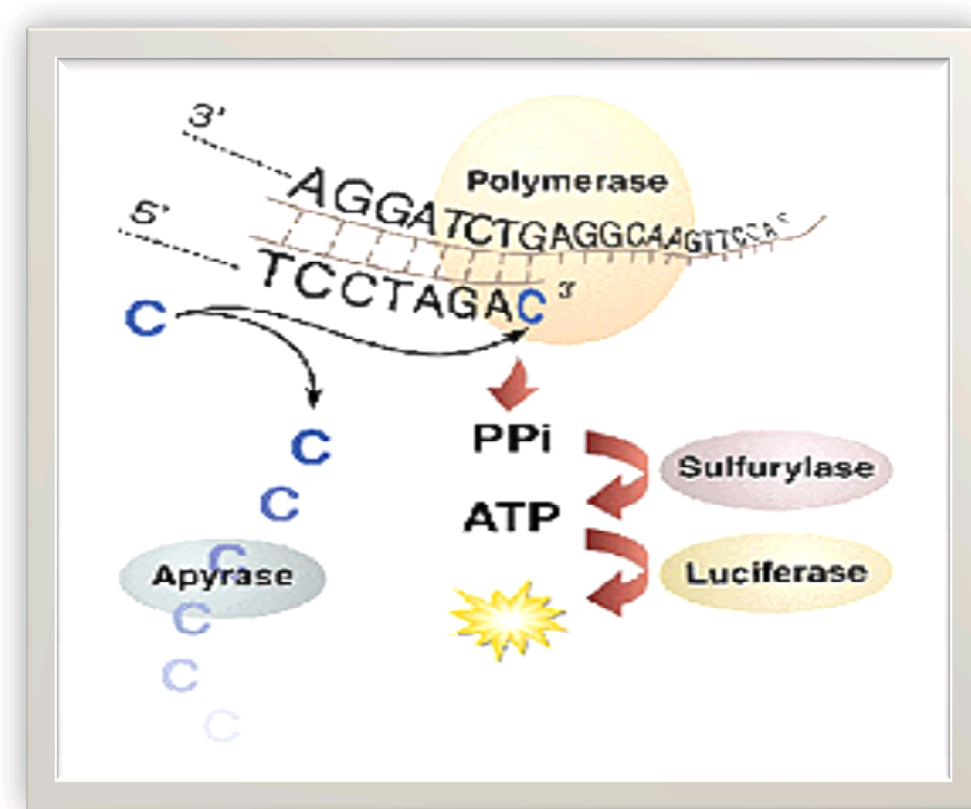


Η μεθοδολογία της πυροαλληλούχισης στηρίζεται στον προσδιορισμό της δραστικότητας του ενζύμου DNA πολυμεράση, με ένα χημειοφωταυγές ένζυμο.

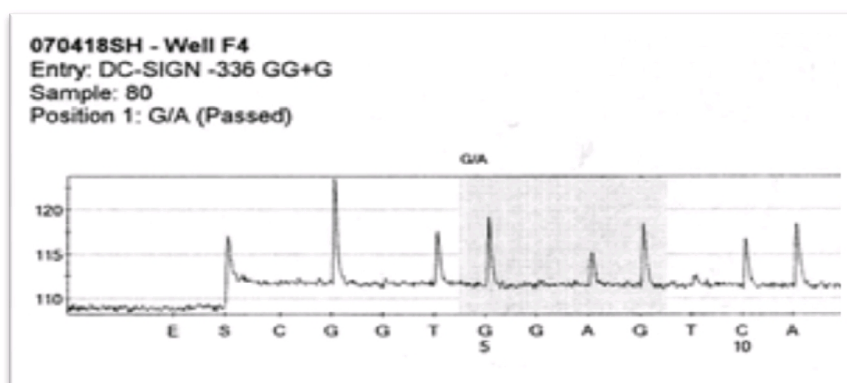
Δίνει τη δυνατότητα αλληλούχισης του μονόκλωνου DNA συνθέτοντας το συμπληρωματικό του κλώνο (ένα ζεύγος βάσεων κάθε φορά) και προσδιορίζοντας ποια βάση προστέθηκε σε κάθε βήμα. Η μήτρα DNA είναι ακίνητη και διαλύματα νουκλεοτιδίων Αδενίνης (A), Θυμίνης (T), Κυτοσίνης (C) και Γουανίνης (G) προστίθενται και αφαιρούνται μετά την αντίδραση διαδοχικά. Φως παράγεται μόνον όταν το διάλυμα νουκλεοτιδίων συνδέεται συμπληρωματικά, με την πρώτη μονήρη βάση της μήτρας DNA. Η αλληλουχία των διαλυμάτων που παράγουν σήματα χημειοφωταύγειας, επιτρέπει τον καθορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων της μήτρας DNA.

Η δίκλωνη μήτρα DNA υφίσταται υβριδισμό με έναν εκκινητή και εγκιβωτίζεται με τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφουρυλάση, λουσιφεράση και απυράση και τα υποστρώματα 5' φωσφοθειϊκή αδενοσίνη (Adenodine 5' PhosphoSulfate, APS) και λουσιφερίνη. Η προσθήκη ενός εκ των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (deoxyNucleotide TriPhosphates, dNTPs) μας εισάγει στο δεύτερο βήμα.

Σ' αυτό η DNA πολυμεράση ενσωματώνει τα σωστά συμπληρωματικά dNTPs στην μήτρα DNA. Αυτή η ενσωμάτωση απελευθερώνει πυροφωσφορικό (PPi) στοιχειομετρικά. Η ATP σουλφουρυλάση ποσοτικά μετατρέπει το PPi σε ATP παρουσία APS. Το ATP που παράγεται, δρα ως καύσιμο για την μέσω λουσιφεράσης μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη, η οποία παράγει ορατό φως σε ποσότητες που βρίσκονται σε αναλογία με την ποσότητα του ATP (Εικόνα 14). Το φως που παράγεται από την αντίδραση που καταλύεται από τη λουσιφεράση (Εικόνα 15), ανιχνεύεται από μία κάμερα και αναλύεται από ειδικό λογισμικό. Τα νουκλεοτίδια που δεν ενσωματώθηκαν και το ATP που δεν χρησιμοποιήθηκε, αποικοδομούνται από την απυράση και η αντίδραση μπορεί να ξαναρχίσει με άλλο νουκλεοτίδιο [367,368].



**Εικόνα 14.** Ενδεικτική απεικόνιση ενσωμάτωσης κυτοσίνης (C) στη μονόκλωνη νουκλεοτιδική αλυσίδα, που συντελεί στην παραγωγή πυροφωσφορικού το οποίο στη συνέχεια μέσω της σουλφουριλάσης και της λουσιφεράσης μετατρέπεται σε φως.



**Εικόνα 15.** Παράδειγμα πυρογράμματος που απεικονίζει την αλληλουχία νουκλεοτιδίων σε δείγμα DNA

## Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά την αρχική (1<sup>η</sup>) κλινική διερεύνηση αλλά και στη μετέπειτα παρακολούθηση των νεαρών ασθενών που προσέρχονται στο τμήμα Παιδικής – Εφηβικής Γυναικολογίας & Επανορθωτικής Χειρουργικής της Β΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Παν/μίου Αθηνών στο «Αρεταίειο» Νοσοκομείο, παρατηρήθηκε ότι κάποιες έφηβες με ΨΑ εμφανίζουν μειωμένη οστική πυκνότητα ακόμη και αν έχουν εμμηνορρυσία, ενώ κάποιες άλλες εμφανίζουν μικρότερη βλάβη στο οστόν, ακόμη και αν η διάρκεια αμηνόρροιας υπερέβαινε τους 12 μήνες. Από την άλλη κάποιες εμφάνιζαν βαριά βλάβη ( BMD Z-score < 2 ) ακόμη και μόνο με 3 μήνες αμηνόρροιας.

Τα τελευταία χρόνια διεθνώς γίνεται προσπάθεια «αποκωδικοποίησης» των μοριακών μηχανισμών που υπόκεινται βαθύτερα της νόσου, εστιάζοντας σε γονιδιακές μελέτες των συστημάτων που ελέγχουν την πρόσληψη τροφής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι μονοπάτι των οιστρογονικών υποδοχέων (Esr1 και Esr2) εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της νόσου με τρόπο που υπερβαίνει την ομοιοστασία του οστικού μεταβολισμού, παράγοντας μια μη φυσιολογική απάντηση στη οιστρογονική αύξηση που φυσιολογικά επισυμβαίνει κατά την εφηβεία, πυροδοτώντας την έναρξη της ασθένειας [369-372]. Τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης με κατάλληλες μελέτες.

Επίσης, από την έρευνα που εκπονείται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την πρόληψη της οστεοπόρωσης, η απορρόφηση του ασβεστίου και της βιταμίνης D φαίνεται να είναι εξαρτώμενη από τους πολυμορφισμούς του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR)[373-375] και συνεπώς η απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού στη χορηγούμενη δόση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D, είναι και αυτή υπό γενετικό έλεγχο [375].

Η βασική ιδέα για την εκπόνηση της παρούσης μελέτης, ήταν να ελεγχθούν ορισμένοι, ευρέως αποδεκτά εμπλεκόμενοι στον οστικό μεταβολισμό, γνωστοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), διερευνώντας την πιθανότητα κάποιος/κάποιοι ή συνδυασμοί αυτών να απαντώνται συχνότερα στα άτομα που

πάσχουν από Ψυχογενή Ανορεξία, σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, σε συνάρτηση με την επίδραση της γενετικής ετερογένειας στη νόσο .

Στην βιβλιογραφία έχει εγκαταλειφθεί η από του στόματος χορήγηση οιστρογόνων ως αναποτελεσματική και όλοι οι ερευνητές εστιάζουν στην επανασίτιση (αύξηση λιπώδους ιστού) με συγχορήγηση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D, ώστε να ανακτηθεί το σωματικό βάρος εντός φυσιολογικών ορίων, για την ηλικία και το φύλο, να αποκατασταθεί το πρότυπο της εμμηνορρυσίας στις περιπτώσεις που έχει διαταραχθεί, και να αυξηθεί η οστική πυκνότητα, για να αποτραπούν τα κλινικά επακόλουθα της ασθένειας, που αφορούν το οστόν.

Ακόμη, καθώς η ΨΑ έχει υψηλά ποσοστά χρονιότητας, ορισμένες ασθενείς ενδέχεται να εκδηλώσουν την ασθένεια κατά την εφηβεία και να συνεχίσουν να νοσούν και στην ενήλικη ζωή. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η θεραπευτική παρέμβαση που αφορά την οστική παράμετρο είναι διαφορετική, όπως αναλύθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο του γενικού μέρους, προσφέροντας λίγες περισσότερες επιλογές.

Η διερεύνηση της γενετικής προδιάθεσης για επιπλέον απώλεια οστικής μάζας (γενετικής επιβάρυνσης), με την πιθανή εμπλοκή ενός ή περισσότερων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ή συνδυασμού αυτών, που πιθανώς να ανιχνεύονται σε μεγαλύτερη συχνότητα στις ανορεκτικές ασθενείς σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, θα μπορούσε να προσφέρει την δικαιολογημένη πλέον βάση για εξατομικευμένη θεραπεία, εφόσον η ασθενής θα το επιθυμούσε, κατόπιν γενετικού ελέγχου.

Από την άλλη, αν στις ελληνίδες με ΨΑ είναι συχνότερη η κατανομή του wt γονότυπου κάποιου πολυμορφισμού του alpha οιστρογονικού υποδοχέα, τότε πιθανά να μπορούσε να προσφερθεί η διαδερμική οδός χορήγησης οιστρογόνων που παρακάμπτοντας τον ηπατικό μεταβολισμό, θα είχε δυναμικά καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα, συνυπολογίζοντας την πρώιμη και εξατομικευμένη παρέμβαση. Αν η κατανομή αφορά συχνότερα το μεταλλαγμένο τύπο τότε και πάλι η αναγνώριση αυτών των ασθενών ως πιθανών «non-responders» θα απέτρεπε από άσκοπη και ακατάλληλη θεραπεία. Σημασία επίσης έχει η

αναγνώριση των ετεροζυγωτών και η πιθανή συνεισφορά τους στον εκτιμώμενο κίνδυνο για την εμφάνιση οστικής βλάβης.

Εν κατακλείδι, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της γενετικής ετερογένειας του οστικού μεταβολισμού στις έφηβες νοσούσες από Ψυχογενή Ανορεξία, με στόχο την προσπάθεια για την πληρέστερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ψυχιατρικής νόσου, την έγκαιρη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των απώτερων συνεπειών της (πρόληψη της ελάττωσης της οστικής πυκνότητας και μείωση του εφόρου ζωής κινδύνου για οστεοπορωτικά κατάγματα) και τη διερεύνηση της δυνατότητας παροχής εξατομικευμένης θεραπείας, αναγνωρίζοντας αυτές τις περιπτώσεις στις οποίες η έγκαιρη παρέμβαση θα ήταν η βέλτιστη δυνατή.





## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Ασθενείς

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο τμήμα Παιδικής - Εφηβικής Γυναικολογίας και Επανορθωτικής Χειρουργικής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο «Αρεταίειο» Νοσοκομείο και ένα μέρος της στη Μονάδα Εφηβικής Υγείας της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Παν/μίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγλαΐα Κυριακού» .

Εγκρίθηκε από την επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του «Αρεταίειου» Νοσοκομείου Αθηνών (αρ πρωτοκόλλου Σ-102/29-09-2009) και δόθηκε έγγραφη συγκατάθεση τόσο από την έφηβη όσο και από έναν γονέα ή κηδεμόνα μετά από λεπτομερή ενημέρωση. Το ερευνητικό πρωτόκολλο είναι σύμφωνο με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι.

Η μελέτη περιλαμβάνει 40 θήλεα ηλικίας 12 έως 21ετών, πάσχοντα από Ψυχογενή Ανορεξία, και 10 υγιή ίδιας ηλικίας, ως ομάδα ελέγχου. Για τη διάγνωση της ΨΑ χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρείας (APA) προτεινόμενα DSM-V, 2012 [376].

Στην υπό εξέταση ομάδα (ασθενείς) συμπεριελήφθησαν έφηβες με Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) μεταξύ 12.5-18.5 kg/cm<sup>2</sup> (ή μικρότερο από την 5<sup>η</sup> εκατοστιαία για την ηλικία θέση), ενώ στην ομάδα ελέγχου, έφηβες με BMI 18.5-25 kg/cm<sup>2</sup> (ή μεταξύ της 5<sup>ης</sup> και 85<sup>ης</sup> εκατοστιαίας για την ηλικία θέσης). Και στις 2 ομάδες η φυσική άσκηση των ατόμων δεν έπρεπε να υπερβαίνει τις 2 ώρες εβδομαδιαίως.

Ως κριτήρια αποκλεισμού ορίστηκαν η παρουσία οργανικού ή μεταβολικού νοσήματος σχετιζόμενο με τον οστικό μεταβολισμό και την υποθρεψία, η κατανάλωση προϊόντων καπνού και η χρήση ορμονικής θεραπείας συμπεριλαμβανομένου και των αντισυλληπτικών δισκίων (OCPs).

## Κλινικές και Εργαστηριακές Εξετάσεις

Κατά την πρώτη επίσκεψη ελήφθη ενδελεχές ιατρικό ιστορικό και συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε ερωτήσεις που αφορούσαν τα δημογραφικά και κοινωνικοοικονομικά χαρακτηριστικά όπως και ερωτήσεις αυτοεκτίμησης σε συσχέτιση με το σώμα τους.

Το ύψος και το βάρος μετρήθηκαν πρώι, με ελαφρύ ρουχισμό και σε όρθια θέση χωρίς παπούτσια, με τη χρήση ηλεκτρονικού ζυγού και επιτοίχιου αναστημόμετρου. Για τον υπολογισμό του BMI και του σχετικού με την ηλικία BMI Z-score χρησιμοποιήθηκε ο on line υπολογιστής του Baylor College of Medicine, Children's Nutrition Research Center [297].

Ακολούθησε πρωινή αιμοληψία νήστεως που πραγματοποιήθηκε μεταξύ 8.30-9.30 πμ και τα δείγματα αίματος που προορίζονταν για την ανάλυση των υπό εξέταση πολυμορφισμών τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο με K3 EDTA (VACUETTE®) και αποθηκεύθηκαν στους -20°C, μέχρι την διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού.

Τα δείγματα που προορίζονταν για ορμονική εκτίμηση ( $E_2$ ) φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3500 rpm, και κατόπιν οι οροί συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια erpendorf. Εν συνεχεία καταψύχθηκαν στους -80° C μέχρι να μετρηθούν. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της 17-β οιστραδιόλης μετρήθηκαν με μέθοδο ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (kit DSK-10-4300, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA). Η φλεβοκέντηση των εφήβων με φυσιολογικό πρότυπο εμμηνορρυσίας πραγματοποιήθηκε την 3<sup>η</sup> με 5<sup>η</sup> μέρα του καταμήνιου κύκλου.

Η οστική πυκνότητα (BMD) της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης (O2-O4), μετρήθηκε εντός της ίδιας μέρας σε προσθιοπίσθια προβολή, με τη χρήση Διπλής ενέργειας Χ-Φωτονιακής Δέσμης. Η σάρωση πραγματοποιήθηκε με το Norland Excell Plus densitometer (Cooper Surgical Inc., Fort Atkinson, WI, USA). Τα Z-scores της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z- scores) σε συσχέτιση με την ηλικία και το φύλο, υπολογίστηκαν με τη χρήση των ανθρωπομετρικών πινάκων αναφοράς, που δημοσιεύονται στη μελέτη των

Zanchetta και συνεργατών [272]. Σύμφωνα με την Διεθνή Εταιρεία Κλινικής Πυκνομετρίας (ISCD,2007), η «χαμηλή οστική μάζα ή χαμηλή οστική πυκνότητα για την χρονολογική ηλικία» ορίζεται όταν το Z-score της BMC ή της περιοχικής BMD είναι μικρότερο ή ίσο με την τιμή -2 [245].

Αρχικά διαιρέσαμε την ομάδα των ασθενών σε 3 υποομάδες σύμφωνα με το LBMD Z-score (<-2, -2 έως -1, >-1) όμως λόγω του μικρού δείγματος δεν κατέσται δυνατή η στατιστική ανάλυση. Γι αυτό και διαιρέθηκαν σε 2 υποομάδες ( $\leq -1$  ή  $> -1$ ) υποδεικνύοντας πιθανή οστεοπενία/οστεοπόρωση.

### Γονίδια – Πολυμορφισμοί

Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν στον προσδιορισμό της παρουσίας έξι γενετικών πολυμορφισμών. Οι πολυμορφισμοί είναι οι εξής και περιγράφονται στον Πίνακα 8:

**Πίνακας 8.** Πολυμορφισμοί της μελέτης

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΣΗ & ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ (ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ)	Reference SNP
ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΚΑΛΣΙΤΟΝΙΝΗΣ	CTR	T 1623 C	rs1801197
ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΤΥΠΟΥ I	COL1A1	G 6252 T	rs1800012
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ 1	ESR1	C156705T	rs2234693
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ 1	ESR1	A 156751 G	rs 934079
ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D	VDR	G 63980 A	rs1544410
ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D	VDR	T 30920 A/C/G	rs2228570

Η συνήθης αναφορά των παραπάνω πολυμορφισμών στη διεθνή βιβλιογραφία συνοψίζεται στον Πίνακα 9:

**Πίνακας 9.** Βιβλιογραφική αναφορά των εξεταζόμενων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών ( SNPs)

Reference SNP	Βιβλιογραφική Αναφορά Πολυμορφισμού
rs 1801197	CTR - AluI
rs 1800012	COL1A1 – Sp1
rs 2234693	Esr1 - PvuII
rs 934079	Esr1 - XbaI
rs 1544410	VDR - BsmI
rs 2228570	VDR - FokI

Η ονοματολογία που επικρατεί στις αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, βασίζεται στην περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιείται στην πέψη (digestion) του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR), για την ανίχνευση του πολυμορφικού νουκλεοτιδίου. Για αυτό τον λόγο, οι συντομογραφίες (AluI, SpI, PvuII, XbaI, BsmI, FokI) των περιοριστικών ενδονουκλεασών που χρησιμοποιούνται, τοποθετούνται μετά το γονίδιο αναφοράς.

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing).

## Μεθοδολογία προσδιορισμού των εξεταζόμενων Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών (SNPs)

Τα στάδια για τον προσδιορισμό των γενετικών SNPs είναι τα εξής:

1. Δειγματοληψία
2. Απομόνωση γενετικού υλικού
3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)
4. Πυροαλληλούχιση (Pyrosequencing)
5. Ανάλυση αποτελεσμάτων

### Δειγματοληψία

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ελήφθησαν μετά από πρωινή φλεβοκέντηση, 0,2 ml περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο με K3EDTA. Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν στους -20° C μέχρι τη διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού.

### Απομόνωση

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο της κατακρήμνησης (DNA degradation), χρησιμοποιώντας στήλες με τεχνολογία σιλικονούχου μεμβράνης Nucleospin Blood QuickPure της εταιρείας Macherey-Nagel GmbH & Co (Düren, Germany). Το DNA συνδέθηκε στη μεμβράνη, μετά από κατεργασία του μείγματος με χαστροπικά άλατα και αιθανόλη. Η έκλουσή του έγινε με κατάλληλο ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Η διαδικασία της πρόσδεσης και της έκλουσης του DNA περιγράφεται ως εξής:

1. Λύση των λευκοκυττάρων του δείγματος.
2. Πρόσδεση του DNA στη σιλικονούχα μεμβράνη
3. Καθαρισμός του δείγματος
4. Έκλουση του DNA

### Λύση των λευκοκυττάρων του δείγματος

Ελήφθησαν 200μl ολικού αίματος. Στο δείγμα προστέθηκαν 25μl πρωτεϊνάσης K και 200μl υδροχλωρικής γουανιδίνης και κατόπιν το διάλυμα τοποθετήθηκε σε

θερμαινόμενο υδατόλουτρο στους 70° C για 15 min (επώαση). Σε αυτό το στάδιο έγινε λύση των κυττάρων και καταστροφή των πυρηνικών ενδονουκλεασών.

#### Πρόσδεση του DNA στη σιλικονούχα μεμβράνη

Στο παρεληφθέν διάλυμα μετά τα 15 λεπτά επώασης, προστέθηκαν 200μl διαλύματος αιθανόλης (100%), ρυθμίζοντας με αυτό το τρόπο τις συνθήκες πρόσδεσης του DNA στη σιλικονούχα μεμβράνη. Εν συνεχεία, μετά από ισχυρή ανάμιξη (vortex) μεταφέρθηκε στη στήλη με τη σιλικονούχο μεμβράνη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1 min.

#### Καθαρισμός του δείγματος

Στην κενή στήλη προστέθηκε διάλυμα αιθανολούχο (περιεκτικότητας 70% σε αιθανόλη) σε ποσότητα 350μl. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 3 min.

#### Έκλουση του DNA

Στη κενή στήλη προστέθηκαν 50 μl διαλύματος 5mM Tris/HCL, pH=8,5. Η στήλη παρέμεινε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε για ακόμη 1 min στις 11.000 rpm, ώστε να απομονωθεί το γενωμικό DNA του δείγματος. Εν συνεχεία το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε. Δείγματα τα οποία είχαν συγκέντρωση 80–120 ng/μL και δείκτη καθαρότητας (λόγος A260/A280) ίσο με 1.6–1.9 σημάνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

#### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Είχε προηγηθεί η σχεδίαση ειδικού ζεύγους εκκινητών (primers) για κάθε πολυμορφισμό του ενδιαφέροντος μας, εκ των οποίων ο ένας κατ' επιλογή έφερε βιοτινυλιωμένο άκρο. Με τη χρήση τους απομονώθηκαν οι περιοχές του DNA που εντοπίζονται οι πολυμορφισμοί. Τα στοιχεία των εκκινητών περιγράφονται στον Πίνακα 10.

Οι περιοχές αυτές πολλαπλασιάστηκαν με PCR. Για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 5 αντιδράσεις PCR. Σε κάθε μία από αυτές χρησιμοποιήθηκαν, 21  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$  από τον εκάστοτε Fw εκκινητή, 1  $\mu\text{L}$  από τον εκάστοτε Rev εκκινητή, 2  $\mu\text{L}$  DNA και 25  $\mu\text{L}$  Hot Start Master Mix (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Μετά την αρχική αποδιάταξη (denaturation) στους 95°C για 5 min, η ενίσχυση (amplification) συνίστατο σε 30 κύκλους:

αποδιάταξης στους 95°C για 30 sec, σύνδεσης (annealing) στους 58°C για 30 sec, και σύνθεσης (elongation) στους 72°C για 30 sec, που ακολουθήθηκαν από ένα τελικό στάδιο σύνθεσης στους 72°C για 4 min ( Πίνακας 12).

Συγκεκριμένα στο διάλυμα της PCR για κάθε δείγμα της μελέτης μας, περιλαμβάνονται τα αντιδραστήρια που περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 11.

**Πίνακας 11.** Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της PCR για κάθε δείγμα.

\* Τα ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση του πολυμορφισμού σε κάθε θέση του γονιδιώματος περιγράφονται στον Πίνακα 10.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες Αντιδραστηρίων
Hot Start master mix (GE HealthCare, 25-1500-01, 100 reactions)	25 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	21 $\mu\text{l}$
Εκκινητής Fw (Για κάθε πολυμορφισμό)*	1 $\mu\text{l}$
Εκκινητής Rev (Για κάθε πολυμορφισμό)*	1 $\mu\text{l}$
DNA δείγματος	2 $\mu\text{l}$
Συνολικός όγκος αντίδρασης	50 $\mu\text{l}$

## **Πίνακας 12.** Στάδια PCR

Στάδιο		Θερμοκρασία	Χρόνος	
1.	Initial Denaturation	95° C	5 min	
1.	Denaturation	95° C	30 sec	30 Κύκλοι Αντίδρασης
2.	Annealing	58° C	30 sec	
3.	Elongation	72° C	30 sec	
3.	Final Elongation	72° C	4 min	

Η θερμοκρασία στο στάδιο της σύνδεσης (annealing), εξαρτήθηκε από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών. Με την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης, τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -20° C, μέχρι το στάδιο της πυροαλληλούχισης.

### **Πυροαλληλούχιση**

Η διαδικασία διαχωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Προσρόφησης
2. Σύνδεσης
3. Ανάλυσης

#### Στάδιο Προσρόφησης

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το στάδιο αυτό είναι της εταιρείας Qiagen Inc. Αναλυτικά διεξήχθησαν τα εξής: Σε μικροπλάκα διαστάσεων 3x8 μικροβοθρίων, εγχύθηκαν 30μL από το προϊόν που παρήχθη από την PCR. Παράλληλα παρασκευάστηκε διάλυμα 53 μL, που περιείχε 40 μL διαλύματος



πρόσδεσης (Binding Buffer), 3μL σφαιρίδια σεφαρόζης και 10μL H<sub>2</sub>O, (διάλυμα Β) όπως περιγράφεται στον Πίνακα 13. Σε κάθε μικροβοθρίο της μικροπλάκας, εγχύθηκαν 50μl από το παρασκευασθέν διάλυμα, και συνολικά ο όγκος στο μικροβοθρίο, ήταν 80μL. Κατόπιν η μικροπλάκα τοποθετήθηκε σε κινούμενη (1400 rpm) μη θερμαινόμενη πλάκα για 10 λεπτά. Η μίξη των παραγώγων της PCR με το εν λόγω διάλυμα στο οποίο περιέχονται σφαιρίδια σεφαρόζης, είχε σαν αποτέλεσμα την εκλεκτική πρόσδεση των βιοτινυλιωμένων άκρων των παραγώγων της PCR.

**Πίνακας 13.** Υλικά που απαιτήθηκαν κατά το στάδιο προσρόφησης για τη σύνθεση του διαλύματος Β

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά δείγμα
Διάλυμα Πρόσδεσης (Binding Buffer)	40μl
Σφαιρίδια Σεφαρόζης	3 μl
dH <sub>2</sub> O	10 μl
Σύνολο	53 μl

Στάδιο Σύνδεσης

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70%
- Διάλυμα πλύσης (1x). Αραίωση Washing Buffer (10x) της εταιρείας Qiagen Inc.
- Διάλυμα αποδιάταξης (Denaturation Solution, Qiagen Inc.)
- Διάλυμα Γ

Στο διάλυμα Γ, χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής αλληλούχισης για τον εκάστοτε μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (Sequencing Primer) και το διάλυμα σύνδεσης (Annealing Solution, Qiagen Inc.). Η μίξη έγινε σε αναλογία 1:25. Προετοιμάστηκαν 50μL διαλύματος για το κάθε δείγμα. Στην μικροπλάκα ανάλυσης, της εταιρείας Qiagen Inc., διαστάσεων 3x8 μικροβοθρία, τοποθετήθηκαν 26μl του διαλύματος Β για τον εκάστοτε μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό. Μετά το πέρας της ανακίνησής της, η μικροπλάκα πρόσδεσης μεταφέρθηκε στο PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation (Qiagen GmbH Hilden, Germany).

Το μείγμα απορροφήθηκε από ειδικά σχεδιασμένα φίλτρα, προσαρμοσμένα σε χειροκίνητη λαβή, τα οποία συγκρατούν τα σφαιρίδια σεφαρόζης με τα προσδεδεμένα βιοτινυλιωμένα παράγωγα της PCR. Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70% για τον καθαρισμό του μείγματος, ακολούθως έκπλυση με το διάλυμα αποδιάταξης, για την αποδιάταξη των κλώνων των παραγώγων της PCR και τέλος έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης για την απομάκρυνση των μη βιοτινυλιωμένων άκρων τους.

Τα ειδικά σχεδιασμένα φίλτρα τοποθετήθηκαν αναλογικά στην μικροπλάκα σύνδεσης. Η μικροπλάκα επωάστηκε για 2 min στους 80°C και ακολούθησε το τελικό στάδιο της ανάλυσης.

### Στάδιο Ανάλυσης

Σε αυτό το στάδιο, η μικροπλάκα σύνδεσης τοποθετήθηκε στο μηχάνημα PyroMark Q24. Ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων και τα αποτελέσματα παρελήφθησαν σε ηλεκτρονική μορφή, ώστε να γίνει η επεξεργασία τους με το λογισμικό της εταιρείας (PyroMark Q24 software). Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν και ακολούθησε η στατιστική τους επεξεργασία.

**Πίνακας 10.** Αναλυτικός πίνακας εκκινητών αντίδρασης PCR (Fw, Rev) και πυροαλληλούχισης (Seq). Στον πίνακα εμφανίζεται η θερμοκρασία τήξης του κάθε εκκινητή ξεχωριστά, (Tm), η εκατοστιαία αναλογία σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης, η μέθοδος καθαρισμού του κάθε εκκινητή όπως επίσης και επιπλέον τροποποιήσεις αυτών

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3')	Tm (°C)	Περιεχόμενο G-C (%)	Καθαρισμός*	Τροποποίηση**
CTR-AluI Fw	GCT GGC GAC ATC CCA ATT T	56.7	52.6	HPLC	Βοτυνιλιωμένος
CTR-AluI Rev	GTT CCT GGG AGG ATG GAG AAT AC	62.4	52.2	HPSF	---
CTR-AluI Seq	TGT TGG CTG GTT CAT	45.1	46.7	HPSF	---
ESR1-Fw	TTC ATC TGA GTT CCA AAT GTC C	56.5	40.9	HPSF	---
ESR1-Rev	ACC ATT AGA GAC CAA TGC TCA TC	58.9	43.5	HPLC	Βοτυνιλιωμένος
ESR1-XbaI Seq	CCA GAG ACC CTG AGT G	54.3	62.5	HPSF	---
ESR1-PvuII Seq	CTG AGT TCC AAA TGT CC	50.4	47.1	HPSF	---
VDR-FokI Fw	GTG GCC TGC TTG CTG TTC	58.2	61.1	HPSF	---
VDR-FokI Rev	ACA CAC CCC ACA GAT CCG	58.2	61.1	HPLC	Βοτυνιλιωμένος
VDR-FokI Seq	TTG CTG TTC TTA CAG GG	50.4	47.1	HPSF	---
VDR-BsmI Fw	GAT TCG TAG GGG GGA TTC TG	59.4	55	HPSF	---
VDR-BsmI Rev	CTC TCA GGC TCC AAA GTT TTG TA	58.9	43.5	HPLC	Βοτυνιλιωμένος
VDR-BsmI Seq	CAC AGA CAG GCC TGC	53.3	66.7	HPSF	---
Col1A1-Sp1 Fw	CCG AGA GCG GGC TTT TA	58.8	57.9	HPSF	---
Col1A1-Sp1 Rev	GCT TGC GTG GTA GAG ACA GG	61.4	60	HPLC	Βοτυνιλιωμένος
Col1A1-Sp1 Seq	GCC CCG CCC CCG CCA	64.2	93.3	HPSF	---

\* HPLC (High Purity Liquid Chromatography), HPSF( High Purity Salt Chromatography) \*\* Βιοτυνιλιωμένος είναι ένας εκ των δύο εκκινητών της PCR αντίδρασης για τον κάθε πολυμορφισμό.



## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή με την τυπική απόκλιση (προέρχονται από κανονική κατανομή) ή ως διάμεσος με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (για δεδομένα που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή). Οι ποιοτικές (κατηγορικές) μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες συχνότητες με τα αντίστοιχα ποσοστά. Για τη σύγκριση, ποσοτικών μεταβλητών, μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ή άλλων κατηγορικών μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε το t-test για ανεξάρτητα δείγματα (t-test for independent samples) ή ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για μεταβλητές που ακολουθούν την κανονική κατανομή, και για μη κανονικά κατανομημένες μεταβλητές το Mann-Whitney test ή το Kruskal-Wallis test. Για τον έλεγχο κανονικότητας των ποσοτικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Shapiro-Wilk test. Η δοκιμασία  $\chi^2$  (Chi-square test) ή το ακριβές test του Fisher (Fisher's exact test), χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο σχέσης μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών, ενώ για δίτιμες κατηγορικές μεταβλητές υπολογίστηκαν οι λόγοι πιθανοτήτων (odds ratio: OR) και τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% ΔΕ). Επίσης, το  $\chi^2$  test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) των μελετώμενων υποδοχέων, σε κάθε μια από τις ομάδες (ασθενείς- μάρτυρες) ξεχωριστά. Ελέγχθηκε δηλαδή, εάν οι παρατηρούμενες συχνότητες γονοτύπων διαφέρουν από τις αναμενόμενες μεταξύ των ασθενών και μεταξύ των μαρτύρων. Η δοκιμασία  $\chi^2$  για τάση (Chi-square test for trend) εφαρμόστηκε για τον έλεγχο ύπαρξης γραμμικής σχέσης, μεταξύ της κατανομής συχνοτήτων των ομάδων γονοτύπων του κάθε μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) των μελετώμενων υποδοχέων και της ΨΑ, όπως επίσης και μειωμένης τιμής του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score). Το Wald test εφαρμόστηκε, μέσω της απλής και της πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (μέθοδος stepwise), για να εκτιμηθεί αφενός η πιθανότητα συσχέτισης των έξι SNPs των εξεταζόμενων υποδοχέων, με την εμφάνιση Ψυχογενούς Ανορεξίας και αφετέρου στην επίδρασή τους στο LBMD Z-score, υπολογίζοντας και στις δύο περιπτώσεις τα odds ratios και τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% ΔΕ). Στην πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση συμπεριλήφθησαν στο μοντέλο και οι πιθανοί

συγχυτικοί παράγοντες ηλικία και δείκτης μάζας σώματος (BMI). Για τους SNPs που βρέθηκαν να σχετίζονται είτε με την ΨΑ είτε με την μειωμένη τιμή του LBMD Z-score, διερευνήθηκε ο τρόπος κληρονομικότητας (mode of inheritance) εκτιμώντας το βαθμό κυριαρχίας (degree of dominance ( $h$ )) μέσω του υπολογισμού της προσθετικής και της συγκυρίαρχης αντίθεσης (additive και co-dominant contrast αντίστοιχα). Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν η τιμή του  $p$ -value, για δίπλευρο έλεγχο, ήταν μικρότερη του 0,05. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20 (IBM, USA).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ισορροπία Hardy-Weinberg

Σύμφωνα με την ισορροπία των Hardy-Weinberg οι σχετικές συχνότητες των αλληλομόρφων παραμένουν σταθερές από γενιά σε γενιά αν δεν διαταραχθεί κανένας από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την όλη διαδικασία. Η ισορροπία Hardy-Weinberg για έναν πολυμορφισμό εκφράζεται με τον μαθηματικό τύπο:  $p^2+2pq+q^2=1$ . Όπου  $p$  και  $q$  η συχνότητα των δυο αλληλόμορφων (έστω  $A$  και  $C$  αντίστοιχα) και βάσει της ισορροπίας θα ισχύει:  $p^2$  για τους ομοζυγώτες  $AA$ ,  $q^2$  για τους ομοζυγώτες  $CC$  και  $2pq$  για τους ετεροζυγώτες  $AC$ . Υπολογίζοντας τις αναμενόμενες συχνότητες των γονοτύπων με βάση την ισορροπία Hardy-Weinberg, συγκρίνουμε εάν παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ παρατηρούμενων συχνοτήτων και αναμενόμενων χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία  $\chi^2$  (Chi-square test). Η τιμή 3,84 της δοκιμασίας  $\chi^2$  αντιστοιχεί στο όριο της στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0,05$ ). Αν η τιμή του  $\chi^2$  test είναι μεγαλύτερη από το 3.84, τότε υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι παρατηρούμενες και οι αναμενόμενες συχνότητες γονοτύπων, καθώς και οι τιμές  $p$ -value και του  $\chi^2$  test. Μεταξύ των ασθενών, από τους έξι υπό διερεύνηση SNPs μόνο οι Vdr-Bsml ( $\chi^2=6,324$ ) και Vdr-Fok1 ( $\chi^2=7,019$ ) φάνηκε να αποκλίνουν στατιστικά σημαντικά από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Ενώ μεταξύ των υγιών κοριτσιών (μάρτυρες) μόνο ο Esr1-PvuII ( $\chi^2=4,444$ ) έδειξε να αποκλίνει σημαντικά από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

**Πίνακας 14:** Έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg των SNPs των εξεταζόμενων υποδοχέων

Γονότυποι	Ασθενείς	Μάρτυρες	p-value ( $\chi^2$ test)	Ασθενείς	Μάρτυρες	p-value ( $\chi^2$ test)
	Παρατηρούμενες συχνότητες	Αναμενόμενες συχνότητες		Παρατηρούμενες συχνότητες	Αναμενόμενες συχνότητες	
<b>COL1A1</b>						
G/G - wt	31	29,8	0,097	9	9,0	
G/T	7	9,5	(2,750)	1	1,0	0,867 (0,028)
T/T	2	0,8		0	0,0	
<b>Ctr-Alul</b>						
T/T - wt	27	27,2		4	3,6	
T/C	12	11,6	0,805 (0,061)	4	4,8	0,598 (0,278)
C/C	1	1,2		2	1,6	
<b>Vdr-BsmI</b>						
G/G - wt	14	17,6		2	3,0	
G/A	25	17,9	<b>0,012</b> <b>(6,324)</b>	7	5,0	0,190 (1,715)
A/A	1	4,6		1	2,0	
<b>Vdr-FokI</b>						
C/C - wt	25	21,6		5	4,9	
C/T	9	15,5	<b>0,008</b> <b>(7,019)</b>	4	4,2	0,880 (0,023)
T/T	6	2,8		1	0,9	
<b>Esr1-PvuII</b>						
T/T - wt	14	15,6		2	3,6	
T/C	22	18,8	0,273 (1,202)	8	4,8	<b>0,035</b> <b>(4,444)</b>
C/C	4	5,6		0	1,6	
<b>Esr1-XbaI</b>						
A/A - wt	18	18,9		6	6,4	
A/G	19	17,2	0,505 (0,445)	4	3,2	0,429 (0,625)
G/G	3	3,9		0	0,4	



## Χαρακτηριστικά δείγματος

Στην έρευνα συνολικά συμμετείχαν 40 κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία (ασθενείς) και 10 υγιή κορίτσια (μάρτυρες) ηλικίας από 12 έως 21 ετών.

Στον Πίνακα 15, παρουσιάζονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Η μέση ηλικία δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ( $p=0,099$ ) μεταξύ των ασθενών ( $15,8\pm 1,6$ ) και των μαρτύρων ( $14,8\pm 1,7$ ). Αντίθετα, στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων παρατηρήθηκαν ως προς τα υπόλοιπα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά.

Ειδικότερα, τα κορίτσια με ΨΑ, σε σχέση με τις μάρτυρες, είχαν σημαντικά μικρότερο δείκτη μάζας σώματος (BMI) ( $p<0,001$ ), μικρότερη οστική πυκνότητα σπονδυλικής στήλης (LBMD) ( $p=0,017$ ), μικρότερο Z-score οστικής πυκνότητας σπονδυλικής στήλης (LBMDZ-score) ( $p=0,002$ ), καθώς επίσης και μικρότερες κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στον ορό ( $E_2$ ) ( $p<0,001$ ).

Από τα συνολικά 40 κορίτσια με ΨΑ τα 8 (20%) είχαν τιμές συγκεντρώσεων  $E_2$  μεγαλύτερες των 30 pg/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των μαρτύρων ανέρχεται στο 90% (9/10) ( $p<0,001$ ).

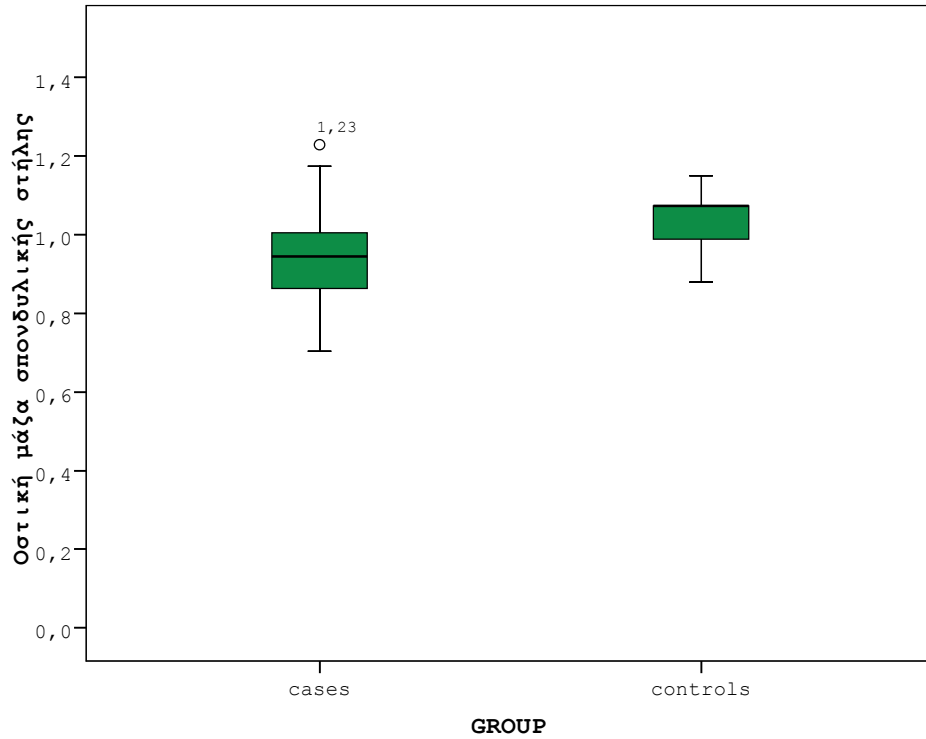
Τέλος, σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στους ασθενείς, σε σύγκριση με τις μάρτυρες, τόσο ως προς το LBMD Z-score (Z-score  $\leq -1$ ) ( $p<0,001$ ), όσο και ως προς την συχνότητα εμφάνισης αμηνόρροιας ( $p<0,001$ ).

**Πίνακας 15:** Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων

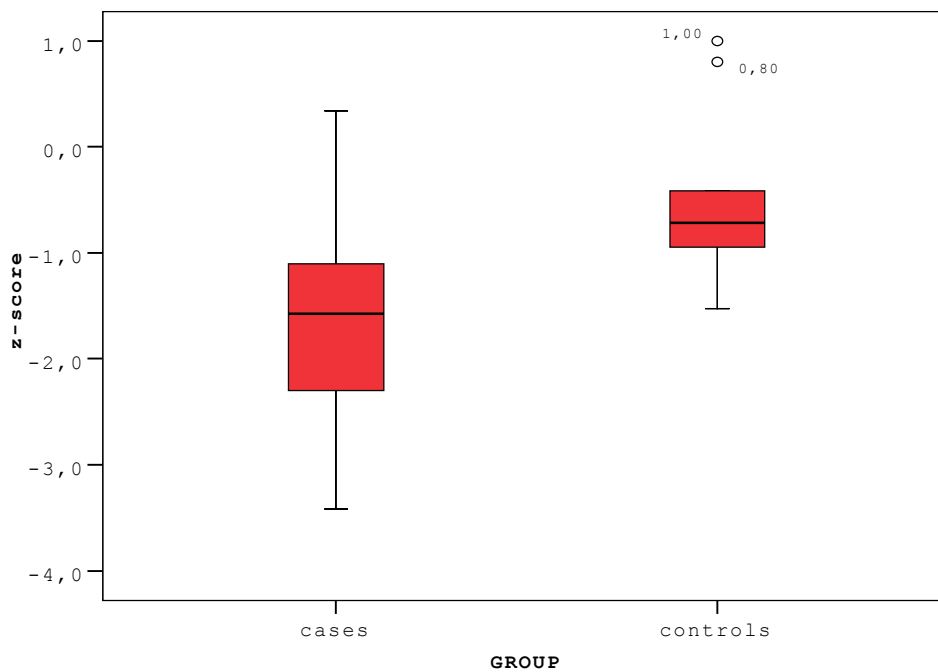
Χαρακτηριστικά		Ασθενείς (n=40)	Μάρτυρες (n=10)	p-value
Ηλικία (σε έτη)	Μέση τιμή (±τ.α.)	15,8 (±1,6)	14,8 (±1,7)	0,099*
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)	Μέση τιμή (±τ.α.)	16,25 (±1,41)	18,28 (±1,39)	<b>&lt;0,001*</b>
Οστική πυκνότητα σπονδυλικής στήλης(LBMD) gr/cm <sup>2</sup>	Μέση τιμή (±τ.α.)	0,94 (±0,12)	1,04 (±0,08)	<b>0,017*</b>
LBMD Z-score	Μέση τιμή (±τ.α.)	-1,58 (±0,92)	-0,51 (±0,82)	<b>0,002*</b>
Οιστραδιόλη (E <sub>2</sub> ) pg/mL	Διάμεσος (IQR)	16,80 (10,5- 26,4)	41,75 (33,0-54,0)	<0,001**
E <sub>2</sub> ≥30pg/mL	Συχνότητα (%)	8 (20%)	9 (90%)	<b>&lt;0,001***</b>
LBMD Z-score ≤ -1	Συχνότητα (%)	32 (80%)	2 (20%)	<b>&lt;0,001***</b>
Αμηνόρροια	Συχνότητα (%)	32 (80%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001***</b>

τ.α.: τυπική απόκλιση, IQR: ενδοτεταρτημοριακό εύρος

\*t-test\*\*Mann-Whitney test\*\*\*Fisher's exact test



**Γράφημα 1:** Σύγκριση της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD) μεταξύ ασθενών και μαρτύρων



**Γράφημα 2:** Σύγκριση του LBMD Z-score ασθενών και μαρτύρων

## Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων

Στον Πίνακα 16, παρουσιάζεται η κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων των έξι υπό μελέτη SNPs, διερευνώντας εάν υπάρχει γραμμική τάση μεταξύ αυτών και της ΨΑ.

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική γραμμική σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού AluI του υποδοχέα της Καλσιτονίνης (CTR) και της Ψυχογενούς Ανορεξίας ( $p=0,045$ ).

Το 67,5% (27/40) των ασθενών κοριτσιών έφερε το TT (wildtype) γονότυπο, το 30% τον ετεροζυγώτη TC και μόλις το 2,5% (1/40) έφερε τον μεταλλαγμένο CC σε ομοζυγωτία, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα υγιή κορίτσια ήταν 40%, 40% και 20%.

Δηλαδή, στις έφηβες με ΨΑ εντοπίζονται πιο συχνά οι wild type ομοζυγώτες (TT), σε σχέση με τα υγιή κορίτσια. Για τους υπόλοιπους 5 SNPs, δεν βρέθηκε να συσχετίζονται γραμμικά με τη νόσο.

**Πίνακας 16:** Κατανομή των γονοτύπων των SNPs σε ασθενείς και μάρτυρες

Γονότυποι	Ασθενείς (n=40)		Μάρτυρες (n=10)		p-value*
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
<b>COL1A1</b>					
G/G - wt	31	77,5	9	90	
G/T	7	17,5	1	10	0,516
T/T	2	5	0	0	
<b>Ctr-Alul</b>					
T/T - wt	27	67,5	4	40	
T/C	12	30	4	40	<b>0,045</b>
C/C	1	2,5	2	20	
<b>Vdr-BsmI</b>					
G/G - wt	14	35	2	20	
G/A	25	62,5	7	70	0,323
A/A	1	2,5	1	10	
<b>Vdr-FokI</b>					
C/C - wt	25	62,5	5	50	
C/T	9	22,5	4	40	0,812
T/T	6	15	1	10	
<b>Esr1-PvuII</b>					
T/T - wt	14	35	2	20	
T/C	22	55	8	80	0,999
C/C	4	10	0	0	
<b>Esr1-XbaI</b>					
A/A - wt	18	45	6	60	
A/G	19	47,5	4	40	
G/G	3	7,5	0	0	0,389

\*Chi-square test for trend

## Απλή λογιστική παλινδρόμηση πολυμορφισμών και Ψυχογενούς Ανορεξίας

Χρησιμοποιώντας την απλή λογιστική παλινδρόμηση, με επεξηγηματική (ανεξάρτητη) μεταβλητή τον κάθε μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό, εξετάζεται η συσχέτιση των γονοτύπων με την εμφάνιση της νόσου (εξαρτημένη μεταβλητή) έχοντας ως αναφορά σύγκρισης το μεταλλαγμένο γονότυπο.

Δεν βρέθηκε κάποιος SNP που να συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ασθένεια (όλα τα p-value >0,05).

Ωστόσο, υπάρχει ένδειξη ότι ο πολυμορφισμός AluI του υποδοχέα της CTR συνδέεται με την παρουσία της Ψυχογενούς Ανορεξίας (Πίνακας 17).

Οι φορείς του TT (wild type) γονότυπου, εμφανίζονται συχνότερα μεταξύ των νοσούντων από ΨΑ (OR=13,50, 95% ΔΕ: 0,98-185,45) σε σύγκριση με τα άτομα που φέρουν το μεταλλαγμένο (mutant) CC. Η σχέση οριακά δεν είναι στατιστικά σημαντική (p=0,052>0,05).

Επίσης, παρατηρούμε ότι και οι φορείς του ετερόζυγου TC, σε σχέση με τις ομόζυγες CC, παρουσιάζουν αυξημένη συσχέτιση με την Ψυχογενή Ανορεξία, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικό αυτό το αποτέλεσμα (OR=6,00, 95% ΔΕ: 0,42-85,25, p=0,186).

**Πίνακας 17:** Απλή λογιστική παλινδρόμηση του πολυμορφισμού AluI του υποδοχέα της Καλσιτονίνης και Ψυχογενούς Ανορεξίας

SNP	Ψυχογενής Ανορεξία		p-value*
	OR	95% ΔΕ	
TT - wt	13,50	0,98-185,45	0,052
T/C	6,00	0,42-85,25	0,186
CC	1,00	αναφορά	

\*Wald test

## Εκτίμηση του τρόπου κληρονομικότητας των γονοτύπων του Ctr -AluI στην πιθανή συσχέτιση με την Ψυχογενή Ανορεξία

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι γονότυποι του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού Ctr-AluI πιθανώς να συνδέονται με τη Ψυχογενή Ανορεξία αν και οριακά αυτή η σχέση απορρίπτεται. Ωστόσο, λόγω αυτής της οριακής απόρριψης θα ερευνηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας των γονοτύπων αυτού του πολυμορφισμού.

Σύμφωνα με τους Ζιντζαρά και Σάντος για να εκτιμηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας (mode of inheritance) στις γενετικές μελέτες χρειάζεται να υπολογιστεί ο βαθμός κυριαρχίας (degree of dominance ( $h$ )) μέσω του υπολογισμού της προσθετικής και της συγκυρίαρχης αντίθεσης [377].

Η συγκυρίαρχη αντίθεση (co-dominant contrast), ετερόζυγοι (TC) έναντι των δύο ομόζυγων (TT+CC), εκτιμήθηκε για να προσδιοριστεί η επίδραση του κινδύνου των ετερόζυγων (TC) μεταξύ των νοσούντων από Ψυχογενή Ανορεξία.

Από τον Πίνακα 18, διαπιστώνουμε ότι το συγκυρίαρχο μοντέλο δεν είναι στατιστικά σημαντικό καθώς η τιμή  $p$  είναι ίση με το 0,546, ενώ το προσθετικό (TT έναντι CC) οριακά δεν είναι στατιστικά σημαντικό ( $p=0,052>0,05$ ).

Αφού η συγκυρίαρχη αντίθεση δεν είναι σημαντική, τότε δεν υπάρχει κυριαρχία (no-dominance) στον τρόπο κληρονομικότητας.

Συνεπώς θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι ο όποιος κίνδυνος του ετεροζυγώτη (TC) στην εμφάνιση της νόσου, βρίσκεται στη μέση μεταξύ του κινδύνου των δύο ομοζυγωτών (wild type TT και mutant CC).

**Πίνακας 18:** Προσθετικό και συγκυρίαρχο μοντέλο του Ctr-AluI μεταξύ των νοσούντων εφήβων από Ψυχογενή Ανορεξία

Μοντέλο	SNP	Ψυχογενής Ανορεξία		p-value*
	CTR-AluI	OR	95% ΔΕ	
Προσθετικό	TT wt	13,50	0,98-185,45	0,052
	CC	1,00	αναφορά	
Συγκυρίαρχο	TC	0,64	0,15-2,70	0,546
	TT & CC	1,00	αναφορά	

\*Wald test

Τέλος, διερευνήθηκε, μόνο για τα 40 κορίτσια με νευρογενή ανορεξία, εάν η τιμή του LBMD Z-score, διέφερε μεταξύ των ομάδων γονοτύπων του πολυμορφισμού AluI του υποδοχέα της CTR, αλλά δεν καταδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0,301$ ).

Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι μόνο μια ασθενής έφερε το μεταλλαγμένο ομοζυγώτη CC.

### Κατανομή συχνοτήτων αλληλόμορφων

Στον Πίνακα 19, δίνεται η κατανομή συχνότητας των αλληλίων, των έξι υπό εξέταση SNPs των τεσσάρων υποδοχέων, σε ασθενείς και μάρτυρες.

Επίσης και στην ανάλυση κατά αλληλόμορφα, παρατηρούμε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση στη συχνότητα εμφάνισης του μονονουκλεοτιδικού



πολυμορφισμού A1a1 του υποδοχέα της καλσιτονίνης (CTR), μεταξύ των νοσούντων εφήβων από Ψυχογενή Ανορεξία ( $p=0,039$ ).

Το 82,5% των κοριτσιών που νοσούν φέρουν το T αλληλόμορφο, ενώ στα υγιή κορίτσια απαντάται σε ποσοστό 60%.

Ειδικότερα στις νοσούσες από Ψυχογενή Ανορεξία, οι φορείς του T αλληλίου απαντώνται σε σημαντικά αυξημένη συχνότητα, σε σύγκριση με τα άτομα που φέρουν το μεταλλαγμένο C αλληλόμορφο (OR=3.14, 95% ΔΕ:1,08-9,11).

Για τους υπόλοιπους πέντε SNPs δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην κατανομή συχνοτήτων των αλληλίων στις ασθενείς και τις μάρτυρες.

**Πίνακας 19:** Κατανομή αλληλόμορφων των SNPs σε ασθενείς και μάρτυρες

Αλληλίο	Ασθενείς (n=80)		Μάρτυρες (n=20)		OR	95% ΔΕ	p-value
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%			
	<b>COL1A1</b>						
G - wt	69	86,3	19	95	0,33	0,04-2,72	0,451**
T	11	13,8	1	5			
<b>Ctrl-AluI</b>							
T - wt	66	82,5	12	60	<b>3,14</b>	<b>1,08-9,11</b>	<b>0,039**</b>
C	14	17,5	8	40			
<b>Vdr-BsmI</b>							
G - wt	53	66,3	11	55	1,61	0,59-4,55	0,349*
A	27	33,8	9	45			
<b>Vdr-FokI</b>							
C - wt	59	73,8	14	70	1,20	0,41-3,54	0,735*
T	21	26,3	6	30			
<b>Esr1-PvuII</b>							
T - wt	50	62,5	12	60	1,11	0,41-3,03	0,837*
C	30	37,5	8	40			
<b>Esr1-XbaI</b>							
A - wt	55	68,8	16	80	0,55	0,17-1,81	0,321*
G	25	31,3	4	20			

\*Chi-square test \*\*Fisher's exact test

## **Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση πολυμορφισμών και Ψυχογενούς Ανορεξίας**

Στη συνέχεια της στατιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *stepwise*, για να εξεταστεί η πιθανή συσχέτιση των γονότυπων έξι πολυμορφισμών με την εμφάνιση της νόσου λαμβάνοντας υπόψη στο μοντέλο και τους συγχυτικούς παράγοντες ηλικία και δείκτη μάζας σώματος. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος Α, ο γονότυπος TT του πολυμορφισμού Ctr-AluI έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στις πάσχουσες από Ψυχογενή Ανορεξία σε σύγκριση με τη συχνότητα εμφάνισης του μεταλλαγμένου γονότυπου (CC), ανεξαρτήτως των υπολοίπων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, ηλικίας και δείκτη μάζας σώματος. Το μεγάλο διάστημα εμπιστοσύνης ( $\Delta E$ ) και το υψηλό *odd ratio* (OR) που καταγράφεται οφείλεται στην πολύ χαμηλή συχνότητα ορισμένων γονοτύπων αυτού του πολυμορφισμού.

## **Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση αλληλίων και Ψυχογενούς Ανορεξίας**

Επίσης, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *stepwise*, για να εξετασθεί η πιθανή συσχέτιση των αλληλόμορφων των υπό εξέταση SNPs με την επίπτωση της Ψυχογενούς Ανορεξίας, προσαρμόζοντας το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης για τους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες ηλικία και δείκτη μάζας σώματος. Τα άτομα που φέρουν το φυσιολογικό αλληλίο T του πολυμορφισμού Ctr-AluI έχουν αυξημένη συσχέτιση με τη νόσο σε σχέση με άτομα που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλίο C, ανεξαρτήτως των υπολοίπων αλληλίων των πολυμορφισμών, ηλικίας και δείκτη μάζας σώματος (Παράρτημα Α, Πίνακας 2).

## Ανάλυση ασθενών

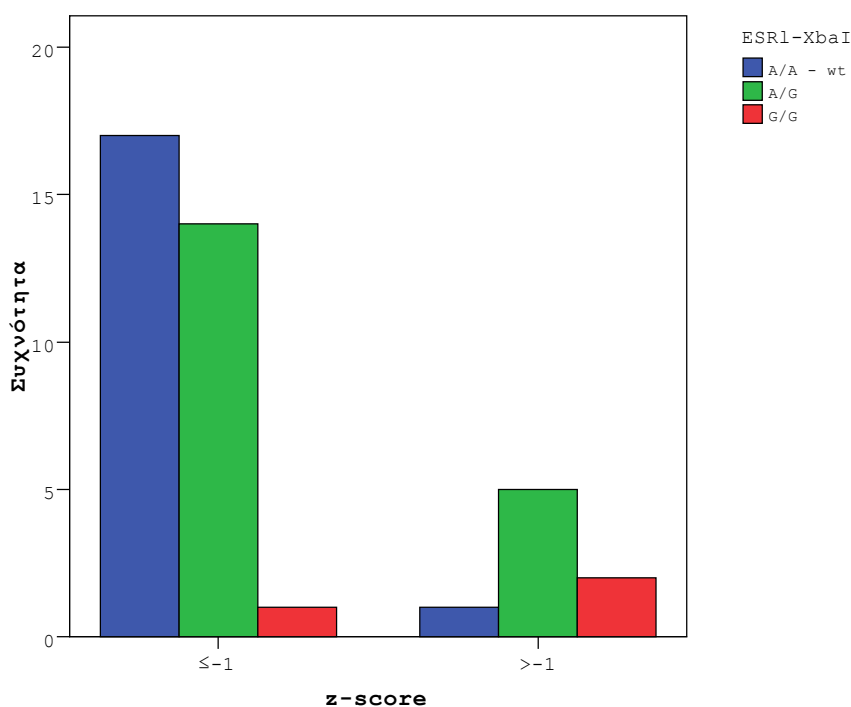
### Κατανομή συχνοτήτων των γονοτύπων των SNPs, σε σχέση με την τιμή του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών

Στη συνέχεια της ανάλυσης διερευνάται η σχέση μεταξύ SNPs και LBMD Z-score περιλαμβάνοντας στην ανάλυση μόνο τα 40 κορίτσια που απαρτίζουν την ομάδα των νοσούντων από Ψυχογενή Ανορεξία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 20, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει σημαντική γραμμική σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI του alpha οιστρογονικού υποδοχέα (Esr1) και της τιμής του LBMD Z-score ( $p=0,023$ ).

Από τις 32 ασθενείς με LBMD Z-score μικρότερο ή ίσο του -1, σε ποσοστό 53,1% (17 άτομα) έφεραν τον wild type (AA) γονότυπο, το 43,8% εμφάνιζαν ετεροζυγωτία AG και το 3,1% ήταν φορείς της ομόζυγης μετάλλαξης GG.

Για τις ασθενείς με LBMD Z-score μεγαλύτερο του -1, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 12,5%, 62,5% και 25%.



Γράφημα 3: Εμφάνιση της συχνότητας των πολυμορφισμών του Esr1-XbaI σε συσχέτιση με το LBMD Z-score των ασθενών

**Πίνακας 20:** Συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης των SNPs των μελετώμενων υποδοχέων και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών

SNP	LBMD Z-score ≤ -1 (n=32)		LBMD Z-score > -1 (n=8)		p-value*
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
<b>COL1A1</b>					
G/G - wt	24	75,0	7	87,5	0,519
G/T	6	18,8	1	12,5	
T/T	2	6,3	0	0,0	
<b>Ctr-AluI</b>					
T/T - wt	20	62,5	7	87,5	0,275
T/C	11	34,4	1	12,5	
C/C	1	3,1	0	0,0	
<b>Vdr-BsmI</b>					
G/G - wt	11	34,4	3	37,5	0,999
G/A	20	62,5	5	62,5	
A/A	1	3,1	0	0,0	
<b>Vdr-FokI</b>					
C/C - wt	21	65,6	4	50	0,796
C/T	6	18,8	3	37,5	
T/T	5	15,6	1	12,5	
<b>Esr1-PvuII</b>					
T/T - wt	12	37,5	2	25,0	0,346
T/C	18	56,3	4	50,0	
C/C	2	6,3	2	25,0	
<b>Esr1-XbaI</b>					
A/A - wt	17	53,1	1	12,5	<b>0,023</b>
A/G	14	43,8	5	62,5	
G/G	1	3,1	2	25,0	

\* Chi-square (exact) test for trend

## **Απλή λογιστική παλινδρόμηση της συχνότητας εμφάνισης των SNPs των υπό εξέταση υποδοχέων και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών**

Χρησιμοποιώντας την απλή λογιστική παλινδρόμηση, με επεξηγηματική (ανεξάρτητη) μεταβλητή τον γονότυπο κάθε SNP των τεσσάρων υπό μελέτη υποδοχέων, εξετάζεται η επίδραση των γονοτύπων των SNPs στην τιμή του LBMD Z-score (εξαρτημένη μεταβλητή), έχοντας ως αναφορά σύγκρισης το μεταλλαγμένο (mutant) γονότυπο του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού.

Το LBMD Z-score διχοτομήθηκε στις κατηγορίες μικρότερο ή ίσο του -1 (Z-score  $\leq$ -1) και μεγαλύτερο του -1 ( Z-score > -1).

Μόνο ο Esr1-XbaI βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με την τιμή του LBMD Z-score ( $p=0,027$ ).

Οι ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία που φέρουν τον wild type (AA) γονότυπο του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI για τον Esr1 υποδοχέα, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να έχουν LBMD Z-score μικρότερο του -1 σε σύγκριση με τις ασθενείς που έχουν τον μεταλλαγμένο (mutant) GG (OR=34,00, 95% CI: 1,48-781,79).

Επίσης, παρατηρούμε ότι και οι ασθενείς με ετεροζυγωτία (AG), σε σχέση με τις ασθενείς ομοζυγώτριες GG, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ελαττωμένης τιμής του LBMD Z-score, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντικό αυτό το αποτέλεσμα (OR=5.60, 95% ΔΕ: 0,41-76,05,  $p=0,196$ ).

Οι τιμές των odds ratios (34,00 και 5,60) υποδηλώνουν ότι υφίσταται ένα μοντέλο γονιδιακής δοσολογίας, με τις φυσιολογικές ομοζυγώτριες (AA) να έχουν αρκετά μεγαλύτερο κίνδυνο σε σύγκριση με τις ετεροζυγώτριες (AG).

**Πίνακας 21:** Απλή λογιστική παλινδρόμηση του Esr1-XbaI και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών

Πολυμορφισμός	z-score $\leq$ -1		p-value*
	ESR1-XbaI	OR	
AA - wt	34,00	1,48-781,79	<b>0,027</b>
A/G	5,60	0,41-76,05	0,196
GG	1,00	αναφορά	

\*Wald test

**Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των SNPs των υποδοχέων και της τιμής του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών**

Στη συνέχεια της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο stepwise, για να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση των SNPs των υποδοχέων στην τιμή του LBMD Z-score, λαμβάνοντας υπόψη στο μοντέλο και τους συγχυτικούς παράγοντες της ηλικίας και του δείκτη μάζας σώματος (BMI).

Ο wild type (AA) γονότυπος του Esr1-XbaI έχει ακόμη σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση ελαττωμένων τιμών του LBMD Z-score, σε σχέση με το μεταλλαγμένο (mutant /GG) γονότυπο (OR=24,79, 95% ΔΕ: 1,01-606,08), ανεξαρτήτως των υπολοίπων SNPs, ηλικίας και BMI (Πίνακας 22).

**Πίνακας 22:** Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των γονοτύπων του Esr1-XbaI και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών

Πολυμορφισμός	z-score $\leq$ -1		p-value*
	ESRI-XbaI	OR	
AA - wt	24,79	1,01-606,08	<b>0,049</b>
A/G	2,85	0,18-44,49	0,455
GG	1,00	αναφορά	

Προσαρμοσμένο για την ηλικία και το δείκτη μάζας σώματος \*Wald test

**Εκτίμηση του τρόπου κληρονομικότητας των γονοτύπων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του υποδοχέα Esr1 και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών**

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι οι γονότυποι του Esr1-XbaI επιδρούν στο Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD) ωστόσο θα ήταν χρήσιμο να εκτιμηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για να εκτιμηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας (mode of inheritance) στις γενετικές μελέτες χρειάζεται να υπολογιστεί ο βαθμός κυριαρχίας (degree of dominance (*h*)) μέσω του υπολογισμού της προσθετικής και της συγκυρίαρχης αντίθεσης.

Η συγκυρίαρχη αντίθεση (co-dominant contrast), ετερόζυγες (AG) έναντι των δύο ομόζυγων (AA+GG), εκτιμήθηκε για να προσδιοριστεί η επίδραση του κινδύνου των ετεροζυγωτριών (AG) στην εμφάνιση ελαττωμένης τιμής του LBMD Z-score.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 23, το συγκυρίαρχο μοντέλο δεν είναι στατιστικά σημαντικό, καθώς η τιμή  $p=0,348$  είναι μεγαλύτερη του 0,05, ενώ το προσθετικό μοντέλο (AA έναντι GG) είναι σημαντικό ( $p=0,027 < 0,05$ ).



Αφού η συγκυρίαρχη αντίθεση δεν είναι σημαντική τότε δεν υπάρχει κυριαρχία (no-dominance) στον τρόπο κληρονομικότητας. Συνεπώς θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι ο κίνδυνος του ετεροζυγώτη (AG) να έχει ελαττωμένο LBMD Z-score, βρίσκεται στη μέση μεταξύ του κινδύνου του «επιβαρυντικού» ομοζυγώτη AA και του «προστατευτικού» ομοζυγώτη GG.

**Πίνακας 23:** Προσθετικό και συγκυρίαρχο μοντέλο της επίδρασης των γονοτύπων του Esr1-XbaI στην τιμή του LBMD Z-score

Μοντέλο	Πολυμορφισμό		z-score ≤ -1	p-value*
	ς			
	Esr1-XbaI	OR	95% ΔΕ	
Προσθετικό	AA-wt	34,00	1,48-781,79	<b>0,027</b>
	GG	1,00	αναφορά	
Συγκυρίαρχο	AG	0,47	0,09-2,29	0,348
	AA & GG	1,00	αναφορά	

\*Wald test

**Κατανομή συχνοτήτων των αλληλόμορφων των SNPs των υπό εξέταση υποδοχέων, σε σχέση με την τιμή του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών**

Στον Πίνακα 24, δίνεται η κατανομή συχνοτήτων των αλληλίων και των έξι SNPs των τεσσάρων υποδοχέων στις δύο κατηγορίες του LBMD Z-score.

Παρατηρούμε ότι και στην ανάλυση κατά αλληλόμορφα, υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ του Esr1-XbaI και του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score) ( $p=0,016$ ).

Το 75% των κοριτσιών που είχαν LBMD Z-score ≤-1 φέρουν το wild type (A) αλληλίο, ενώ στις ασθενείς με LBMD Z-score >-1 το αντίστοιχο ποσοστό εμφάνισής του, είναι 43,8%.

Οι ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία που φέρουν το A αλληλίο παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να έχουν ελαττωμένη τιμή του LBMD Z-score ( $\leq -1$ ), σε σύγκριση με τους φορείς της μετάλλαξης G (OR=3,86, 95% ΔΕ: 1,24-12,04). Για τους υπόλοιπους πέντε SNPs των 4 υποδοχέων, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην κατανομή συχνοτήτων των αλληλόμορφων στις δυο ομάδες του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score).

**Πίνακας 24:** Κατανομή συχνοτήτων των αλληλόμορφων των SNPs σε σχέση με την τιμή του LBMD Z-score στην ομάδα των ασθενών

Αλληλίο	Οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης (LBMD)				OR	95% ΔΕ	p-value
	Z-score ≤ -1 (n=64)		Z-score > -1 (n=16)				
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%			
<b>COL1A1</b>							
G - wt	54	84,4	15	93,8	0,36	0,04-3,04	0,448**
T	10	15,6	1	6,3			
<b>Ctrl-Alul</b>							
T - wt	51	79,7	15	93,8	0,26	0,03-2,17	0,280**
C	13	20,3	1	6,3			
<b>Vdr-BsmI</b>							
G - wt	42	65,6	11	68,8	0,87	0,27-2,81	0,813*
A	22	34,4	5	31,3			
<b>Vdr-FokI</b>							
C - wt	48	75	11	68,8	1,36	0,41-4,52	0,751**
T	16	25	5	31,3			
<b>Esr1-PvuII</b>							
T - wt	42	65,6	8	50,0	1,91	0,63-5,78	0,248*
C	22	34,4	8	50,0			
<b>Esr1-XbaI</b>							
A - wt	48	75,0	7	43,8	3,86	1,24-12,04	<b>0,016*</b>
G	16	25,0	9	56,3			

\*Chi-square test\*\*Fisher's exact test

## Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των αλληλόμορφων των SNPs και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών

Επίσης, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο stepwise, για να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των τεσσάρων υποδοχέων, στην τιμή του Z-score που αφορά την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score), προσαρμόζοντας το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης στους συγχυτικούς παράγοντες, ηλικία και δείκτη μάζας σώματος.

Οι ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία που φέρουν το A(wt) αλληλίο του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του Esr1 υποδοχέα, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο για μειωμένη τιμή του LBMD Z-score, σε σχέση με τις ασθενείς που έχουν τη μετάλλαξη G (OR=4,12, 95% ΔΕ: 1,23-13,85, p=0,022), ανεξαρτήτως των υπολοίπων SNPs, της ηλικίας και του δείκτη μάζας σώματος (Πίν.25)

**Πίνακας 25:** Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των αλληλίων του Esr1-XbaI και της τιμής του LBMD Z-score για την ομάδα των ασθενών

Αλληλίο	z-score ≤ -1		p-value*
	OR	95% ΔΕ	
Esrl-XbaI			
A-wt	4,12	1,23-13,85	<b>0,022</b>
G	1,00	αναφορά	

Προσαρμοσμένο για την ηλικία και το δείκτη μάζας σώματος

\*Wald test

## **Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ( SNPs) των μελετώμενων υποδοχέων σε συσχέτιση με την αμηνόρροια**

Στον Πίνακα 26 εξετάζεται εάν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των έξι μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και της αμηνόρροιας στα κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία.

Όπως παρατηρούμε, κανένας SNP δεν φαίνεται να συσχετίζεται σημαντικά με την αμηνόρροια (όλα τα  $p$  value  $>0,05$ ).

**Πίνακας 26:** Γραμμική συσχέτιση των SNPs με την αμηνόρροια στις έφηβες με ΨΑ

SNP	Αμηνόρροια				p-value*
	Ναι (n=32)		Όχι (n=8)		
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
<b>COL1A1</b>					
G/G - wt	25	78,1	6	75	0,731
G/T	6	18,8	1	12,5	
T/T	1	3,1	1	12,5	
<b>Ctrl-AluI</b>					
T/T - wt	22	68,8	5	62,5	0,999
T/C	9	28,1	3	37,5	
C/C	1	3,1	0	0,0	
<b>Vdr-BsmI</b>					
G/G - wt	11	34,4	3	37,5	0,999
G/A	20	62,5	5	62,5	
A/A	1	3,1	0	0,0	
<b>Vdr-FokI</b>					
C/C - wt	20	62,5	5	62,5	0,796
C/T	8	25	1	12,5	
T/T	4	12,5	2	25	
<b>Esr1-PvuII</b>					
T/T - wt	12	37,5	2	25,0	0,346
T/C	18	56,3	4	50,0	
C/C	2	6,3	2	25,0	
<b>Esr1-XbaI</b>					
A/A - wt	13	40,6	5	62,5	0,755
A/G	17	53,1	2	25,0	
G/G	2	6,3	1	12,5	

\*Linear-by-linear association exact test (Exact Chi-square test for trend)

## **Έλεγχος της συσχέτισης των SNPs των εξεταζόμενων υποδοχέων και τιμής του LBMD Z-score στις ασθενείς με αμηνόρροια**

Επίσης, διερευνήθηκε εάν υπάρχει γραμμική τάση μεταξύ των SNPs και της ελαττωμένης τιμής του Z-score για την οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score  $\leq -1$ ), στην ομάδα των εφήβων που πάσχουν από Ψυχογενή Ανορεξία και είναι αμηνορροϊκές (n=32).

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 27 συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει σημαντική γραμμική σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και της τιμής του LBMD Z-score.

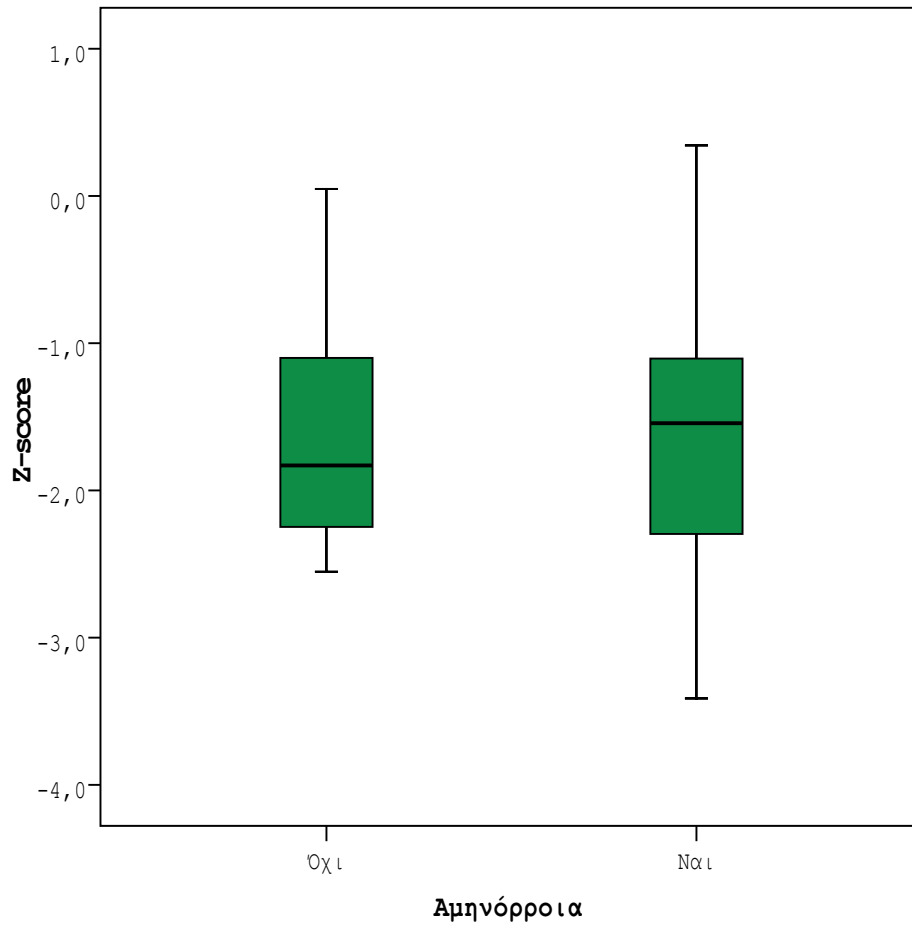
Επίσης, μεταξύ των εφήβων κοριτσιών με Ψυχογενή Ανορεξία, ελέγχθηκε εάν υπάρχει σχέση μεταξύ αμηνόρροιας και της τιμής του LBMD Z-score.

Και ακόμη, εξετάστηκε η πιθανή σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης στον ορό των ασθενών και των τιμών του LBMD Z-score.

Και στις δυο αναλύσεις δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας.

Ωστόσο, διερευνώντας την σχέση ανάμεσα σε αμηνόρροια και κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης, βρέθηκε ότι η μεταξύ τους σχέση είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ ).

Στις ασθενείς με αμηνόρροια το 93,8% (30/32) είχαν συγκεντρώσεις οιστραδιόλης μικρότερες των 30pg/ml, ενώ στις ευμηνορροϊκές ασθενείς μόνο το 25% (2/8) αυτών είχαν τιμές μικρότερες των 30 pg/ml.



**Γράφημα 4:** Σύγκριση του LBMD Z-score μεταξύ των εφήβων ασθενών που εμφάνιζαν αμηνόρροια ή φυσιολογική εμμηνορρυσία



**Πίνακας 27:** Συσχέτιση των μελετώμενων SNPs και του LBMD Z-score στις αμηνορροϊκές έφηβες ασθενείς

SNP	LBMD				p-value*
	Z-score ≤ -1 (n=26)		Z-score > -1 (n=6)		
	Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
<b>COL1A1</b>					
G/G - wt	20	76,9	5	83,3	
G/T	5	19,2	1	16,7	0,999
T/T	1	3,8	0	0	
<b>Ctrl-AluI</b>					
T/T- wt	17	65,4	5	83,3	
T/C	8	30,8	1	16,7	0,465
T/C	1	3,8	0	0	
<b>Vdr-BsmI</b>					
G/G - wt	8	30,8	3	50	
G/A	17	65,4	3	50	0,414
A/A	1	3,8	0	0	
<b>Vdr-FokI</b>					
C/C - wt	17	65,4	3	50	
C/T	6	23,1	2	33,3	0,758
T/T	3	11,5	1	16,7	
<b>Esr1-PvuII</b>					
T/T - wt	10	38,5	2	33,3	
T/C	15	57,7	3	50	0,702
C/C	1	3,8	1	16,7	
<b>Esr1-XbaI</b>					
A/A - wt	12	46,2	1	16,7	
A/G	13	50	4	66,7	0,146
G/G	1	3,8	1	16,7	

\* Chi-square (exact) test for trend

**Συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και τιμών του LBMD Z-score, σε συσχέτιση με τη συχνότητα των παρατηρούμενων γονότυπων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του Esr1 υποδοχέα, στην ομάδα των ασθενών**

Στις έφηβες πάσχουσες από Ψυχογενή Ανορεξία, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ των κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score), ξεχωριστά για κάθε παρατηρούμενη ομάδα γονοτύπου του πολυμορφισμού XbaI του οιστρογονικού υποδοχέα 1 (Esr1).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 28, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των τιμών της οιστραδιόλης και των μειωμένων τιμών του LBMD Z-score σε καμία από τις ομάδες γονοτύπων.

Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα είναι αρκετά μικρό και στις τρεις αναλύσεις και, ιδιαίτερα, στην ανάλυση για τους φορείς του μεταλλαγμένου (mutant) GG γονότυπου.

**Πίνακας 28:** Συσχέτιση του LBMD Z-score με την τιμή των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης στον ορό των ασθενών με ΨΑ, για κάθε ομάδα γονοτύπου του Esr1-Xbal

Esr1-Xbal	Οιστραδιόλη (pg/ml)	LBMD				p-value*
		Z-score ≤ -1		Z score > -1		
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
A/A - wt	≥30	6	35,3	0	0	0,999
	<30	11	64,7	1	100	
	Σύνολο	17	100	1	100	
A/G	≥30	0	0	1	20	0,263
	<30	14	100	4	80	
	Σύνολο	14	100	5	100	
G/G	≥30	0	0	1	50	0,999
	<30	1	100	1	50	
	Σύνολο	1	100	2	100	

\*Fisher's exact test

**Συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και τιμών του LBMD Z-score, σε συσχέτιση με την παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλόμορφων του Esr1-XbaI SNP, στην ομάδα των ασθενών**

Στη συνέχεια της ανάλυσης εξετάζεται η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και των τιμών του LBMD Z-score, στα κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία, ξεχωριστά ανά αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό XbaI του Esr1 υποδοχέα .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 29, δεν υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και του παρατηρούμενου μειωμένου LBMD Z-score, στις ασθενείς που φέρουν το μη μεταλλαγμένο (wild type/ A) αλληλίο ( $p=0,999$ ).

Αντίθετα παρατηρούμε ότι οι τιμές της οιστραδιόλης σχετίζονται σημαντικά με ελαττωμένες τιμές του LBMD Z-score, για τις ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ( $p=0,037$ ).

Οι έφηβες ασθενείς που φέρουν το G αλληλίο και έχουν στον ορό συγκεντρώσεις οιστραδιόλης ίσες ή μεγαλύτερες των 30pg/mL παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο να έχουν χαμηλό LBMD Z-score ( $\leq -1$ ).

Όλα τα κορίτσια (100%) με LBMD Z-score  $\leq -1$  είχαν κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης μικρότερες των 30 pg/mL, ενώ το 66,7% των ασθενών με LBMD Z-score  $> -1$ , είχαν συγκέντρωση οιστραδιόλης μικρότερη των 30pg/mL.

**Πίνακας 29:** Συσχέτιση του LBMD Z-score με τις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στον ορό των ασθενών με ΨΑ σε κάθε ομάδα αλληλόμορφων για τον Esr1-Xbal

Esr1-Xbal	Οιστραδιόλη (pg/mL)	LBMD				p-value*
		z-score ≤ -1		z-score > -1		
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
A - wt	≥30	12	25	1	14,3	0,999
	<30	36	75	6	85,7	
	Σύνολο	48	100	7	100	
G - mt	≥30	0	0	3	33,3	<b>0,037</b>
	<30	16	100	6	66,7	
	Σύνολο	16	100	9	100	

\*Fisher's exact test



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σ' αυτή μελέτη έλαβαν μέρος 40 έφηβες με Ψυχογενή Ανορεξία και 10 υγιή κορίτσια ως ομάδα ελέγχου και αναλύθηκαν έξι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στον οστικό μεταβολισμό. Απ' όσο γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που μελετώνται αυτοί οι πολυμορφισμοί σε έφηβες με Ψυχογενή Ανορεξία.

Βρέθηκε ότι μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, η κατανομή του πολυμορφισμού CTR-AluI διέφερε σημαντικά, με το 67.5% των νοσούντων να φέρει τον TT (wt) γονότυπο σε σύγκριση με το 40% των υγιών.

Η Καλσιτονίνη δρα διαμέσου υποδοχέων που εκφράζονται στις κυτταρικές μεμβράνες αρκετών οργάνων - στόχων. Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (CTR), είναι μια επταδιαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην τάξη II της οικογένειας των υποδοχέων στους οποίους δεσμεύονται οι G-πρωτεΐνες (Seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor superfamily, GPCR). Σ' αυτή την οικογένεια ανήκουν επίσης οι υποδοχείς της Παραθορμόνης (PTH) και του σχετιζόμενου με την Παραθορμόνη πεπτιδίου (PTHrP), του αγγειοδραστικού εντερικού πολυπεπτιδίου (VIP), του πολυπεπτιδίου ενεργοποίησης της υποφυσιακής αδενυλικής κυκλάσης (PACAP), της γλυκαγόνης, της σεκρετίνης, της ορμόνης έκκρισης της αυξητικής (GHRH), του παράγοντα αποδέσμευσης της κορτικοτροπίνης (CTR-releasing Factor), και του γαστρικού ανασταλτικού πολυπεπτιδίου (GIP) [378]. Ο υποδοχέας της καλσιτονίνης (CTR), όπως και ο υποδοχέας calcitonin receptor-like receptor (CL), ελέγχεται από πρωτεΐνες (συνεργές) που ρυθμίζουν την ενεργότητα και τον τρόπο δράσης τους (receptor activity modifying proteins-RAMP) [173,177]. Η καλσιτονίνη μπορεί και συνδέεται με τον υποδοχέα της και χωρίς την παρεμβολή των RAMPs. Παρόλα αυτά αν συνδεθεί μαζί τους επιτυγχάνεται η διαμόρφωση διαφόρων τύπων υποδοχέων που έχουν υψηλή συγγένεια με την αμυλίνη [173].

Στην περιφέρεια ο υποδοχέας συμμετέχει στην οστική αναδιαμόρφωση και στην απέκκριση των ιόντων ασβεστίου από τους νεφρούς [379,380], ενώ στο Κεντρικό

Νευρικό Σύστημα, μεσολαβεί στην καταστολή της όρεξης, και στην τροποποίηση της ορμονικής έκκρισης, της συμπεριφοράς και της αντίληψης του πόνου [381].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η καλσιτονίνη λειτουργεί σαν αναστολέας της οστικής απορρόφησης όταν συντρέχουν συνθήκες αυξημένων αναγκών σε ασβέστιο (calcium stress) και πράγματι αυξημένα επίπεδά της έχουν αναφερθεί στην κύηση και τη γαλουχία [378].

Επίσης, η καλσιτονίνη προκαλεί αίσθημα κορεσμού στα θηλαστικά (calcitonin-induced anorexia) αλλά ο μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλείται αυτή η δράση δεν είναι πλήρως γνωστός [155,381].

Αλλά, και η αμυλίνη επάγει το αίσθημα του κορεσμού και φαίνεται ότι αλληλεπιδρά, πιθανά στο στέλεχος, και με άλλους πρωτεϊνικούς διαβιβαστές που εμπλέκονται στον έλεγχο της πρόσληψης τροφής, όπως η χολοκυστοκίνη, το ομοιάζον με τη γλυκαγόνη πεπτίδιο 1 (glucagon-like peptide 1), και το πεπτίδιο ΥΥ [382]. Η πειραματική έγχυση 2μgr αμυλίνης στον υποθάλαμο επίμυων προκαλεί ανορεξία διάρκειας 8 ωρών [383]. Η δράση της ρυθμίζεται μέσω των υποδοχέων της. Φαίνεται να υπάρχουν τουλάχιστον 3 σύμπλοκα υποδοχέα που δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια με την αμυλίνη. Και τα τρία περιέχουν τον υποδοχέα καλσιτονίνης στον πυρήνα και μία από τις τρεις τροποποιητικές της δραστηριότητας του υποδοχέα πρωτεΐνες RAMP 1, RAMP 2, RAMP 3 [384]. Τόσο η καλσιτονίνη όσο και η αμυλίνη, έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα επίμυων και φαίνεται ότι και οι δύο εμπλέκονται στην ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Η ενδοφλέβια χορήγηση αμυλίνης σε νεαρούς επίμυες και κονίκλους προκαλεί υπασβεστιαϊμία, οφειλόμενη σε σημαντική ελάττωση της οστικής απορρόφησης από τους οστεοκύτταρα. Αναστέλλει άμεσα την απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών κατά τρόπο ανάλογο της καλσιτονίνης [385]. Η ανασταλτική της δράση στην απορρόφηση του ασβεστίου από τα οστά, ίσως οφείλεται και στο γεγονός ότι η αμυλίνη, η καλσιτονίνη και το CGRP εμφανίζουν ομοιότητες στην αλληλουχία των αμινοξέων. Το μόριο της αμυλίνης και της Καλσιτονίνης εμφανίζουν 20 % ομολογία, ενώ της αμυλίνης και του CGRP 44% [386]. Τα τρία πεπτίδια παρουσιάζουν την εξής σειρά βιολογικής ισχύος σε ότι αφορά τη δράση τους στους οστεοκλάστες: Καλσιτονίνη ≥ Αμυλίνη > CGRP [387]. Σε κυτταρικές



in vitro καλλιέργειες, υποδεικνύεται ότι η αμυλίνη θα μπορούσε να επηρεάσει την οστική διαμόρφωση και απορρόφηση, μετά την σύνδεσή της με τον υποδοχέα της Καλσιτονίνης [388]. Από πειραματικά μοντέλα και πάλι, σε ωθηκεκτομηθέντες επίμυες, παρατηρήθηκε ότι η ανεπάρκεια αμυλίνης οδηγεί σε αυξημένη οστική απορρόφηση. Όμως τα ωθηκεκτομηθέντα (wt) CT/a-CGRP <sup>-/-</sup> ποντίκια, αν και εμφανίζουν ελαττωμένο όγκο οστών, παραδόξως δεν εμφανίζουν αύξηση στον αριθμό των οστεοκλαστών όπως συνήθως συμβαίνει στα άλλα που δεν φέρουν αυτό το γονότυπο [378].

Ακόμη, η αμυλίνη μαζί με την αδρενομοδουλίνη και τον IGF-1 αποτελούν διαδραστικούς παράγοντες του συστήματος της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης [389]. Δρουν στα οστεοβλαστικά κύτταρα με προσθετικό τρόπο. Ο αποκλεισμός των υποδοχέων του IGF-1 αναστέλλει τη δράση των άλλων δύο παραγόντων, αλλά αν εξουδετερωθεί ο IGF-1 και οι υποδοχείς του παραμείνουν ελεύθεροι δεν απενεργοποιείται η δράση της αμυλίνης και της αδρενομοδουλίνης [389].

Η συγκέντρωση αμυλίνης στον ορό των γυναικών που πάσχουν από ΨΑ, λόγω της υποθρεψίας, είναι ελαττωμένη. Τα επίπεδα της αμυλίνης νήστεως συσχετίζονται ευθέως ανάλογα με την οστική πυκνότητα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ελαττωμένη έκκριση αμυλίνης ίσως αποτελεί ένα μηχανισμό με αρνητική δράση στα οστά αυτών των ασθενών [390].

Μια μελέτη σε περί- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από την Κάτω Ιταλία συσχέτισε τον CC γονότυπο με ελαττωμένη οστική πυκνότητα, στα οστά της σπονδυλικής στήλης και τη νεαρότερη ηλικία εμφάνισης οστικής νόσου. Σύμφωνα με τους συγγραφείς το αποτέλεσμα υποδηλώνει την πιθανότητα μεγαλύτερης επίδραση του πολυμορφισμού AluI του CTR στην απόκτηση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας [186].

Τα επίπεδα των κυκλοφορουσών συγκεντρώσεων της Καλσιτονίνης στον ορό των ασθενών με Ψυχογενή Ανορεξία είναι φυσιολογικά [391-393], ενώ της αμυλίνης και του IGF-1 ελαττωμένα. Ο υποδοχέας της, από τον οποίο ρυθμίζεται η δράση της [394], εμπλέκεται σε διάφορους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και μονοπάτια του οστικού μεταβολισμού, είτε αυτόνομα είτε μέσω υψηλής συγγένειας με τους υποδοχείς άλλων ορμονικών πεπτιδίων και υπάρχει

τουλάχιστον μία μελέτη σε καυκάσιες γυναίκες της Μεσογείου όπου ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός AluI, πιθανά επιδρά στην διαμόρφωση της κορυφαίας οστικής πυκνότητας. Θα ήταν ίσως αναμενόμενο η παρατηρούμενη διαφορετική συχνότητα κατανομής των γονοτύπων του CTR-AluI στην Ψυχογενή Ανορεξία, να σχετίζεται με διαφορές στην οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης μεταξύ των ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη, αν και οι ασθενείς με Ψυχογενή Ανορεξία ήταν πιο πιθανό να έχουν τον μη μεταλλαγμένο γονότυπο του πολυμορφισμού AluI του υποδοχέα, σε σύγκριση με τις υγιείς έφηβες της ομάδας ελέγχου, εντούτοις στην ομάδα των ασθενών δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων του CTR-AluI και της τιμής του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης (LBMD Z-score).

Όπως προαναφέρθηκε η καλσιτονίνη συσχετίζεται με επαγωγή ανορεκτικού φαινομένου. Το ίδιο και η αμυλίνη ο υποδοχέας της οποίας περιέχει τον υποδοχέα της καλσιτονίνης στον πυρήνα. Για τον υποδοχέα της καλσιτονίνης είναι γνωστό ότι εντοπίζεται εκτός των άλλων θέσεων του και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Πάντως οι περιοχές που συνδέεται στον εγκέφαλο, φαίνεται να συσχετίζονται με επαγόμενες από την καλσιτονίνη συμπεριφορές, μη σχετικές με την πρόσληψη τροφής [152]. Από την άλλη η επίδραση της αμυλίνης στο αίσθημα κορεσμού πιστεύεται ότι γίνεται μέσω άμεσης δράσης, με σύνδεση στους υποδοχείς της στην οπίσθια περιοχή (area postrema). Οι ενεργοποιημένοι νευρώνες αυτής της περιοχής πιστεύεται ότι είναι νοραδρενεργικοί. Οι κεντρικοί οδοί μετάδοσης του σήματος περιλαμβάνουν σημαντικές συνδέσεις αυτών των νευρώνων με τον τελικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού (nucleus of the solitary tract) και τον πλάγιο παραβραγχιακό πυρήνα στη γέφυρα (lateral parabrachial nucleus). Η αμυλίνη αλληλεπιδρά επίσης με το σήμα της λεπτίνης σε επίπεδο υποθαλάμου. Τέλος στο στέλεχος αλληλεπιδρά με σήματα που εμπλέκονται στον βραχυπρόθεσμο έλεγχο της πρόσληψης τροφής και που προέρχονται από τη χολοκυστοκινίνη, το PYY και το glucagon-like peptide 1 [382]. Είναι επίσης γνωστή η αλληλεπίδραση μεταξύ νοραδρενεργικού και οπιοειδούς συστήματος στο Κεντρικό Νευρικό [395]. Η αυξημένη συχνότητα του T αλληλόμορφου του CTR-AluI στις έφηβες πάσχουσες από Ψυχογενή Ανορεξία, σε σχέση με το

γενικό υγιή πληθυσμό και καθώς είναι ένα εύρημα απομονωμένο από τις μεταβολές της οστικής πυκνότητας, μας δημιουργεί ερωτηματικά για το ενδεχόμενο να υποκρύπτεται κάποια σύνδεση με την ασθένεια. Φαίνεται να είναι ένα σημαντικό εύρημα, το οποίο όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Επίσης, παρότι η κατανομή των γονοτύπων του *Esr1-XbaI* δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των υγιών εφήβων και των ανορεκτικών, οι ασθενείς που φέρουν τον “άγριο” γονότυπο (AA) φαίνεται ότι έχουν υψηλότερο κίνδυνο μειωμένου LBMD Z-score, υποδεικνύοντας πιθανή οστεοπενία ή οστεοπόρωση, σε σύγκριση με αυτές που φέρουν το μεταλλαγμένο (GG) γονότυπο. Αλλά και οι ετεροζυγώτριες (AG), αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό το αποτέλεσμα, φάνηκε να έχουν αυξημένο κίνδυνο για μειωμένη τιμή του LBMD Z-score, σε σύγκριση με τις GG ομοζυγώτριες. Λαμβάνοντας υπόψη ότι αφενός δεν υπάρχει κυριαρχία στον τρόπο κληρονομικότητας, και αφετέρου τις αναλογίες πιθανοτήτων (odds ratios) ενδέχεται να υφίσταται ένα μοντέλο γονιδιακής δοσολογίας που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης οστικής βλάβης.

Στην ανάλυση κατά αλληλόμορφα, εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *Esr1-XbaI* και του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης, με τις ασθενείς που φέρουν το A αλληλίο να παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να έχουν ελαττωμένο LBMD Z-score. Η μελέτη των αλληλόμορφων ουσιαστικά επιβεβαιώνει την επιβαρυντική παρουσία του A αλληλίου στην ανάπτυξη οστεοπενίας ή οστεοπόρωσης στη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών. Τα παραπάνω ευρήματα που αφορούν την συχνότητα κατανομής είτε των γονοτύπων είτε των αλληλόμορφων παρέμειναν σημαντικά και μετά την προσαρμογή για την ηλικία και το BMI και είναι ανεξάρτητα των υπολοίπων SNPs.

Μεταξύ των ασθενών, επιβεβαιώθηκε η σημαντική συσχέτιση που υπάρχει αναφορικά με τις κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της παρατηρούμενης αμηνόρροιας. Δεν καταδεικνύεται γραμμική εξάρτηση μεταξύ των εξεταζόμενων SNPs και της παρατηρούμενης αμηνόρροιας, ενώ η σχέση μεταξύ αμηνόρροιας και της τιμής του LBMD Z-score ήταν πάνω από τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Επίσης, δεν βρέθηκαν ενδείξεις για πιθανή συσχέτιση των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης στον ορό των ασθενών, με τις

παρατηρούμενες μεταβολές των τιμών της οστικής πυκνότητας των νοσούντων, για τη σπονδυλική στήλη (LBMD Z-score). Η σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων  $E_2$  και του LBMD Z-score, είναι ανεξάρτητη από την παρατηρούμενη κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού XbaI του Esr1 υποδοχέα.

Τα ευρήματα μας αυτά, είναι συμβατά με τα ευρήματα μιας άλλης μελέτης σύμφωνα με την οποία η οστική πυκνότητα στα κορίτσια με ΨΑ δεν συσχετίζεται ούτε με την ηλικία, ούτε με το BMI, ούτε μετά τα χαρακτηριστικά της αμηνόρροιας αλλά μόνο με την ηλικία έναρξης της νόσου [70].

Σε ότι αφορά τον wild type (AA) Esr1-XbaI SNP, η παρουσία του οποίου στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι στις έφηβες με ΨΑ αυξάνει τον κίνδυνο για μειωμένη οστική πυκνότητα στα οστά της ΣΣ, δεν κατέστη δυνατή η συσχέτισή του ούτε με το πρότυπο εμμηνορρυσίας, ούτε με τη συγκέντρωση των επιπέδων της  $E_2$  στον ορό των ασθενών.

Εξετάζοντας τη σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και των τιμών του LBMD Z-score, στα κορίτσια με Ψυχογενή Ανορεξία, ξεχωριστά ανά αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό XbaI του alpha οιστρογονικού υποδοχέα, παρατηρήσαμε ότι υφίσταται συσχέτιση μόνο για τους φορείς του μεταλλαγμένου (G) αλληλίου. Οι έφηβες ασθενείς που φέρουν το G αλληλόμορφο και έχουν κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης ίσες ή μεγαλύτερες των 30pg/mL παρουσιάζουν μικρότερο κίνδυνο να έχουν ελαττωμένο LBMD Z-score ( $\leq -1$ ). Αντίθετα, στις ασθενείς που φέρουν το wt (A) αλληλόμορφο, τα επίπεδα οιστραδιόλης ορού, φαίνεται να μην επηρεάζουν την οστική πυκνότητα στην σπονδυλική στήλη.

Οι ιδιοσυστασιακά αδύνατες νεαρές γυναίκες με BMI χαμηλό και συγκρίσιμο με αυτό των γυναικών που πάσχουν από ΨΑ (μικρότερο του 16.5 Kgr/cm<sup>2</sup>), εμφανίζουν ελαττωμένη οστική πυκνότητα τόσο στην σπονδυλική στήλη όσο και στο ισχίο και ελαττωμένη οστική ισχύ που συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο κατάγματος, περίπου τον ίδιο όπως και των συνομηλίκων τους που πάσχουν από χρόνια ανορεκτική νόσο. Αυτές οι γυναίκες εμφανίζουν ένα φαινότυπο χαμηλής οστικής ποιότητας, έχοντας φυσιολογική εμμηνορρυσία, φυσιολογικό ορμονικό προφίλ, φυσιολογική ενεργειακή ομοιοστασία και σημαντικά υψηλότερα

ποσοστά λιπώδους μάζας συγκρινόμενες με γυναίκες πάσχουσες από ΨΑ ίδιας ηλικίας και BMI. Οι ιδιοσυστασιακά λεπτές γυναίκες έχουν συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στον ορό κατά μέσο όρο υψηλότερες από των συνομηλίκων τους που έχουν φυσιολογική εμμηνορρυσία και φυσιολογικό BMI ( $\geq 19.1 \text{ kg/cm}^2$ ) και συνεπώς η παρατηρούμενη ελαττωμένη οστική πυκνότητα δεν οφείλεται σε ανεπάρκεια οιστρογόνων ή άλλη ορμονική διαταραχή, αλλά ενδέχεται να βρίσκεται υπό γενετικό έλεγχο [396].

Η παρουσία του G αλληλόμορφου για τον Esr1-XbaI SNP, στις έφηβες πάσχουσες από ΨΑ στην παρούσα μελέτη φαίνεται να συσχετίζεται με ελαττωμένο κίνδυνο να εμφανίσουν αυτές οι νεαρές οστική βλάβη, εφόσον τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό τους υπερβαίνουν τα 30 pg/mL. Επίσης από τη διεθνή βιβλιογραφία πρόσφατα καταδείχθηκε ότι η διαδερμική χορήγηση 17β-οιστραδιόλης σε έφηβες με ΨΑ προοπτικά βοήθησε να ανασχεθεί η μείωση της οστικής πυκνότητας αυτών των κοριτσιών, αν και η μελέτη δεν εξετάζει την ύπαρξη και τους συσχετισμούς μεταξύ μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του ESR-1[364]. Σε ασθενείς όμως με Σύνδρομο Turner ο γονότυπος του Esr-1XbaI που φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της οστικής πυκνότητας των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης. Επίσης και η ετεροζυγωτία συσχετίστηκε με αύξηση της BMD αν και μικρότερου βαθμού. Ο γονότυπος xx (mt), όπως και ο rr του Esr1-PvuII, θεωρήθηκε ως προγνωστικός δείκτης καλής ανταπόκρισης στην θεραπεία [397].

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η έγκαιρη αναγνώριση αυτής της ομάδας νεαρών, που πάσχουν από Ψυχογενή Ανορεξία, και η πρώιμη έναρξη κατάλληλης θεραπείας, πιθανότατα με τη διαδερμική χορήγηση 17β-οιστραδιόλης, έχει μεγάλη σημασία γιατί μπορεί να συνεισφέρει στην ανάσχεση των δυσμενών επιπτώσεων που αφορούν την οστική υγεία.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη εξάγονται τα κάτωθι συμπεράσματα:

- Από τους έξι υπό εξέταση μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, του Οιστρογονικού υποδοχέα τύπου alpha, του Κολλαγόνου τύπου Ια Ι, της Βιταμίνης D και της Καλσιπονίνης, μόνο ο πολυμορφισμός AluI του υποδοχέα της Καλσιπονίνης (CTR- AluI) συνδέεται γραμμικά με την Ψυχογενή Ανορεξία
- Οι φορείς του T αλληλόμορφου (wt) απαντώνται σε σημαντικά αυξημένη συχνότητα μεταξύ των νοσούντων σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό ( p value =0.039)
- Παρόλα αυτά, στην ομάδα των ασθενών δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων του CTR-AluI και της τιμής της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης
- Αντιθέτως, στις νοσούσες από Ψυχογενή Ανορεξία, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική γραμμική σχέση (p value =0.023) μεταξύ της τιμής του LBMD Z-score και του Esr1-XbaI πολυμορφισμού
- Οι έφηβες ασθενείς που φέρουν τον άγριο τύπο (AA), έχουν αυξημένο κίνδυνο να έχουν LBMD Z- score μικρότερο του -1 σε σύγκριση με τις αυτές που φέρουν το μεταλλαγμένο (GG) γονότυπο, ακόμη και μετά την προσαρμογή για την ηλικία και το BMI, ανεξαρτήτως των υπολοίπων SNPs
- Πιθανά να υφίσταται ένα μοντέλο γονιδιακής δοσολογίας, με τις φυσιολογικές ομοζυγώτριες να έχουν αρκετά μεγαλύτερο κίνδυνο ελαττωμένης οστικής πυκνότητας στη σπονδυλική στήλη σε σύγκριση με τις ετεροζυγώτριες, που γίνεται ακόμη μεγαλύτερος αν συγκριθούν με αυτές που φέρουν το μεταλλαγμένο γονότυπο σε ομοζυγωτία
- Το παραπάνω αποτέλεσμα ενισχύθηκε περαιτέρω όταν εφαρμόστηκε πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των αλληλόμορφων του Esr1-XbaI, για την ηλικία και το BMI

- Επίσης, στις ασθενείς που πάσχουν από Ψυχογενή Ανορεξία και φέρουν το άγριο (wt) αλληλόμορφο του Esr1-XbaI δεν παρατηρήθηκε να υφίσταται σχέση, σε επίπεδο στατικής σημαντικότητας, μεταξύ των κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης
- Αντίθετα, οι ανορεκτικές έφηβες που φέρουν το G αλληλίο και έχουν στο ορό συγκεντρώσεις οιστραδιόλης μεγαλύτερες ή ίσες των 30 pg/mL, έχουν μειωμένο κίνδυνο να εμφανίσουν βλάβη στη σπονδυλική στήλη, του τύπου της ελαττωμένης για την ηλικία οστικής πυκνότητας.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

**Πίνακας 1:** Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση του πολυμορφισμού AluI του υποδοχέα της Καλσιτονίνης και Ψυχογενούς Ανορεξίας

Πολυμορφισμός	Ψυχογενής Ανορεξία		p-value*
	OR	95% ΔΕ	
TT - wt	176,99	2,27- 13873,87	0,020
T/C	18,88	0,8-926,02	0,139
CC	1,00	αναφορά	

\*Wald test

**Πίνακας 2:** Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση των αλληλίων του Ctr-AluI και Ψυχογενούς Ανορεξίας

Αλληλίο	z-score $\leq$ -1		p-value*
	OR	95% ΔΕ	
T - wt	16,94	2,31-124,13	<b>0,005</b>
C	1,00	αναφορά	

\*Wald test



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

**Συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και τιμών του LBMD Z-score, σε συσχέτιση με τη συχνότητα των παρατηρούμενων γονότυπων του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού XbaI του Esr1 υποδοχέα, στην ομάδα των μαρτύρων**

Λόγω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για την ομάδα των ασθενών και αφορούν τη συσχέτιση του LBMD Z-score με την τιμή της E<sub>2</sub>, για κάθε ομάδα γονότυπου του Esr1-XbaI πολυμορφισμού, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των καταγραφόμενων συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης, ξεχωριστά ανά ομάδα γονοτύπου του πολυμορφισμού Esr1-XbaI μεταξύ των υγιών κοριτσιών (n=10). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 του Παραρτήματος Β, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των τιμών της οιστραδιόλης και LBMD Z-score σε καθεμία από τις ομάδες γονοτύπων, ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα είναι αρκετά μικρό.

**Πίνακας 1:** Συσχέτιση του LBMD Z-score με την τιμή των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης στον ορό των μαρτύρων, για κάθε ομάδα γονοτύπου του Esr1-XbaI

Esr1- XbaI	Οιστραδιόλη (pg/mL)	LBMD				p- value*
		z-score ≤ -1		z-score > -1		
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
A/A - wt	≥30	1	100	5	100	NA
	<30	0	0	0	0	
	Σύνολο	1		5		
A/G	≥30	0	0	3	100	0,250
	<30	1	100	0	0	
	Σύνολο	1		3		
G/G	≥30	0	0	0	0	NA
	<30	0	0	0	0	
	Σύνολο	0		0		

\*Fisher's exact test

### **Συσχέτιση του LBMD Z-score με τις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης στον ορό των μαρτύρων σε κάθε ομάδα αλληλόμορφων για τον Esr1-XbaI**

Τέλος, διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης και του LBMD Z-score, στην ομάδα των υγιών κοριτσιών (n=20), ξεχωριστά ανά αλληλίο του πολυμορφισμού Esr1-XbaI. Ανατρέχοντας στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος Β, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων της οιστραδιόλης και της τιμής του Z-score της οστικής πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης, για την ομάδα των μαρτύρων είτε φέρουν το «άγριου τύπου» αλληλόμορφο (A) είτε φέρουν το μεταλλαγμένο (G), ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του δείγματος είναι μικρό και ιδιαίτερως για το G αλληλίο.

**Πίνακας 2:** Συσχέτιση του LBMD Z-score με την τιμή των συγκεντρώσεων οιστραδιόλης στον ορό των μαρτύρων, σε κάθε ομάδα αλληλόμορφου για τον Esr1-Xbal

Esr1- Xbal	Οιστραδιόλη (pg/mL)	LBMD				p- value*
		z-score ≤ -1		z-score > -1		
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%	
A - wt	≥30	2	66,7	13	100	0,188
	<30	1	33,3	0	0	
	Σύνολο	3		13		
G	≥30	0	0	3	100	0,250
	<30	1	100	0	0	
	Σύνολο	1		3		

\*Fisher's exact test

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

(Ταξινόμηση με τη σειρά ανεύρεσης στο κείμενο)

**ΨΑ:** Ψυχογενής Ανορεξία

**ΑΡΑ:** Αμερικανική Ψυχιατρική Εταιρεία (American Psychological Association)

**DSM:** Διαγνωστικό και Στατιστικό Εγχειρίδιο Ψυχικών Διαταραχών (Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders)

**BMI :** Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index)

**GnRH:** Εκλυτική Ορμόνη των Γοναδοτροπινών της Υπόφυσης (Gonadotropin-releasing Hormone)

**FSH:** Θυλακιοτρόπος Ορμόνη (Follicle-stimulating Hormone)

**LH:** Ωχριοτρόπος Ορμόνη (Luteinizing Hormone)

**CRH:** Εκλυτική Ορμόνη της Κορτικοτροπίνης (Corticotrophin-releasing Hormone)

**NPY:** Νευροπεπτίδιο Υ (Neuropeptide Υ)

**PRG:** Προγεστερόνη (Progesterone)

**LH-RH:** Εκλυτική Ορμόνη της Ωχριοτρόπου Ορμόνης (Luteinizing Hormone - Releasing Hormone)

**PYY:** Πεπτίδιο ΥΥ (Peptide ΥΥ)

**POMC:** Προοπιομελανοκορτίνη (Proopiomelanocortin)

**AMSH:** Ορμόνη διέγερσης των άλφα μελανοκυττάρων (Alpha Melanocyte Stimulating Hormone)

**IGF-1:** Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγων 1 (Insulin-like Growth Factor 1)

**5-HT:** 5-υδρόξυτριπταμίνη ή σεροτονίνη (5-Hydroxytryptamine)

**FLI:** Δείκτης ελεύθερης λεπτίνης (Free Leptin Index)

**AGRP:** Σχετιζόμενη με το agouti πρωτεΐνη (Agouti-related Protein)

**ACTH:** Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος Ορμόνη (Adrenocorticotrophic Hormone)

**M-CSF:** Παράγων Ενεργοποίησης των Αποικιών των Μακροφάγων (Macrophage Colony-stimulating Factor)

**RANK:** Υποδοχέας για την Ενεργοποίηση του kappa B πυρηνικού παράγοντα (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B)

**RANKL:** Συνδέτης του Υποδοχέα για την Ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα kappa B (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B Ligand)

**OPG:** Οστεοπρωτεγερίνη (Osteoprotegerin)

**TGF-β:** Τροποποιητικός Αυξητικός Παράγων β (Transforming Growth Factor-beta)

**TNF:** Παράγοντας Νέκρωσης του Όγκου (Tumor Necrosis Factor)

**BMD:** Οστική Πυκνότητα (Bone Mass Density)

**SNP:** Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός (Single-Nucleotide Polymorphism)

**Ers/ERS:** Ειδικός Υποδοχέας Οιστρογόνων (Estrogen receptor)

**Esr-1, Esr-2:** Υποδοχέας Οιστρογόνων τύπου 1, τύπου 2 (Estrogen receptor type 1, type 2)

**RNA:** Ριβονουκλεϊκό Οξύ (Ribonucleic Acid)

**mRNA:** Αγγελιοφόρο RNA (Messenger RNA)

**NR:** Πυρηνικός Υποδοχέας (Nuclear Receptor)

**CRF:** Παράγων Απελευθέρωσης της Κορτικοτροπίνης (Corticotrophin Releasing Factor)

**DNA:** Δε(σ)οξυριβονουκλεί(νι)κό Οξύ (Deoxyribonucleic Acid)



**Fas:** Θραύσμα Ενίσχυσης της Απόπτωσης (Apoptosis Stimulating Fragment)  
(προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)

**FasL:** Συνδέτης του Fas (Fas Ligand)

**COL1A1:** Κολλαγόνο τύπου 1 άλφα1 (Collagen type 1 Alpha1)

**COL1A2:** Κολλαγόνο τύπου 1 άλφα2 (Collagen type 1 Alpha 2)

**GENOMOS:** Γενετικοί Δείκτες για την Οστεοπόρωση (Genetic Markers for Osteoporosis)

**VDR:** Υποδοχέας της Βιταμίνης D (Vitamin D Receptor)

**VDRG:** Γονίδιο του Υποδοχέα της Βιταμίνης D (Vitamin D Receptor Gene)

**CTR:** Υποδοχέας της Καλσιτονίνης (Calcitonin Receptor)

**PGE<sub>2</sub>:** Προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>)

**GPCR:** G-Protein Coupled Receptor (Seven-transmembrane domain G-protein coupled receptor superfamily)

**PTH:** Παραθορμόνη (Parathyroid Hormone)

**PTHrP:** Σχετική Πρωτεΐνη με την Παραθορμόνη (Parathyroid Hormone-related Protein)

**VIP:** Αγγειοδραστικό Εντερικό Πολυπεπτίδιο (Vasoactive Intestinal Polypeptide)

**GLP:** Πεπτίδιο Ομοιάζων με τη Γλυκαγόνη (Glucagon Like Peptide)

**GHRF:** Παράγων Απελευθέρωσης της Αυξητικής Ορμόνης (Growth Hormone-Releasing Factor)

**CRFR:** Υποδοχέας του Παράγοντα Απελευθέρωσης της Φλοιοεπινεφριδιοτρόπου Ορμόνης (Corticotrophin-Releasing Factor Receptor)

**CL(CRLR):** Υποδοχέας ομοιάζων με τον Υποδοχέα της Καλσιτονίνης (Calcitonin Receptor-Like Receptor)

**GABA:** Γάμμα-Αμινοβουτυρικό Οξύ (Gamma-Amino butyric Acid)

**RAMP:** Υποδοχέας Τροποποίησης -Δραστικότητας Πρωτεϊνών (Receptor Activity-Modifying Proteins)

**AMY-1:** Άλφα Αμυλάση 1 (Alpha-amylase 1)

**NFκB:** Πυρηνικός Παράγων κάππα Β (Nuclear Factor kappa B)

**MAPK:** Πρωτεϊνική Κινάση Ενεργοποιούμενη από Μιτογόνα (Mitogen-Activated Protein Kinase)

**GH:** Αυξητική Ορμόνη (Growth Hormone)

**PP:** Παγκρεατική πεπτιδίδη (Pancreatic Polypeptide)

**SPA:** Απλή γ-Φωτονιακή Δέσμη (Single Photon Absorptiometry)

**DPA:** Διπλή γ-Φωτονιακή Δέσμη (Dual Photon Absorptiometry)

**DXA/DEXA:** Διπλής Ενέργειας Χ-Φωτονιακή Δέσμη (Dual Energy X-ray Absorptiometry)

**QCT:** Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (Quantitative Computed Tomography)

**pQCT:** Περιφερική Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (peripheral Quantitative Computed Tomography)

**QUS:** Ποσοτική Υπερηχοτομογραφία (Quantitative Ultrasound Tomography)

**NMR:** Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance)

**BMC:** Οστική Περιεκτικότητα ανόργανου (Bone Mineral Content)

**ΟΜΣΣ:** Οσφυϊκή Μοίρα της Σπονδυλικής Στήλης

**SD:** Σταθερή Απόκλιση (Standard Deviation)

**ISCD:** Διεθνής Εταιρεία Κλινικής Πυκνομετρίας (International Society Clinical Densitometry)

**TBLH:** Ολόσωμη Πλην Κεφαλής (Total Body Less Head)

**LSC:** Ελάχιστη Σημαντική Μεταβολή (Least significant change)

**NOS:** Εθνική Εταιρεία Οστεοπόρωσης (National Osteoporosis Society)

**ICSBM:** Διεθνής Επιτροπή για τα Πρότυπα στις Οστικές Μετρήσεις (International Committee for Standards in Bone Measurements)

**sBMD:** Τυποποιημένη Οστική Πυκνότητα (Standardized Bone Mineral Density)

**CDC:** Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers of Disease Control and Prevention)

**WHO:** Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization)

**IOF:** Διεθνής Ομάδα Εργασίας κατά της Παχυσαρκίας (International Obesity Task Force)

**NCHS:** Εθνικό Κέντρο Στατιστικής της Υγείας (National Center for Health Statistics)

**BMD Z-score:** Πόσες Σταθερές Απόκλισης απέχει η εξεταζόμενη Οστική Πυκνότητα από την αντίστοιχη τιμή, φυσιολογικών ατόμων ίδιας ηλικίας και φύλου

**AMH:** Αντιμυλλέριος Ορμόνη (Antimüllerian hormone)

**SHBG:** Δεσμευτική των Ορμονών του Φύλου Σφαιρίνη (Sex Hormone Binding Globulin)

**OCPs:** Από του Στόματος Αντισυλληπτικά Δισκία (Oral Contraceptive Pills)

**r-IGF-1:** Ανασυνδυασμένος Ινσουλινομιμητικός Παράγων -1 (recombinant IGF-1)

**GSNPs:** Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί Γονιδιώματος (Genomic Single-Nucleotide Polymorphism)

**RFLP:** Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικού Θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphism)

**PCR:** Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

**ddNTPs:** Τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (dideoxyNucleotide Triphosphates)

**ATP:** Τριφωσφορική Αδενοσίνη (Adenosine Triphosphate)

**APS:** 5΄Φωσφοθειϊκή Αδενοσίνη (Adenosine 5΄PhosphoSulfate)

**ddNTPs:** Τριφωσφορικά Δεοξυ-Νουκλεοτίδια (dideoxyNucleotide TriPhosphates)

**PPi:** Πυροφωσφορικό Οξύ (Pyrophosphate)

**K3EDT:** Τρικάλιο Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό Οξύ (K3 EthenyleneDiamineTetraacetic Acid)

**Tris/HCL:** Τρις (υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο/Υδροχλωρικό Οξύ (Tris (hydroxymethyl) aminomethane / Hydrochloric Acid)

**Seq:** Αλληλουχία (Sequence)

**Fw (direction):** Προς τα εμπρός (Forward direction)

**Rev:** Αντίστροφη (Reverse)

**HPLC:** Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Καθαρότητας (High Purity Liquid Chromatography)

**HPSF:** Υψηλής Καθαρότητας Χωρίς Άλας (High Purity Salt Free)

**ANOVA:** Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis of Variance)

**OR:** Λόγος Πιθανοτήτων (Odds ratio)

**ΔΕ:** Διάστημα Εμπιστοσύνης

**E<sub>2</sub>:** 17-β οιστραδιόλη (17-β Estradiol)

**wt:** άγριος (μη μεταλλαγμένος ομόζυγος) γονότυπος (wild type)

**mt:** μεταλλαγμένος (ομόζυγος) γονότυπος (mutant type)

**PACAP:** Πολυπεπτίδιο Ενεργοποίησης της Υποφυσιακής Αδενυλικής Κυκλάσης (Pituitary Adenylate Cyclase Polypeptide)

**GIP:** Γαστρικό Ανασταλτικό Πεπτίδιο (Gastric Inhibitory Peptide)

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pearce JM Richard Morton: origins of anorexia nervosa. *Eur Neurol.* 2004; 52(4):191-2. Epub 2004 Nov 10.
2. Elizabeth Hopton. Anorexia Nervosa in Adolescent Girls: A Culture-Bound Disorder of Western Society? *Social Cosmos* – URN:NBN:NL:UI:10-1-101272
3. Vandereycken, W., & Van Deth, R. From fasting saints to anorexic girls: The history of self starvation. New York, NY: University Press, 1994.
4. Bell, R. (1985). *Holy Anorexia*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
5. Julie Hepworth. *The Social Construction of Anorexia Nervosa*, London, Sage, 1999.
6. Laségue C. De L'anorexia hysterique. *Arch Gen Medicine.* 1873; I: 385–403.
7. Gull W. Anorexia nervosa (apepsia hysterica, anorexia hysterica). *Trans Clin Soc Lond* 1874; 7: 22-28.
8. Ryle, J.A. Anorexia nervosa. *Lancet* 1936, ii: 893-899.
9. Bruch H: Anorexia nervosa and its differential diagnosis. *J Nerv Ment Dis* 141:555-566, 1966.
10. Crisp A H. Primary anorexia nervosa. *Gut.* 1968 August; 9(4): 370–372.
11. 3<sup>rd</sup> ed; DSM-III; American Psychiatric Association, 1980.
12. van Elburg AA, Eijkemans MJ, Kas MJ, Themmen AP, de Jong FH, van Engeland H, Fauser BC. Predictors of recovery of ovarian function during weight gain in anorexia nervosa. *Fertil Steril.* 2007 Apr; 87(4):902-8. Epub 2007 Jan 18.
13. Støving RK, Andries A, Brixen K, Flyvbjerg A, Hørder K, Frystyk J. Leptin, grelin, and endocannabinoids: Potential therapeutic targets in anorexia nervosa. *JPsychiatr Res.* 2009 Apr; 43(7):671-9. Epub 2008 Oct 15.
14. Dostálová I, Haluzík M. The role of grelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiol Res.* 2009; 58(2):159-70. Epub 2008 Apr 1.
15. Golden NH, Carlson JL. The pathophysiology of Amenorrhea in the adolescent. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1135:163-78.

16. Jayasinghe Y, Grover SR, Zacharin M. Current concepts in bone and reproductive health in adolescents with anorexia nervosa. BJOG. 2008 Feb; 115(3):304-15.
17. Cetković A, Djurović M, Milić N. Leptin and inhibin B as predictors of reproductive recovery in patients with anorexia nervosa during weight gain. Srp Arh Celok Lek. 2006 Nov-Dec; 134(11-12):492-7.
18. Atkinson R.L, Atkinson R.C, Smith E.E, & Bem D.J. (1993). "Introduction to Psychology". USA: Harcourt Brace & Company. p.p. 382-392
19. Χριστοδούλου, Γ.Ν. & συνεργάτες (2004). «Ψυχιατρική». Αθήνα: ΒΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις. σελ. 482-496
20. Γ. Πανοτόπουλος. Διατροφή και διαταραχές του σωματικού βάρους. Στο: Γυναικολογία & Μαιευτική της Νεαρής Ηλικίας. Γεώργιος Κ. Κρεατσάς. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 2001, σελ. 59-87.
21. Καλαντζή-Azizi A. (1995). Νευρογενής Ανορεξία και Βουλιμία. Τετράδια Ψυχιατρικής, 52, 76-88
22. Kay J., Tasman A. & Lieberman J.A. (2000). "Psychiatry – Behavioral Science and Clinical Essentials". USA: W.B. Saunders Company. p.p. 447-459
23. Elkin, G.D. (1999). "Introduction to Clinical Psychiatry". USA: Appleton & Lange. p.p. 183-192
24. DSM-IV 1994 criteria were retrieved from the site of APA (American Psychiatric Association). The site was last assessed on November 13, 2012. <http://www.dsm5.org/proposedrevisions/pages/proposedrevision.aspx?rid=24>
25. Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Warenik-Szymankiewicz A, Genazzani AR. Functional hypothalamic amenorrhea: Current view on neuroendocrine aberrations. Gynecol Endocrinol. 2008 Jan; 24(1):4-11.
26. Donald E. Greydanus Hatim A. Omar, Artemis K. Tsitsika, Dilip R. Patel. Menstrual disorders in adolescent females. In: Pediatric and adolescent sexuality and gynecology : principles for the primary care clinician Hatim A. Omar, Donald E. Greydanus, Artemis K. Tsitsika, Dilip R. Patel, Joav Merrick (Ed.) Hauppauge, N.Y. : Nova Science Publishers, ©2010, pp 317-411.

27. Gerard Tscherne. Menstrual Irregularities. Pediatric and adolescent gynecology: evidence-based clinical practice (ed) C.Sultan Basel [u.a.] Karger 2004 Endocrine development, Vol.7 ;129-139
28. Ι. Μεσσήνης. Νευροενδοκρινολογία της Εφηβείας. Στο: Γυναικολογία & Μαιευτική της Νεαρής Ηλικίας. Γεώργιος Κ. Κρεατσάς. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδη, Αθήνα 2001, σελ 105-126
29. Μεσσήνης Ι.Ε. Ωοθήκες και λειτουργία τους. Στο : Επίτομη Μαιευτική & Γυναικολογία Ιωάννης Ε. Μεσσήνης. MD Communications, Αθήνα 2005, σελ 27-33.
30. Μεσσήνης Ι.Ε. Γεννητικός κύκλος- Ορμονική εικόνα. Στο: Επίτομη Μαιευτική & Γυναικολογία Ιωάννης Ε. Μεσσήνης. MD Communications, Αθήνα 2005, σελ 35-42.
31. Carswell J, Stafford D. Normal Physical Growth and Development. Adolescent Health Care: A Practical Guide, ed. Neinstein L, Gordon C, Katzman D, Rosen D, Woods E. 2008; 3-26.
32. Wu T, Mendola P, Buck GM. Ethnic differences in the presence of secondary sex characteristics and menarche among US girls: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Pediatrics. 2002 Oct; 110(4):752-7.
33. Mitan LA, Slap GB. Dysfunctional uterine bleeding. In: Neinstein LS (Ed.) Handbook of Adolescent Health Care. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009, pp. 467-469.
34. Current evaluation of amenorrhea. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertil Steril. 2004 Jul;82(1):266-72. Clinical Gynecologic Endocrinology & Infertility, 7th Edition
35. Καλογερόπουλος Α. Διαταραχές του εμμηνορρυσιακού κύκλου και ανώμαλη αιμόρροια από τα γεννητικά όργανα. Στο: Γυναικολογία Αχιλλέας Καλογερόπουλος. University Studio Press. 2<sup>η</sup> Έκδοση, Θεσσαλονίκη 2004, σελ 420-450.
36. Καλογερόπουλος Α. Διαταραχές της ενδοκρινικής λειτουργίας στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες. Στο: Γυναικολογία Αχιλλέας Καλογερόπουλος. University Studio Press. 2<sup>η</sup> Έκδοση, Θεσσαλονίκη 2004, σελ 451-482.

37. Σέγκος Χ. Μανιάς Ν. Αμηνόρροια και ανωθυλακιορρηκτικές καταστάσεις. Στο: Γυναικολογική Ενδοκρινολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα 1990, σελ133-210.
38. Muñoz MT, Argente J. Anorexia Nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *Eur J Endocrinol*. 2002 Sep; 147(3):275-86.
39. Oświecimska J, Ziara K, Geisler G, Broll-Waśka K. Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005 Aug; 26(4):301-4.
40. De Silva A, Bloom SR Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver*. 2012 Jan; 6(1):10-20. Epub 2012 Jan 12.
41. 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 Endocrinol Metab*. 2006 Mar; 91(3):1027-33. Epub 2005 Nov 8.
42. Wisser AS, Habel P, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P. Interactions of gastrointestinal peptides: ghrelin and its anorexigenic antagonists. *Int J Pept*. 2010; 2010. Epub 2010 Jan 6.
43. Meczekalski B, Warenik-Szymankiewicz A. Evaluation of beta-endorphin levels and gonadotropin, prolactin, cortisol and estradiol in serum of girls with secondary amenorrhea associated with weight loss. *Ginekol Pol*. 1995 Oct; 66(10):596-9.
44. Smiarowska M. Leptin and its potential role in the pathomechanism of some hormonal and metabolic disorders of patients with anorexia nervosa. *Ann Acad Med Stetin*. 2002; 48: 351-65.
45. Koubaa S, Hällström T, Lindholm C, Hirschberg AL. Pregnancy and neonatal outcomes in women with eating disorders. *Obstet Gynecol*. 2005 Feb; 105(2):255-60. Erratum in: *Obstet Gynecol*. 2008 May; 111(5):1217.
46. Balasch J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update*. 2003 May-Jun; 9(3):207-22.
47. Guyton A. Παραθορμόνη, Καλσιτονίνη, Μεταβολισμός του Ασβεστίου και του Φωσφόρου, Βιταμίνη D, Οστά και Δόντια. Στο: Φυσιολογία του Ανθρώπου. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 3<sup>η</sup> έκδοση, Αθήνα 1990, σελ 698-715.



48. Lloyd H.Smith, Jr. Παθήσεις του Οστίτη Ιστού. Στο: CECIL Παθολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα, Αθήνα 1991, σελ 825-858.
49. Μπενάκης Β. Σκελετός (πλην κρανίου) Μαλακά μόρια. Στο: Εισαγωγή στην Ακτινοδιαγνωστική. Αθήνα 1981, σελ 206-311.
50. Λυρίτης Γ Π. Οστεοπόρωση. Εκδόσεις Press Line. Αθήνα, 1996, σελ 47-85.
51. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000 289(5484):1504-1508.
52. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature .2003; 423:337-342.
53. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol. 2005; 5: 618-625.
54. Stejskal D, Bartek J, Pastorková R, Růžicka V, Oral I, Horalík D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2001 Dec; 145(2):61-4.
55. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet. 2006; 367:2010-2018.
56. D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza SZ, Cristofaro MA, Tamone C, Giribaldi G, Ulliers D, Pescarmona GP, Isaia G. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. Bone. 2008 Jul; 43(1):92-100... Epub 2008 Mar 7.
57. Misra M, Soyka LA, Miller KK, Herzog DB, Grinspoon S, De Chen D, Neubauer G, Klibanski A. Serum osteoprotegerin in adolescent girls with anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Aug; 88(8):3816-22.
58. Heaney RP. Peak bone mass. Osteoporosis Int 2000;11:985-1009
59. Canalis E. Regulation of bone remodeling. In: Primer on metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. Favus MJ (Ed), 1996 3d edition, Lippincott-Raven; pp: 29-34.
60. Zofková I. Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism. Physiol Res. 2003; 52(6):657-79. Review.
61. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis Salud Publica Mex. 2009; 51 Suppl 1:S5-17. Review.

62. Nabipour I, Larijani B, Beigi S, Jafari SM, Amiri M, Assadi M, Pazoki R, Amiri Z, Sanjdideh Z. Relationship among insulinlike growth factor I concentrations, bone mineral density, and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women: a population-based study. *Menopause*. 2008 Sep-Oct; 15(5):934-9.
63. Soyka LA, Grinspoon S, Levitsky LL, Herzog DB, Klibanski A. The effects of anorexia nervosa on bone metabolism in female adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec; 84(12):4489-96.
64. Christo K, Prabhakaran R, Lamparello B, Cord J, Miller KK, Goldstein MA, Gupta N, Herzog DB, Klibanski A, Misra M. Bone Metabolism in Adolescent Athletes With Amenorrhea, Athletes With Eumenorrhea, and Control Subjects. *Pediatrics*. 2008 Jun; 121(6):1127-36.
65. Κυπριακή Εταιρεία Οστεοπόρωσης. Site: <http://biniapiwebpreview.com>
66. 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 Endocrinol Metab*. 2007 Jun; 92(6):2046-52. Epub 2007 Mar 13.
67. Grinspoon S, Thomas E, Pitts S, Gross E, Mickley D, Miller K, Herzog D, Klibanski A. Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Ann Intern Med*. 2000 Nov 21; 133(10):790-4.
68. del Rio L, Carrascosa A, Pons F, Gusinyé M, Yeste D, Domenech FM. Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res*. 1994 Mar; 35(3):362-6.
69. Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 1999 Dec; 20(6):788-804. Review.
70. Nicaise D, Beaumesnil M, Chaillou E, Wagner AC, Avarello G, Audran M, Giniès JL. Adolescent with anorexia nervosa: consequences on bone mineralization *Arch Pediatr*. 2012 Jan; 19(1):17-21. Epub 2011 Dec 1.
71. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC Jr. Genetic factors in determining bone mass *J Clin Invest*. 1973 Nov; 52(11):2800-8.

72. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA Genetic factors in bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Apr; 72(4):808-13.
73. Kelly PJ, Nguyen T, Hopper J, Pocock N, Sambrook P, Eisman J. Changes in-axial bone density with age: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1993 Jan;8(1):11-7
74. Berg JP, Lehmann EH, Stakkestad JA, Haug E, Halse J The Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I alpha 1 (COLIA1) gene is not associated with bone mineral density in healthy children, adolescents, and young adults. *Eur J Endocrinol.* 2000 Aug; 143(2):261-5
75. Giguère Y, Rousseau F. The genetics of osteoporosis: 'complexities and difficulties'. *Clin Genet.* 2000 Mar; 57(3):161-9.
76. Blades HZ, Arundel P, Carlino WA, Dalton A, Crook JS, Freeman JV, Bishop NJ. Collagen gene polymorphisms influence fracture risk and bone mass acquisition during childhood and adolescent growth. *Bone.* 2010 Nov; 47(5):989-94. Epub 2010 Aug 21
77. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of collagen type 1 alpha1 gene polymorphism with bone density in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar; 84(3):853-5.
78. van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, Pols HA, Lequin MH, Krenning EP, Uitterlinden AG Collagen Ialpha1 polymorphism is associated with bone characteristics in Caucasian children and young adults. *Calcif Tissue Int.* 2002 Nov; 71(5):393-9. Epub 2002 Sep 18.
79. Arabi A, Zahed L, Mahfoud Z, El-Onsi L, Nabulsi M, Maalouf J, Fuleihan Gel-H. Vitamin D receptor gene polymorphisms modulate the skeletal response to vitamin D supplementation in healthy girls. *Bone.* 2009 Dec; 45(6):1091-7. Epub 2009 Jul 30.
80. Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *J Bone Miner Metab.* 2002; 20(3):164-9

81. Mølgaard C, Larnkjaer A, Cashman KD, Lamberg-Allardt C, Jakobsen J, Michaelsen KF. Does vitamin D supplementation of healthy Danish Caucasian girls affect bone turnover and bone mineralization? *Bone*. 2010 Feb; 46(2):432-9. Epub 2009 Sep 6
82. Cusack S, Mølgaard C, Michaelsen KF, Jakobsen J, Lamberg-Allardt CJ, Cashman KD. Vitamin D and estrogen receptor-alpha genotype and indices of bone mass and bone turnover in Danish girls. *J Bone Miner Metab*. 2006; 24(4):329-36.
83. Strandberg S, Nordström P, Lorentzon R, Lorentzon M. Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) is related to bone mineral density in healthy adolescent boys. *J Bone Miner Metab*. 2003; 21(2):109-13.
84. Lorentzon M, Lorentzon R, Nordström P. Vitamin D receptor gene polymorphism is related to bone density, circulating osteocalcin, and parathyroid hormone in healthy adolescent girls. *J Bone Miner Metab*. 2001; 19(5):302-7.
85. Diogenes ME, Becerra FF, Cabello GM, Cabello PH, Mendonça LM, Oliveira Júnior AV, Donangelo CM. Vitamin D receptor gene FokI polymorphisms influence bone mass in adolescent football (soccer) players. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Jan; 108(1):31-8. Epub 2009 Sep 16.
86. Jakubowska-Pietkiewicz E, Młynarski W, Klich I, Fendler W, Chlebna-Sokół D. Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients. *Mol Biol Rep*. 2012 May; 39(5):6243-50. Epub 2012 Mar 16.
87. Sowińska-Przepiera E, Gryś E. Polymorphism of vitamin D receptor Bsm I gene and of estrogen receptor XbaI I and PvuII II gene in girls and women with low bone mass. *Ginekol Pol*. 2000 Aug; 71(8):673-9.
88. Lorentzon M, Lorentzon R, Bäckström T, Nordström P. Estrogen receptor gene polymorphism, but not estradiol levels, is related to bone density in healthy adolescent boys: a cross-sectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec; 84(12):4597-601.
89. Boot AM, van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, van Meurs JB, 202

- Krenning EP, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density in healthy children and young adults. *Calcif Tissue Int.* 2004 Jun; 74(6):495-500.
90. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):928-33.
  91. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res.* 2003 May 15; 526(1-2):53-61. Review.
  92. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar; 116(3):561-70.
  93. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 2003 Aug; 3(5):281-92.
  94. Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):86-9.
  95. Behl C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jun; 3(6):433-42.
  96. Simm PJ, Bajpai A, Russo VC, Werther GA. Estrogens and growth. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2008 Sep; 6(1):32-41.
  97. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005Dec; 115(12):3318-25.
  98. Krum SA, Brown M. Unraveling estrogen action in osteoporosis. *Cell Cycle.* 2008 May 15; 7(10):1348-52. Epub 2008 Feb 29.

99. Ralston SH, de Crombrughe B .Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev.* 2006 Sep 15; 20(18):2492-506.
100. Tobias JH, Steer CD, Vilarino-Güell C, Brown MA. Estrogen receptor alpha regulates area-adjusted bone mineral content in late pubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb; 92(2):641-7. Epub 2006 Nov 14.
101. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun; 87(6):2460-6. Review.
102. P-Y Liu, Y Lu, J-R Long, F-H Xu, H Shen, R R Recker, H-W Deng. Common variants at the PCOL2 and Sp1 binding sites of theCOL1A1 gene and their interactive effect influence bone mineral density in Caucasians. *J Med Genet* 2004; 41: 752–757.
103. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet.* 1996 Oct;14(2):203-5.
104. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Diez-Perez A, Dunning AM, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, del Monte F, Pols HA, Reeve J, Reid DM, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Sherlock RE, Ioannidis JP; GENOMOS Investigators. Large-scale evidence for the effect of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med.* 2006 Apr; 3(4):e90. Epub 2006 Feb 21. Erratum in: *PLoS Med.* 2006 May; 3(5):e90.
105. Nahid Yazdanpanah Z Fernando Rivadeneira Z Joyce B. J. van Meurs ZM. Carola Zillikens Z P. Arp Z Albert Hofman Z Cornelia M. van Duijn Z Huibert A. P. Pols Z Andre´ G. Uitterlinden. The -1997 G/T and Sp1 Polymorphisms in the Collagen Type I alpha1 (COLIA1) Gene in Relation to Changes in Femoral Neck Bone Mineral Density and the Risk of Fracture in the Elderly: The Rotterdam Study. *Calcif Tissue Int* (2007) 81:18–25.
106. Suuriniemi M, Kovanen V, Mahonen A, Alén M, Wang Q, Lyytikäinen A, Cheng S. COL1A1 Sp1 polymorphism associates with bone density in early

- puberty. *Bone*. 2006 Sep;39(3):591-7. Epub 2006 Mar 31.
107. Blades HZ, Arundel P, Carlino WA, Dalton A, Crook JS, Freeman JV, Bishop NJ. Collagen gene polymorphisms influence fracture risk and bone mass acquisition during childhood and adolescent growth. *Bone*. 2010 Nov; 47(5):989-94. Epub 2010 Aug 21.
  108. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006 Sep;371(1-2):1-12. Epub 2006 Mar 6. Review.
  109. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul; 11(8):1165-79.
  110. Uitterlinden AG, Fang Y, Bergink AP, van Meurs JB, van Leeuwen HP, Pols HA. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Nov 29;197(1-2):15-21. Review.
  111. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):6665-9.
  112. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res*. 1989 Mar 11;17(5):2150.
  113. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460):284-7. Erratum in: *Nature* 1997 May 1;387(6628):106.
  114. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1997 Jun; 12(6):915-21.

115. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000 Mar; 14(3):401-20.
116. Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi AM, Brandi ML. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Mar;83(3):939-44.
117. Deng HW, Li J, Li JL, Johnson M, Gong G, Recker RR. Association of VDR and estrogen receptor genotypes with bone mass in postmenopausal Caucasian women: different conclusions with different analyses and the implications. *Osteoporos Int*. 1999;9(6):499-507.
118. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest*. 2000 Jul;30(7):608-17.
119. Gómez C, Naves ML, Barrios Y, Díaz JB, Fernández JL, Salido E, Torres A, Cannata JB. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int*. 1999;10(3):175-82.
120. Boschitsch E, Suk EK, Mayr WR, Lang T, Schwartz WM, Panzer S. Genotypes of the vitamin-D-receptor gene and bone mineral density in Caucasoid postmenopausal females. *Maturitas*. 1996 May; 24(1-2):91-6.
121. Vidal C, Grima C, Brincat M, Megally N, Xuereb-Anastasi A. Associations of polymorphisms in the vitamin D receptor gene (BsmI and FokI) with bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Osteoporos Int*. 2003 Nov;14(11):923-8. Epub 2003 Oct 14.
122. Mezquita-Raya P, Muñoz-Torres M, Alonso G, de Luna JD, Quesada JM, Dorado G, Luque-Recio F, Ruiz-Requena ME, Lopez-Rodriguez F, Escobar-Jiménez F. Susceptibility for postmenopausal osteoporosis:



- Interaction between genetic, hormonal and lifestyle factors. *Calcif Tissue Int.* 2004 Nov;75(5):373-9. Epub 2004 Jul 30.
123. Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, García-Giralt N, Pérez-Edo L, Cáceres E, Carreras R, Mellibovsky L, Balcells S, Díez-Pérez A, Grinberg D. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007 Feb;18(2):235-43. Epub 2006 Oct 5.
124. Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type Ialpha1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb;16(2):379-85.
125. Willing M, Sowers M, Aron D, Clark MK, Burns T, Bunten C, Crutchfield M, D'Agostino D, Jannausch M. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res.* 1998 Apr;13(4):695-705.
126. Pérez A, Ulla M, García B, Lavezzo M, Elías E, Binci M, Rivoira M, Centeno V, Alisio A, Tolosa de Talamoni N. Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(4):358-65. Epub 2008 Jul 4.
127. Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 May; 81(1):1-24. Review.
128. Karasik D, Kiel DP. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. *Bone.* 2010 May; 46(5):1226-37. Epub 2010 Feb 10. Review.
129. Li WF, Hou SX, Yu B, Li MM, Férec C, Chen JM. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet.* 2010 Mar; 127(3):249-85. Epub 2009 Dec 12. Review.
130. Suh KT, Eun IS, Lee JS. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2010 Sep; 19(9):1545-50. Epub 2010 Apr 2.
131. Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO, Bonjour JP. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral

- density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *J Bone Miner Res.* 1998 Mar; 13(3):363-70.
132. McGuigan FE, Murray L, Gallagher A, Davey-Smith G, Neville CE, Van't Hof R, Boreham C, Ralston SH. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul; 17(7):1273-9.
  133. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour JP. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res.* 1998 Jun; 13(6):925-30.
  134. Ames SK, Ellis KJ, Gunn SK, Copeland KC, Abrams SA. Vitamin D receptor gene Fok1 polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J Bone Miner Res.* 1999 May; 14(5):740-6.
  135. Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *J Bone Miner Metab.* 2002; 20(3):164-9.
  136. COPP DH, CHENEY B. Calcitonin-a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature.* 1962 Jan 27; 193:381-2.
  137. Davis NS, DiSant'Agnese PA, Ewing JF, Mooney RA. The neuroendocrine prostate: characterization and quantitation of calcitonin in the human gland. *J Urol.* 1989 Sep; 142(3):884-8.
  138. Sjöberg HE, Arver S, Bucht E. High concentration of immunoreactive calcitonin of prostatic origin in human semen. *Acta Physiol Scand.* 1980 Sep; 110(1):101-2.
  139. Fischer JA, Tobler PH, Henke H, Tschopp FA. Salmon and human calcitonin-like peptides coexist in the human thyroid and brain. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983 Dec; 57(6):1314-6.
  140. Sexton PM, Hilton JM. Biologically active salmon calcitonin-like peptide is present in rat brain. *Brain Res.* 1992 Nov 20; 596(1-2):279-84.
  141. Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol.* 1982 Jan; 136(1):27-39.

142. Holtrop ME, Raisz LG, Simmons HA. The effects of parathyroid hormone, colchicine, and calcitonin on the ultrastructure and the activity of osteoclasts in organ culture. *J Cell Biol.* 1974 Feb;60(2):346-55.
143. Zaidi M, Pazianas M, Shankar VS, Bax BE, Bax CM, Bevis PJ, Stevens C, Huang CL, Blake DR, Moonga BS, et al. Osteoclast function and its control. *Exp Physiol.* 1993 Nov;78(6):721-39. Review.
144. Wisneski LA. Salmon calcitonin in the acute management of hypercalcemia. *Calcif Tissue Int.* 1990; 46 Suppl: S26-30. Review.
145. Selander KS, Härkönen PL, Valve E, Mönkkönen J, Hannuniemi R, Väänänen HK. Calcitonin promotes osteoclast survival in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Sep 18; 122(2):119-29.
146. Kanaoka K, Kobayashi Y, Hashimoto F, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y, Sakai H. A common downstream signaling activity of osteoclast survival factors that prevent nitric oxide-promoted osteoclast apoptosis. *Endocrinology.* 2000 Aug;141(8):2995-3005.
147. Chesnut CH 3rd, Azria M, Silverman S, Engelhardt M, Olson M, Mindeholm L. Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos Int.* 2008 Apr; 19(4):479-91. Epub 2007 Dec 11. Review.
148. Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 6; 96(14):8253-8.
149. Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Brandi ML, Perretti M, MacIntyre I. Modulation of the effects of osteoprotegerin (OPG) ligand in a human leukemic cell line by OPG and calcitonin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 20; 279(2):391-7.
150. Wallach S, Rousseau G, Martin L, Azria M. Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism. *Bone.* 1999 Nov;25(5):509-16. Review.
151. Gennari C. Analgesic effect of calcitonin in osteoporosis. *Bone.* 2002 May; 30(5 Suppl):67S-70S. Review.
152. Colado MI, Ormazabal MJ, Goicoechea C, Lopez F, Alfaro MJ, Martin MI. Involvement of central serotonergic pathways in analgesia elicited by

- salmon calcitonin in the mouse. *Eur J Pharmacol*. 1994 Feb 11; 252(3):291-7.
153. Clementi G, Prato A, Conforto G, Scapagnini U. Role of serotonin in the analgesic activity of calcitonin. *Eur J Pharmacol*. 1984 Mar 2; 98(3-4):449-51.
154. Silverman SL, Azria M. The analgesic role of calcitonin following osteoporotic fracture. *Osteoporos Int*. 2002 Nov;13(11):858-67. Review.
155. Lyritis GP, Trovas G. Analgesic effects of calcitonin. *Bone*. 2002 May; 30(5 Suppl):71S-74S. Review.
156. Wallach S, Farley JR, Baylink DJ, Brenner-Gati L. Effects of calcitonin on bone quality and osteoblastic function. *Calcif Tissue Int*. 1993 May; 52(5):335-9. Review
157. Azria M. Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone*. 2002 May 30(5 Suppl):80S-83S. Review
158. Wang X, Nakamura M, Mori I, Takeda K, Nakamura Y, Utsunomiya H, Yoshimura G, Sakurai T, Kakudo K. Calcitonin receptor gene and breast cancer: quantitative analysis with laser captures microdissection. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Jan; 83(2):109-17.
159. Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Brandi ML, Perretti M, MacIntyre I. Modulation of the effects of osteoprotegerin (OPG) ligand in a human leukemic cell line by OPG and calcitonin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 20; 279(2):391-7.
160. Sabbisetti VS, Chirugupati S, Thomas S, Vaidya KS, Reardon D, Chiriva-Internati M, Iczkowski KA, Shah GV. Calcitonin increases invasiveness of prostate cancer cells: role for cyclic AMP-dependent protein kinase A in calcitonin action. *Int J Cancer*. 2005 Nov 20; 117(4):551-60.
161. Chait A, Suaudeau C, De Beaurepaire R. Extensive brain mapping of calcitonin-induced anorexia. *Brain Res Bull*. 1995; 36(5):467-72.
162. Paxinos G, Chai SY, Christopoulos G, Huang XF, Toga AW, Wang HQ, Sexton PM. In vitro autoradiographic localization of calcitonin and amylin binding sites in monkey brain. *J Chem Neuroanat*. 2004 Jul;27(4):217-36.

163. Layne JE, Hunt KE, True T, Gill RS, Combos VE, Cline MA. Central calcitonin exerts anorectic effects via the hypothalamus in chicks. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009 May; 92(3):433-8. Epub 2009 Jan 22.
164. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science.* 1991 Nov 15;254(5034):1024-6.
165. Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J.* 1991 Jul;10(7):1635-41.
166. Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron.* 1992 Apr;8(4):811-9.
167. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15; 89(18):8641-5.
168. Mayo KE. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* 1992 Oct;6(10):1734-44
169. Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, et al. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science.* 1993 Mar 12;259(5101):1614-6.
170. Pisegna JR, Wank SA. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 1; 90(13):6345-9.
171. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1; 90(19):8967-71.
172. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology.* 1993 Dec;133(6):2861-70.

173. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun; 54(2):233-46. Review.
174. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr; 1768(4):794-807. Epub 2006 Nov 15. Review.
175. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun; 57(2):279-88. Review.
176. Bjarnadóttir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics.* 2006 Sep; 88(3):263-73. Epub 2006 Jun 6.
177. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998 May 28; 393(6683):333-9.
178. Hoare SR. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today.* 2005 Mar 15; 10(6):417-27. Review.
179. Wolfe LA 3rd, Fling ME, Xue Z, Armour S, Kerner SA, Way J, Rimele T, Cox RF. In vitro characterization of a human calcitonin receptor gene polymorphism. *Mutat Res.* 2003 Jan 28; 522(1-2):93-105.
180. Quinn JM, Morfis M, Lam MH, Elliott J, Katsogiannis V, Williams ED, Gillespie MT, Martin TJ, Sexton PM. Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone.* 1999 Jul; 25(1):1-8.
181. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol.* 2000 Aug; 166(2):235-45. Review.
182. Nakamura M, Zhang ZQ, Shan L, Hisa T, Sasaki M, Tsukino R, Yokoi T, Kaname A, Kakudo K. Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population. *Hum Genet.* 1997 Jan; 99(1):38-41.

183. Taboulet J, Frenkian M, Frendo JL, Feingold N, Jullienne A, de Vernejoul MC. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in post-menopausal women. *Hum Mol Genet*. 1998 Dec;7(13):2129-33.
184. Nakamura M, Morimoto S, Zhang Z, Utsunomiya H, Inagami T, Ogihara T, Kakudo K. Calcitonin receptor gene polymorphism in Japanese women: correlation with body mass and bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 2001 Apr; 68(4):211-5. Epub 2001 Apr 11.
185. Masi L, Becherini L, Colli E, Gennari L, Mansani R, Falchetti A, Becorpi AM, Cepollaro C, Gonnelli S, Tanini A, Brandi ML. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 9; 248(1):190-5.
186. Braga V, Mottes M, Mirandola S, Lisi V, Malerba G, Sartori L, Bianchi G, Gatti D, Rossini M, Bianchini D, Adami S. Association of CTR and COLIA1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2000 Nov;67(5):361-366.
187. Tsai FJ, Chen WC, Chen HY, Tsai CH. The ALUI calcitonin receptor gene polymorphism (TT) is associated with low bone mineral density and susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest*. 2003;55(2):82-7.
188. Zhao HY, Liu JM, Ning G, Zhang LZ, Jiang L, Dai M, Xu MY, Chen JL. Association of calcitonin receptor gene polymorphism with bone mineral density in Shanghai women *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2003 Jun; 25(3):258-61.
189. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Pieńkowski W, Dubiel M, Mrozikiewicz PM Genetic polymorphism of the calcitonin receptor gene and bone mineral density in Polish population of postmenopausal women. *Ginekol Pol*. 2005 Aug; 76(8):612-8.
190. Bandrés E, Pombo I, González-Huarriz M, Rebollo A, López G, García-Foncillas J. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ER alpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest*. 2005 Apr; 28(4):312-21.

191. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol.* 2000 Dec; 81(6):405-22. Review
192. Froesch ER, Zapf J. IGFs/somatomedins: significance for growth. *Prog Clin Biol Res.* 1985; 200:75-89. Review.
193. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of desamino-(1-3)-insulin-like growth factor I on bone cell function in rat calvarial cultures. *Endocrinology.* 1991 Jul;129(1):534-41.
194. Rosen CJ, Donahue LR. Insulinlike growth factors: Potential therapeutic options for osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab.* 1995 Sep; 6(7):235-40.
195. Ammann P, Rizzoli R, Meyer JM, Bonjour JP. Bone density and shape as determinants of bone strength in IGF-I and/or pamidronate-treated ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1996; 6(3):219-27. Erratum in: *Osteoporos Int* 1996; 6(5): preceding 345.
196. Bagi CM, DeLeon E, Ammann P, Rizzoli R & Miller SC. Histo-anatomy of the proximal femur in rats: impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness. *Anatomical Record* 1996; 245 633–644.
197. Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R & Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcified Tissue International* 1997; 61 336–344.
198. Schmid C & Ernst M. Insulin-like growth factors. In *Cytokines and Bone Metabolism.* Ed M Gowen. Boca Raton, Ann Arbor, London 1992: CRC Press, pp 229–265.
199. Caverzasio J & Bonjour JP. Insulin-like growth factor I stimulates Na-dependent Pi transport in cultured kidney cells. *American Journal of Physiology* 1989; 257 F712–F717.
200. Caverzasio J, Montessuit C & Bonjour JP. Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on renal Pi transport and plasma 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 1990; 127 453-459.
201. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. *Endocrinology.* Effects of desamino-(1-3)-insulin-like growth factor I on bone cell function in rat calvarial cultures. *Endocrinology.* 1991 Jul; 129 (1):534-41.



202. Chevalley T, Rizzoli R, Manen D, Caverzasio J, Bonjour JP. Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone*. 1998 Aug; 23(2):103-9.
203. Weber JL May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989 Mar; 44(3):388-96.
204. Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jul; 83(7):2286-90.
205. Gilsanz V, Rogers J, Bilezikian JP, Friez JK & Rosen C .A simple sequence repeat in the IGF-I gene and its relationship to serum IGF-I and peak bone mass in pubertal boys and girls. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Endocrine Society*. 1999 Abstract no. OR23-2.
206. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 1998 Oct; 63(4):306-11.
207. Takacs I, Koller DL, Peacock M, Christian JC, Hui SL, Conneally PM, Johnston CC Jr, Foroud T, Econs MJ. Sibling pair linkage and association studies between bone mineral density and the insulin-like growth factor I gene locus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec; 84(12):4467-71.
208. Berg JP, Lehmann EH, Stakkestad JA, Haug E & Halse J.IGF-I gene microsatellite polymorphisms and serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein 3 and bone mineral density in young individuals. *Proceedings of the Annual Meeting of the Endocrine Society 2000*.Abstract no.1743.
209. Rizzoli R, Ferrari S, Rosen C, Manen D & Bonjour JP.IGF-I gene 5\_ polymorphism influences serum IGF-I level in relation to dietary calcium intake in healthy young males. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000 15 (Suppl 1) S364.

210. van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE, Westendorp RG. Reduced insulin/IGF-1 signaling and human longevity. *Aging Cell*. 2005 Apr; 4(2):79-85.
211. Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL. Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol*. 2001 Apr;26(2):79-94. Review
212. Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, Fielding LJ, Ridout R, Cole DE. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res*. 1999;14:633-43.
213. Galusca B, Zouch M, Germain N, Bossu C, Frere D, Lang F, Lafage-Proust M-H, Thomas T, Vico L, Estour B. Constitutional Thinness: Unusual Human Phenotype of Low Bone Quality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:110-117.
214. Albala C, Yanez M, Devoto E, Sostin C, Zeballos L, Santos JL. Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20:1027-32.
215. Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isaacs C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone*. 2004; 34:376-383.
216. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. *Cell*. 2000;100:197-207.
217. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.
218. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996 Feb 15; 379(6566):632-5.
219. Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR. Leptin directly regulates bone cell

- function in vitro and reduces bone fragility in vivo. *J Endocrinol.* 2002;175:405–415.
220. Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi Y-H, Pennington C, Hartzell D, Baile CA. Leptin Treatment Induces Loss of Bone Marrow Adipocytes and Increases Bone Formation in Leptin-Deficient ob/ob Mice. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2005;20:994–1001.
221. Martin A, de Vittoris R, David V, Moraes R, Begeot M, Lafage-Proust M-H, Alexandre C, Vico L, Thomas T. Leptin Modulates both Resorption and Formation while Preventing Disuse-Induced Bone Loss in Tail-Suspended Female Rats. *Endocrinology.* 2005;146:3652–3659.
222. Bredella MA, Misra M, Miller KK, Madisch I, Sarwar A, Cheung A, Klibanski A, Gupta R. Distal radius in adolescent girls with anorexia nervosa: trabecular structure analysis with high-resolution flat-panel volume CT. *Radiology.* 2008;249:938–46.
223. Lee NJ, Herzog H. NPY regulation of bone remodeling. *Neuropeptides.* 2009 Dec; 43(6):457-63. Epub 2009 Sep 11. Review.
224. Allison SJ, Baldock PA, Herzog H. The control of bone remodeling by neuropeptide Y receptors. *Peptides.* 2007 Feb; 28(2):320-5. Epub 2006 Dec 29.
225. Teixeira L, Sousa DM, Nunes AF, Sousa MM, Herzog H, Lamghari M. NPY revealed as a critical modulator of osteoblast function in vitro: new insights into the role of Y1 and Y2 receptors. *J Cell Biochem.* 2009 Aug 1; 107(5):908-16.
226. Wong IP, Driessler F, Khor EC, Shi YC, Hörmer B, Nguyen AD, Enriquez RF, Eisman JA, Sainsbury A, Herzog H, Baldock PA. Peptide YY regulates bone remodeling in mice: a link between gut and skeletal biology. *PLoS One.* 2012; 7(7):e40038. Epub 2012 Jul 6.
227. Utz AL, Lawson EA, Misra M, Mickley D, Gleysteen S, et al. Peptide YY (PYY) levels and bone mineral density (BMD) in women with anorexia nervosa. *Bone.* 2008; 43:135–139.
228. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2005;20(5):790–798.

229. Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van der Velde M, et al. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *Journal of Endocrinology*. 2006;188(1):37–47.
230. Johannes D. Veldhuis, Cyril Y. Bowers. Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int J Pept*. 2010; 2010: 879503. Published online 2010 March 18.
231. Cameron JR, Mazess RB, Sorenson JA. Precision and accuracy of bone mineral determination by direct photon absorptiometry. *Invest Radiol*. 1968 May-Jun;3(3):141-50.
232. Wahner HW, Dunn WL, Mazess RB, Towsley M, Lindsay R, Markhard L, Dempster D. Dual-photon Gd-153 absorptiometry of bone. *Radiology*. 1985 Jul;156(1):203-6.
233. Blake GM, Fogelman I. Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry. *Semin Nucl Med*. 1997 Jul; 27(3):210-28. Review.
234. Njeh CF, Fuerst T, Hans D, Blake GM, Genant HK. Radiation exposure in bone mineral density assessment. *Appl Radiat Isot*. 1999 Jan; 50(1):215-36. Review.
235. Γεωργίου Ε. In vivo επαναληψιμότητα της απορροφησιομετρίας διπλοενεργειακών φωτονίων DEXA: Μία μεταανάλυση. *Οστούν* 1996; 7: 153-159.
236. Ahmed H. Manufacturer's reference ranges may lead to misdiagnosis of osteopenia and osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996 Suppl 1; 11: S118.
237. Steiger P. Standardization of measurements for assessing BMD by DXA. *Calcif Tissue Int*. 1995 Dec; 57(6):469.
238. Fuleihan GE, Testa MA, Angell JE, Porrino N, Leboff MS. Reproducibility of DXA absorptiometry: a model for bone loss estimates. *J Bone Miner Res*. 1995 Jul; 10(7):1004-14.
239. Reginster JY, Deroisy R, Zegels B, Jupsin I, Albert A, Franchimont P. Long-term performance in vitro and in vivo of dual-energy X-ray absorptiometry. *Clin Rheumatol*. 1995 Mar; 14(2):180-6.
240. Ringertz H, Marshall D, Johansson C, Johnell O, Kullenberg R J, LjunghallS, Saaf M, Wedel H, Hallerby N, Jonsson E, Marke L A, Werko L.

- Bone density measurement: a systematic review. *Journal of Internal Medicine* 1997; 241(Supplement 739): 1-60.
241. Faulkner KG, McClung MR, Ravn DJ. Monitoring skeletal response to therapy in early post-menopausal women: Which bone to measure. *J Bone Min Res* 1996; 11: S96.
242. Cummings SR, Black DM, Nevitt M Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*. 1993 Jan 9; 341(8837):72-5.
243. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis (1994). World Health Organ Tech Rep Ser No 843.
244. Margaret L. Gourlay, MD; Sue A. Brown, MD .Clinical Considerations in Premenopausal Osteoporosis *Arch Intern Med*. 2004; 164:603-614.
245. 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 Jan-Mar; 11(1):43-58.
246. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D, Rizzoli R. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Sep;73(3):555-63
247. Henderson RC, Lark RK, Newman JE, Kecskemthy H, Fung EB, Renner JB, Harcke HT. Pediatric reference data for dual X-ray absorptiometric measures of normal bone density in the distal femur. *AJR Am J Roentgenol*. 2002 Feb; 178(2):439-43.
248. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC, Narasimhan B, Marcus R. Bone mineral acquisition in healthy Asian, Hispanic, black, and Caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec; 84(12):4702-12.
249. Mølgaard C, Thomsen BL, Prentice A, Cole TJ, Michaelsen KF. Whole body bone mineral content in healthy children and adolescents. *Arch Dis Child*. 1997 Jan;76(1):9-15.
250. Faulkner RA, Bailey DA, Drinkwater DT, Wilkinson AA, Houston CS, McKay HA. Regional and total body bone mineral content, bone mineral density,

- and total body tissue composition in children 8-16 years of age. *Calcif Tissue Int.* 1993 Jul;53(1):7-12.
251. Faulkner RA, Bailey DA, Drinkwater DT, McKay HA, Arnold C, Wilkinson AA. Bone densitometry in Canadian children 8-17 years of Age. *Calcif Tissue Int.* 1996 Nov; 59(5):344-51.
252. Ellis KJ, Shypailo RJ, Hardin DS, Perez MD, Motil KJ, Wong WW, Abrams SA. Z score prediction model for assessment of bone mineral content in pediatric diseases. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep; 16(9):1658-64.
253. Binkley TL, Specker BL, Wittig TA. Centile curves for bone densitometry measurements in healthy males and females ages 5-22 yr. *J Clin Densitom.* 2002 Winter; 5(4):343-53.
254. Arabi A, Tamim H, Nabulsi M, Maalouf J, Khalifé H, Choucair M, Vieth R, El-Hajj Fuleihan G. Sex differences in the effect of body-composition variables on bone mass in healthy children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2004 Nov; 80(5):1428-35.
255. Arabi A, Nabulsi M, Maalouf J, Choucair M, Khalifé H, Vieth R, El-Hajj Fuleihan G. Bone mineral density by age, gender, pubertal stages, and socioeconomic status in healthy Lebanese children and adolescents. *Bone.* 2004 Nov;35(5):1169-79.
256. Cromer BA, Binkovitz L, Ziegler J, Harvey R, Debanne SM. Reference values for bone mineral density in 12- to 18-year-old girls categorized by weight, race, and age. *Pediatr Radiol.* 2004 Oct; 34(10):787-92. Epub 2004 Jul 29.
257. Kelly TL, Specker BL, Binkley T, Zemel BS, Leonard MB, Kalkwarf HJ, Moyer-Mileur LJ, Pan H, Cole TJ, Shepherd JA. Pediatric BMD reference database for U.S. white children. *Bone* 2005 36(Suppl1):S30
258. Hasanoğlu A, Tümer L, Ezgü FS. Vertebra and femur neck bone mineral density values in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr.* 2004 Oct-Dec; 46(4):298-302.
259. Ward KA, Ashby RL, Roberts SA, Adams JE, Zulf Mughal M. UK reference data for the Hologic QDR Discovery dual-energy x ray absorptiometry scanner in healthy children and young adults aged 6-17 years. *Arch Dis Child.* 2007 Jan; 92(1):53-9. Epub 2006 Aug 30

260. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Gilsanz V, Lappe JM, Horlick M, Oberfield S, Mahboubi S, Fan B, Frederick MM, Winer K, Shepherd JA. The bone mineral density in childhood study: bone mineral content and density according to age, sex, and race. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun; 92(6):2087-99. Epub 2007 Feb 20.
261. Sala A, Webber CE, Morrison J, Beaumont LF, Barr RD. Whole-body bone mineral content, lean body mass, and fat mass measured by dual-energy X-ray absorptiometry in a population of normal Canadian children and adolescents. *Can Assoc Radiol J.* 2007 Feb; 58(1):46-52.
262. Webber CE, Beaumont LF, Morrison J, Sala A, Barr RD. Age-predicted values for lumbar spine, proximal femur, and whole-body bone mineral density: results from a population of normal children aged 3 to 18 years. *Can Assoc Radiol J.* 2007 Feb; 58(1):37-45.
263. Lu PW, Cowell CT, LLOYD-Jones SA, Briody JN, Howman-Giles R. Volumetric bone mineral density in normal subjects, aged 5-27 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Apr; 81(4):1586-90.
264. Boot AM, de Ridder MA, Pols HA, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan; 82(1):57-62.
265. Fonseca AS, Szejnfeld VL, Terreri MT, Goldenberg J, Ferraz MB, Hilário MO. Bone mineral density of the lumbar spine of Brazilian children and adolescents aged 6 to 14 years. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Mar; 34(3):347-52.
266. van der Sluis IM, de Ridder MA, Boot AM, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Reference data for bone density and body composition measured with dual energy x ray absorptiometry in white children and young adults. *Arch Dis Child.* 2002 Oct; 87(4):341-7; discussion 341-7.
267. Högler W, Briody J, Woodhead HJ, Chan A, Cowell CT. Importance of lean mass in the interpretation of total body densitometry in children and adolescents. *J Pediatr.* 2003 Jul;143(1):81-8.
268. Crabtree NJ, Kibirige MS, Fordham JN, Banks LM, Muntoni F, Chinn D, Boivin CM, Shaw NJ. The relationship between lean body mass and bone

- mineral content in paediatric health and disease. *Bone*. 2004 Oct;35(4):965-72.
269. Horlick M, Wang J, Pierson RN Jr, Thornton JC. Prediction models for evaluation of total-body bone mass with dual-energy X-ray absorptiometry among children and adolescents. *Pediatrics*. 2004 Sep;114(3):e337-45.
270. Crabtree, NJ and Oldroyd, B and Truscott, JG and Fordham, JN and Kibirige, M and Fewtrell, M and Gordon, I and Shaw, NJ (2004) UK paediatric DXA reference data (Ge Lunar Prodigy): Effects of ethnicity, gender & pubertal status. IUK paediatric DXA reference data (Ge Lunar Prodigy): Effects of ethnicity, gender & pubertal status In: *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL*. (pp. S6 - S6).
271. Płudowski P, Matusik H, Olszaniecka M, Lebedowski M, Lorenc RS. Reference values for the indicators of skeletal and muscular status of healthy Polish children. *J Clin Densitom*. 2005 Summer;8(2):164-77.
272. Zanchetta JR, Plotkin H, Alvarez Filgueira M. Bone mass in children: normative values for the 2-20-year-old population. *Bone*. 1995 Apr; 16(4 Suppl):393S-399S.
273. Cheng JC, Leung SS, Lee WT, Lau JT, Maffulli N, Cheung AY, Chan KM. Determinants of axial and peripheral bone mass in Chinese adolescents. *Arch Dis Child*. 1998 Jun;78(6):524-30
274. Shypailo RJ, Ellis KJ. Bone assessment in children: comparison of fan-beam DXA analysis. *J Clin Densitom*. 2005 Winter;8(4):445-53.
275. Sawyer AJ, Bachrach LK, Fung EB. Appendix B: Equations and calculations In: *Bone Densitometry in Growing Patients: Guidelines for Clinical Practice*. Ed Aenor J. Sawyer, Laura K. Bachrach, Ellen B. Fung. Humana Press Inc. Totowa NJ , 2007 pp 197-198
276. A practical guide to bone densitometry in children. National Osteoporosis Society, November 2004, pp 5 [www.nos.org.uk](http://www.nos.org.uk)
277. Genant HK, Grampp S, Glüer CC, Faulkner KG, Jergas M, Engelke K, Hagiwara S, Van Kuijk C. Universal standardization for dual x-ray absorptiometry: patient and phantom cross-calibration results. *J Bone Miner Res*. 1994 Oct; 9(10):1503-14.



278. International Committee for Standards in Bone Measurement. Standardization of proximal femur bone mineral density (BMD) measurements by DXA. *Bone*. 1997 Oct; 21(4):369-70.
279. Hui SL, Gao S, Zhou XH, Johnston CC Jr, Lu Y, Glüer CC, Grampp S, Genant H. Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. *J Bone Miner Res*. 1997 Sep; 12(9):1463-70.
280. Lu Y, Fuerst T, Hui S, Genant HK. Standardization of bone mineral density at femoral neck, trochanter and Ward's triangle. *Osteoporos Int*. 2001;12(6):438-44
281. Fan B, Lu Y, Genant H, Fuerst T, Shepherd J. Does standardized BMD still remove differences between Hologic and GE-Lunar state-of-the-art DXA systems? *Osteoporos Int*. 2010 Jul; 21(7):1227-36. Epub 2009 Oct 27.
282. Centers for Diseases Control and Prevention  
[http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult\\_bmi/index.html](http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html)
283. Chang CJ, Wu CH, Chang CS, Yao WJ, Yang YC, Wu JS, Lu FH. Low body mass index but high percent body fat in Taiwanese subjects: implications of obesity cutoffs. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Feb;27(2):253-9
284. Deurenberg P, Deurenberg-Yap M, Guricci S. Asians are different from Caucasians and from each other in their body mass index/body fat per cent relationship. *Obes Rev*. 2002 Aug;3(3):141-6. Review.
285. Dietz WH, Robinson TN Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. *J Pediatr*. 1998 Feb;132(2):191-3.
286. Horlick M. Body mass index in childhood--measuring a moving target. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep; 86(9):4059-60.
287. Sampei MA, Novo NF, Juliano Y, Sigulem DM. Comparison of the body mass index to other methods of body fat evaluation in ethnic Japanese and Caucasian adolescent girls. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 Mar;25(3):400-8
288. Wang J, Thornton JC, Russell M, Burastero S, Heymsfield S, Pierson RN Jr. Asians have lower body mass index (BMI) but higher percent body fat than do whites: comparisons of anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr*. 1994 Jul; 60(1):23-8.

289. Centers for Diseases Control and Prevention  
[http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens\\_bmi/about\\_childrens\\_bmi.html](http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_childrens_bmi.html)
290. Baylor College of Medicine <http://www.bcBody>
291. National Obesity Observatory. A simple guide to classifying BMI in children, June 2011. [http://www.noo.org.uk/uploads/doc/vid\\_11601](http://www.noo.org.uk/uploads/doc/vid_11601)
292. The children's Hospital of Philadelphia. Body Mass Index and Z-Score Calculation in Children. <http://stokes.chop.edu/web/zscore/>
293. Calculations of Z-scores [http://conflict.lshtm.ac.uk/page\\_125.htm](http://conflict.lshtm.ac.uk/page_125.htm)
294. WHO Anthro. <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>
295. Epi Info. <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/>
296. Nutrition Surveys and Calculations. <http://www.nutrisurvey.de/>
297. Ellis KJ, Shypailo RJ (2001) Body Composition Comparison Data for Children. Retrieved [September 08, 2012] from the Baylor College of Medicine, Children's Nutrition Research Center, Body Composition Laboratory Web Site  
<http://www.bcm.edu/bodycomplab/Applications/zscrmainpage.htm>
298. Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD, McClung M, Hosking D, Yates AJ, Christiansen C. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res.* 1999 Sep; 14(9):1622-7.
299. Lawson EA, Miller KK, Bredella MA, Phan C, Misra M, Meenaghan E, Rosenblum L, Donoho D, Gupta R, Klibanski A. Hormone predictors of abnormal bone microarchitecture in women with anorexia nervosa. *Bone.* 2010 Feb; 46(2):458-63. Epub 2009 Sep 9.
300. Hartman D, Crisp A, Rooney B, Rackow C, Atkinson R, Patel S. Bone density of women who have recovered from anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 2000 Jul; 8(1):107-12.
301. Herzog W, Minne H, Deter C, Leidig G, Schellberg D, Wüster C, Gronwald R, Sarembe E, Kröger F, Bergmann G, et al. Outcome of bone mineral density in anorexia nervosa patients 11.7 years after first admission. *J Bone Miner Res.* 1993 May; 8(5):597-605.

302. Soyka LA, Misra M, Frenchman A, Miller KK, Grinspoon S, Schoenfeld DA, Klibanski A. Abnormal bone mineral accrual in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep; 87(9):4177-85.
303. Walsh CJ, Phan CM, Misra M, Bredella MA, Miller KK, Fazeli PK, Bayraktar HH, Klibanski A, Gupta R. Women with anorexia nervosa: finite element and trabecular structure analysis by using flat-panel volume CT. *Radiology.* 2010 Oct; 257(1):167-74. Epub 2010 Aug 16.
304. Ostrowska Z, Ziora K, Oświęcimska J, Świętochowska E, Szapska B, Wołkowska-Pokrywa K, Dyduch A. RANKL/RANK/OPG system and bone status in females with anorexia nervosa. *Bone.* 2012 Jan; 50(1):156-60. Epub 2011 Oct 6.
305. Vestergaard P, Emborg C, Støvring RK, Hagen C, Mosekilde L, Brixen K. Fractures in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa, and other eating disorders--a nationwide register study. *Int J Eat Disord.* 2002 Nov; 32(3):301-8.
306. Royal College of Psychiatrists, London. Council Report CR130 July 2005. Guidelines for the nutritional management of anorexia nervosa. <http://www.rcpsych.ac.uk/files/pdfversion/cr130.pdf>
307. Stanhope R, Traggiai C. Precocious Puberty (Complete, Partial). Sultan C (ed): *Pediatric and Adolescent Gynecology. Evidence-Based Clinical Practice.* Endocr .Dev .Basel, Karger, 2004, vol7, pp57-65.
308. Dominguez J, Goodman L, Sen Gupta S, Mayer L, Etu SF, Walsh BT, Wang J, Pierson R, Warren MP. Treatment of anorexia nervosa is associated with increases in bone mineral density, and recovery is a biphasic process involving both nutrition and return of menses. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jul; 86(1):92-9.
309. Caillot-Augusseau A, Lafage-Proust MH, Margailan P, Vergely N, Faure S, Paillet S, Lang F, Alexandre C, Estour B. Weight gain reverses bone turnover and restores circadian variation of bone resorption in anorexic patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Jan; 52(1):113-21.
310. Teng K. Premenopausal osteoporosis, an overlooked consequence of anorexia nervosa. *Cleve Clin J Med.* 2011 Jan; 78(1):50-8. Review.

311. Sim LA, McGovern L, Elamin MB, Swiglo BA, Erwin PJ, Montori VM. Effect on bone health of estrogen preparations in premenopausal women with anorexia nervosa: a systematic review and meta-analyses. *Int J Eat Disord.* 2010 Apr; 43(3):218-25. Review
312. What People with Anorexia Nervosa Need to Know About Osteoporosis. NIH Osteoporosis and related bone diseases National Resource Center. [www.niams.nih.gov/bone](http://www.niams.nih.gov/bone)
313. Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR. Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol.* 2010 Sep; 26(9):652-7.
314. Mika C, Holtkamp K, Heer M, Günther RW, Herpertz-Dahlmann B. A 2-year prospective study of bone metabolism and bone mineral density in adolescents with anorexia nervosa. *J Neural Transm.* 2007; 114(12):1611-8. Epub 2007 Aug 6.
315. Misra M, Klibanski A. Bone health in anorexia nervosa. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011 Dec; 18(6):376-82. Review.
316. Bhalla AK. Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010 Jun; 24(3):313-27. Review.
317. Stránský M, Rysavá L. Nutrition as prevention and treatment of osteoporosis. *Physiol Res.* 2009; 58 Suppl 1:S7-S11. Review.
318. Mehler PS, MacKenzie TD. Treatment of osteopenia and osteoporosis in anorexia nervosa: a systematic review of the literature. *Int J Eat Disord.* 2009 Apr; 42(3):195-201. Review.
319. Roztoczyńska D, Starzyk J. The role of a pediatric endocrinologist in diagnostics and therapeutic management of anorexia nervosa--own experiences and review of literature. *Przegl Lek.* 2009; 66(1-2):52-7.
320. Halvorsen I, Platou D, Høiseth A. Bone mass eight years after treatment for adolescent-onset anorexia nervosa. *Eur Eat Disord Rev.* 2012 Sep; 20(5):386-92. Epub 2012 May 3.
321. Wolfert A, Mehler PS. Osteoporosis: prevention and treatment in anorexia nervosa. *Eat Weight Disord.* 2002 Jun; 7(2):72-81.
322. Vescovi JD, Jamal SA, De Souza MJ. Strategies to reverse bone loss in women with functional hypothalamic amenorrhea: a systematic review of the

- literature. *Osteoporos Int.* 2008 Apr; 19(4):465-78. Epub 2008 Jan 8. Review.
323. Misra M, Prabhakaran R, Miller KK, Goldstein MA, Mickley D, Clauss L, Lockhart P, Cord J, Herzog DB, Katzman DK, Klibanski A. Weight gain and restoration of menses as predictors of bone mineral density change in adolescent girls with anorexia nervosa-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Apr; 93(4):1231-7. Epub 2007 Dec 18
  324. Rozen GS, Rennert G, Dodiuk-Gad RP, Rennert HS, Ish-Shalom N, Diab G, Raz B, Ish-Shalom S. Calcium supplementation provides an extended window of opportunity for bone mass accretion after menarche. *Am J Clin Nutr.* 2003 Nov; 78(5):993-8.
  325. Carter LM, Whiting SJ. Effect of calcium supplementation is greater in prepubertal girls with low calcium intake. *Nutr Rev* 1997;55:371-373.
  326. Sentipal JM, Wardlaw GM, Mahan J, Matkovic V. Influence of calcium intake and growth indexes on vertebral bone mineral density in young females. *Am J Clin Nutr* 1991;54:425-428.
  327. Andon MB, Lloyd T, Matkovic V. Supplementation trials with calcium citrate malate: evidence in favor of increasing the calcium RDA during childhood and adolescence. *J Nutr* 1994; 124:1412S-1417S.
  328. Cheng S, Tylavsky F, Kröger H, Kärkkäinen M, Lyytikäinen A, Koistinen A, Mahonen A, Alen M, Halleen J, Väänänen K, Lamberg-Allardt C. Association of low 25-hydroxyvitamin D concentrations with elevated parathyroid hormone concentrations and low cortical bone density in early pubertal and prepubertal Finnish girls. *Am J Clin Nutr.* 2003 Sep; 78(3):485-92.
  329. Brihaye Abadie I, de Tournemire R, Alvin P. Anorexia nervosa: impact on growth and bone mineral density. *Arch Pediatr.* 2003 Sep; 10(9):836-40.
  330. Misra M, Tsai P, Anderson EJ, Hubbard JL, Gallagher K, Soyka LA, Miller KK, Herzog DB, Klibanski A. Nutrient intake in community-dwelling adolescent girls with anorexia nervosa and in healthy adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2006 Oct; 84(4):698-706.

331. Heer M, Mika C, Grzella I, Drummer C, Herpertz-Dahlmann B. Changes in bone turnover in patients with anorexia nervosa during eleven weeks of inpatient dietary treatment. *Clin Chem*. 2002 May; 48(5):754-60.
332. Golden NH. Eating disorders in adolescence: what is the role of hormone replacement therapy? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007 Oct; 19(5):434-9.
333. Lennkh C, de Zwaan M, Bailer U, Strnad A, Nagy C, el Giamal N, Vytiska E, Kasper S. Osteoporosis in anorexia nervosa. New aspects of pathogenesis and therapy. *Nervenarzt*. 1999 Sep; 70(9):823-9.
334. Robinson E, Bachrach LK, Katzman DK. Use of hormone replacement therapy to reduce the risk of osteopenia in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Adolesc Health*. 2000 May; 26(5):343-8.
335. Fenichel RM, Warren MP. Anorexia, bulimia, and the athletic triad: evaluation and management. *Curr Osteoporos Rep*. 2007 Dec; 5(4):160-4.
336. Legroux-Gerot I, Vignau J, Collier F, Cortet B. Bone loss associated with anorexia nervosa. *Joint Bone Spine*. 2005 Dec; 72(6):489-95. Review.
337. Miller KK, Lee EE, Lawson EA, Misra M, Minihan J, Grinspoon SK, Gleysteen S, Mickley D, Herzog D, Klibanski A. Determinants of skeletal loss and recovery in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Aug; 91(8):2931-7. Epub 2006 May 30.
338. Muñoz MT, Morandé G, García-Centenera JA, Hervás F, Pozo J, Argente J. The effects of estrogen administration on bone mineral density in adolescents with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 2002 Jan; 146(1):45-50.
339. Klibanski A, Biller BM, Schoenfeld DA, Herzog DB, Saxe VC. The effects of estrogen administration on trabecular bone loss in young women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Mar; 80(3):898-904.
340. Zacharin M. Current advances in bone health of disabled children. *Curr Opin Pediatr*. 2004 Oct; 16(5):545-51.
341. Jamieson M, Katzman D, Cromer B. Hormone replacement in the adolescent with anorexia and hypothalamic amenorrhea – yes or no ? *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2001 Feb; 14(1):39-45.

342. Liu SL, Lebrun CM. Effect of oral contraceptives and hormone replacement therapy on bone mineral density in premenopausal and perimenopausal women: a systematic review. *Br J Sports Med*. 2006 Jan; 40(1):11-24.
343. Karlsson MK, Weigall SJ, Duan Y, Seeman E. Bone size and volumetric density in women with anorexia nervosa receiving estrogen replacement therapy and in women recovering from anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep; 85(9):3177-82.
344. Grinspoon S, Thomas L, Miller K, Herzog D, Klibanski A. Effects of recombinant human IGF-I and oral contraceptive administration on bone density in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun; 7(6):2883-91.
345. Grinspoon S, Baum H, Lee K, Anderson E, Herzog D, Klibanski A. Effects of short-term recombinant human insulin-like growth factor I administration on bone turnover in osteopenic women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Nov; 81(11):3864-70.
346. Misra M, McGrane J, Miller KK, Goldstein MA, Ebrahimi S, Weigel T, Klibanski A. Effects of rhIGF-1 administration on surrogate markers of bone turnover in adolescents with anorexia nervosa. *Bone*. 2009 Sep; 45(3):493-8. Epub 2009 Jun 10.
347. Misra M, Klibanski A. Bone metabolism in adolescents with anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest*. 2011 Apr; 34(4):324-32. Epub 2011 Feb 7. Review.
348. Howgate DJ, Graham SM, Leonidou A, Korres N, Tsiridis E, Tsapakis E. Bone metabolism in anorexia nervosa: molecular pathways and current treatment modalities. *Osteoporos Int*. 2013 Feb; 24(2):407-21. Epub 2012 Aug 9.
349. Cohen A, Shane E. Treatment of premenopausal women with low bone mineral density. *Curr Osteoporos Rep*. 2008 Mar;6(1):39-46. Review
350. Miller KK, Grieco KA, Mulder J, Grinspoon S, Mickley D, Yehezkel R, Herzog DB, Klibanski A. Effects of risedronate on bone density in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Aug; 89(8):3903-6.
351. Miller KK, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Gleysteen S, Schoenfeld D, Herzog D, Klibanski A. Effects of risedronate and low-dose transdermal

- testosterone on bone mineral density in women with anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jul; 96(7):2081-8. Epub 2011 Apr 27.
352. Stock JL, Bell NH, Chesnut CH 3rd, Ensrud KE, Genant HK, Harris ST, McClung MR, Singer FR, Yood RA, Pryor-Tillotson S, Wei L, Santora AC 2nd. Increments in bone mineral density of the lumbar spine and hip and suppression of bone turnover are maintained after discontinuation of alendronate in postmenopausal women. *Am J Med.* 1997 Oct; 103(4):291-7.
353. Golden NH. Eating disorders in adolescence and their sequelae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003 Feb; 17(1):57-73. Review
354. Golden NH, Iglesias EA, Jacobson MS, Carey D, Meyer W, Schebendach J, Hertz S, Shenker IR. Alendronate for the treatment of osteopenia in anorexia nervosa: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jun; 90(6):3179-85. Epub 2005 Mar 22.
355. Ward L, Tricco AC, Phuong P, Cranney A, Barrowman N, Gaboury I, Rauch F, Tugwell P, Moher D. Bisphosphonate therapy for children and adolescents with secondary osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct17; (4):CD005324. Review.
356. Miljic D, Pekic S, Djurovic M, Doknic M, Milic N, Casanueva FF, Gbatei M, Popovic V. Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol release in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Apr; 91(4):1491-5. Epub 2006 Jan 31.
357. Gross H, Ebert MH, Faden VB, Goldberg SC, Kaye WH, Caine ED, Hawks R, Zinberg N. A double-blind trial of delta 9-tetrahydrocannabinol in primary anorexia nervosa. *J Clin Psychopharmacol.* 1983 Jun; 3(3):165-71.
358. Madhusmita Misra, Anne Klibanski. The Neuroendocrine Basis of Anorexia Nervosa and Its Impact on Bone Metabolism. *Neuroendocrinology.* 2011 March; 93(2): 65–73. Published online 2011 January 13.
359. Weissberger AJ, Ho KK, Lazarus L. Contrasting effects of oral and transdermal routes of estrogen replacement therapy on 24-hour growth hormone (GH) secretion, insulin-like growth factor I, and GH-binding protein in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Feb; 72(2):374-81.



360. Cardim HJ, Lopes CM, Giannella-Neto D, da Fonseca AM, Pinotti JA. The insulin-like growth factor-I system and hormone replacement therapy. *Fertil Steril*. 2001 Feb; 75(2):282-7.
361. Kam GY, Leung KC, Baxter RC, Ho KK. Estrogens exert route- and dose-dependent effects on insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 and the acid-labile subunit of the IGF ternary complex. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 May; 85(5):1918-22.
362. Moll GW Jr, Rosenfield RL, Fang VS. Administration of low-dose estrogen rapidly and directly stimulates growth hormone production. *Am J Dis Child*. 1986 Feb; 140(2):124-7.
363. Ross JL, Cassorla FG, Skerda MC, Valk IM, Loriaux DL, Cutler GB Jr. A preliminary study of the effect of estrogen dose on growth in Turner's syndrome. *N Engl J Med*. 1983 Nov 3; 309(18):1104-6.
364. Misra M, Katzman D, Miller KK, Mendes N, Snelgrove D, Russell M, Goldstein MA, Ebrahimi S, Clauss L, Weigel T, Mickley D, Schoenfeld DA, Herzog DB, Klibanski A. Physiologic estrogen replacement increases bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res*. 2011 Oct; 26(10):2430-8.
365. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20; 230(4732):1350-4.
366. Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet*. 1989 Aug; 83(1):1-15.
367. Holmberg K, Persson ML, Uhlén M, Odeberg J. Pyrosequencing analysis of thrombosis-associated risk markers. *Clin Chem*. 2005 Aug; 51(8):1549-52.
368. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001 Jan; 11(1):3-11. Review.
369. Young JK. Anorexia nervosa and estrogen: current status of the hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Jul; 34(8):1195-200. Epub 2010 Feb 6. Review.
370. Rask-Andersen M, Olszewski PK, Levine AS, Schiöth HB. Molecular mechanisms underlying anorexia nervosa: focus on human gene

- association studies and systems controlling food intake. *Brain Res Rev.* 2010 Mar; 62(2):147-64.Epub 2009 Nov 18.
371. Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):86-9.
372. Versini A, Ramoz N, Le Strat Y, Scherag S, Ehrlich S, Boni C, Hinney A, Hebebrand J, Romo L, Guelfi JD, Gorwood P. Estrogen receptor 1 gene (ESR1) is associated with restrictive anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jul; 35(8):1818-25.Epub 2010 Apr 7.
373. Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Dec; 80(12):3657-61.
374. Wishart JM, Horowitz M, Need AG, Scopacasa F, Morris HA, Clifton PM, Nordin BE. Relations between calcium intake, calcitriol, polymorphisms of the vitamin D receptor gene, and calcium absorption in premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1997 Mar; 65(3):798-802.
375. Elnenaei MO, Chandra R, Mangion T, Moniz C. Genomic and metabolomic patterns segregate with responses to calcium and vitamin D supplementation.*Br J Nutr.* 2011 Jan; 105(1):71-9.Epub 2010 Aug 23.
376. DSM-5 proposed criteria were retrieved from the site of APA (American Psychiatric Association). Τελευταία επίσκεψη στο site στις 13 Νοεμβρίου 2012  
<http://www.dsm5.org/proposedrevisions/pages/proposedrevision.aspx?rid=24>
377. Zintzaras E, Santos M. Estimating the mode of inheritance in genetic association studies of qualitative traits based on the degree of dominance index *BMC Med Res Methodol.* 2011 Dec 21; 11:171
378. Lerner UH. Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006 Jan-Mar; 6(1):87-95.Review

379. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):355-60
380. Sexton PM, Adam WR, Moseley JM, Martin TJ, Mendelsohn FA. Localization and characterization of renal calcitonin receptors by in vitro autoradiography. *Kidney Int*. 1987 Dec;32(6):862-8
381. Sexton PM. Central nervous system binding sites for calcitonin and calcitonin gene-related peptide. *Mol Neurobiol*. 1991;5(2-4):251-73. Review
382. Potes CS, Lutz TA. Brainstem mechanisms of amylin-induced anorexia. *Physiol Behav*. 2010 Jul 14; 100(5):511-8. Epub 2010 Mar 11.
383. Chance WT, Balasubramaniam A, Zhang FS, Wimalawansa SJ, Fischer JE. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Brain Res*. 1991 Jan 25; 539(2):352-4.
384. Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Sexton PM. Amylin receptors: molecular composition and pharmacology. *Biochem Soc Trans*. 2004 Nov; 32(Pt 5):865-7. Review
385. Datta HK, Zaidi M, Wimalawansa SJ, Ghatei MA, Beacham JL, Bloom SR, MacIntyre I. In vivo and in vitro effects of amylin and amylin-amide on calcium metabolism in the rat and rabbit. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Jul 31;162(2):876-81
386. Bronský J, Průsa R. Amylin fasting plasma levels are decreased in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2004 Mar; 15(3):243-7. Epub 2003 Nov 7.
387. Χαρσούλης ΦΚ. Αμυλίνη (Πολυπεπτίδιο αμυλοειδούς των νησιδίων): Βιολογικές ιδιότητες και ο πιθανός ρόλος στην παθογένεση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 7,2:85-92:1994 Ανασκόπηση.
388. Dacquin R, Davey RA, Laplace C, Levasseur R, Morris HA, Goldring SR, Gebre-Medhin S, Galson DL, Zajac JD, Karsenty G. Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol*. 2004 Feb 16;164(4):509-14.
389. Cornish J, Grey A, Callon KE, Naot D, Hill BL, Lin CQ, Balchin LM, Reid IR. Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin,

- adrenomedullin, and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 21; 318(1):240-6.
390. Wojcik MH, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Klibanski A, Miller KK. Reduced amylin levels are associated with low bone mineral density in women with anorexia nervosa. *Bone*. 2010 Mar; 46(3):796-800. Epub 2009 Nov 18.
391. Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Ghirri P, Cosenza GM, Buggiani B. Calcitropic hormones in osteoporosis caused by anorexia nervosa. *Minerva Pediatr*. 1989 Feb;41(2):61-5
392. Olmos JM, Riancho JA, Amado JA, Freijanes J, Menéndez-Arango J, González-Macías J. Vitamin D metabolism and serum binding proteins in anorexia nervosa. *Bone*. 1991;12(1):43-6.
393. Kirriike N, Iketani T, Nakanishi S, Nagata T, Inoue K, Okuno M, Ochi H, Kawakita Y. Reduced bone density and major hormones regulating calcium metabolism in anorexia nervosa. *Acta Psychiatr Scand*. 1992 Nov; 86(5):358-63.
394. Purdue BW, Tilakaratne N, Sexton PM. Molecular pharmacology of the calcitonin receptor. *Receptors Channels*. 2002; 8(3-4):243-55.
395. Pickar D, Cohen MR, Naber D, Cohen RM. Clinical studies of the endogenous opioid system. *Biol Psychiatry*. 1982 Nov; 17(11):1243-76.
396. Galusca B, Zouch M, Germain N, Bossu C, Frere D, Lang F, Lafage-Proust MH, Thomas T, Vico L, Estour B. Constitutional thinness: unusual human phenotype of low bone quality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jan; 93(1):110-7.
397. Sowińska-Przepiera E, Andrysiak-Mamos E, Chelstowski K, Adler G, Friebe Z, Syrenicz A. Association between ER- $\alpha$  polymorphisms and bone mineral density in patients with Turner syndrome subjected to estroprogestagen treatment-a pilot study. *J Bone Miner Metab*. 2011 Jul; 29(4):484-92. Epub 2011 Jan 27.

