

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Γ' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών**  
**Καθηγήτρια : Παπαευαγγέλου Βασιλική**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του οιστρογονικού  
υποδοχέα τύπου α σε κορίτσια με πρόιμη ήβη. Συσχέτιση με  
αυξολογικά στοιχεία**

**ΣΟΦΙΑ Β. ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ**  
**ΙΑΤΡΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2023**

Ημερομηνία έναρξης εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής 05/11/2015

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 01/02/2023

Ημερομηνία δημοσίας υποστήριξης της διδακτορικής διατριβής 24/03/2023

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Γεράσιμος Δ. Σιάσος

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Παπαδημητρίου Αναστάσιος**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής-Ενδοκρινολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπων της Διατριβής

**Παπαευαγγέλου Βασιλική**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Λοιμωξιολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών

**Πρίφτης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής – Παιδιατρικής Πνευμονολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Παπαδημητρίου Αναστάσιος**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής-Ενδοκρινολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιβλέπων της Διατριβής

**Παπαευαγγέλου Βασιλική**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής - Λοιμωξιολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών

**Πρίφτης Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής - Παιδιατρικής Πνευμονολογίας  
Πανεπιστημίου Αθηνών

**Κανακά-Gantenbein Χριστίνα**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου  
Αθηνών

**Ντινόπουλος Αργύριος**, Καθηγητής Παιδιατρικής Νευρολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

**Δούρος Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

**Φώτης Λάμπρος**, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

**Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διδακτορική διατριβή : Άριστα**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή γνώμών του συγγραφέα. (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2)*

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ, ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΙΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΑΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΛΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

## Σύντομο βιογραφικό σημείωμα

### Σπουδές

2012 Αποφοίτηση από Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### Επαγγελματική εμπειρία

2013-2015 Ειδικευόμενη Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Νομού Κεφαλονιάς, Αργοστόλι, Ελλάδα

2015-2017 Επιστημονικός συνεργάτης στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών, Παιδιατρική Ενδοκρινολογική Κλινική, Αθήνα, Ελλάδα

2016-2017 Ιατρός, Εθνικό Κέντρο Έκτακτης Ανάγκης Υγείας, Μονάδα Ιατρικής Καταστροφών του Υπουργείου Υγείας, (ΕΚΕΡΥ). <https://www.ekepy.gov.gr/>.

2017-2018 Ειδικευόμενη Παθολογίας Hôpital Fribourgeois de Riaz (HFR), Riaz, Ελβετία

2018-2019 Ειδικευόμενη στο τμήμα πρόληψης και θεραπείας της παχυσαρκία, Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβητολογίας και Μεταβολισμού, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο (CHUV), Λωζάνη, Ελβετία

2019-2021 Ειδικευόμενη Παθολογίας CHUV, Λωζάνη Ελβετία

11/2020-4/2021 Ειδικευόμενη ιατρος, Τμήμα ενδοκρινολογίας, διαβητολογίας και μεταβολισμού, (CHUV), Λωζάνη Ελβετία

2021-2022 Ειδικευόμενη Ενδοκρινολογίας, Διαβητολογίας και Μεταβολισμού, Endodia Centre, Biel/Bienne, Ελβετία

9/2022- Ειδικευόμενη στην Πανεπιστημιακή κλινική Διαβήτη, Ενδοκρινολογίας, Διατροφικής Ιατρικής και Μεταβολισμού, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Βέρνης Inselspital , Ελβετία

### Μεταπτυχιακές σπουδές

2015-2022 Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα  
Μελέτη των πολυμορφισμών XbaII και PvuII του υποδοχέα οιστρογόνων τύπου α σε κορίτσια με πρόωμη ήβη. Συσχέτιση με αυξολογικά στοιχεία

### Πιστοποιήσεις

2019 Ελβετικές εξετάσεις FMH (Foederatio Medicorum Helveticorum / Ελβετικός Ιατρικός Σύλλογος) για την απόκτηση του τίτλου Παθολογίας

### Δημοσιεύσεις

1. **Theodoropoulou S**, Papadopoulou A, Karapanou O, Priftis K, Papaevangelou V, Papadimitriou A. Study of XbaI and PvuII Polymorphisms of Estrogen Receptor alpha (ERα) Gene in Girls with Precocious/Early Puberty. *Endocrine*. Δημοσιεύθηκε στο διαδίκτυο στις 4 Μαΐου 2021. doi:10.1007/s12020-021-02695-0
2. **Theodoropoulou S**, Kopp P, Pongan D. Blanchiment volontaire de la peau avec complications sombres. DOI: <https://doi.org/10.4414/fms.2022.09115>, **Forum Med Suisse**. 2022;22(42):696-698

## Posters

Marakakis C, **Theodoropoulou S**, Papadimitriou D, Dermizaki E, Papadimitriou A. The evolution of bone age in girls with premature adrenarche. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology. Paris, France, 2016.

P2-P63 Horm Res Paediatr 2016;86(suppl 1):1-556. doi: 10.1159/000449142

## Υποτροφίες

2009 Υποτροφία για τις σπουδές στην Ιατρική Σχολή Αθηνών από το Τμήμα Κληροδοτημάτων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου. Αθηνών, Κληροδότημα "Α. Παπαδάκη

## Γλώσσες

Ελληνική

Γαλλικά: Επίπεδο C2

Αγγλικά: Επίπεδο C2

Γερμανικά: Επίπεδο B2

Στον σύζυγό μου Δημήτρη  
και στους γονείς μου  
που πάντα με στηρίζουν



## Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω,

Τον Ομότιμο Καθηγητή Παιδιατρικής-Ενδοκρινολογίας **κ. Αναστάσιο Παπαδημητρίου** ο οποίος με μύησε στον κοσμο της ενδοκρινολογίας , εμπνευστηκε το θεμα και το σχεδιασμό της μελέτης, και με εμπιστεύτηκε με την εκπονηση της. Ως Επιβλέπων της εργασίας, και μέντορας μου, με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια και ήταν ο ακρογωνιαίος λίθος στη συγγραφή και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Την Μοριακή Βιολόγο και υπεύθυνη του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής, **κ. Άννα Παπαδοπούλου** για τη βοήθειά της, στην διεκπεραίωση και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων της εργασίας καθώς για την αμέριστη συμπαράστασή της σε επιστημονικό, υλικο- και τεχνικό επίπεδο σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Την Καθηγητρια Παιδιατρικής – Λοιμωξιολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής **κ. Βασιλικη Παπαευαγγελου** η οποια, με υποδέχθηκε στην Γ' Παιδιατρική Κλινική για την βοθηεια και συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παιδιατρικής – Παιδιατρικής Πνευμονολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής **κ. Κωνσταντίνο Πρίφτη** για την γενικότερη υποστήριξη του κατά την υλοποιηση της διατριβής.

Την ενδοκρινολόγο **κ. Ολγα Καραπάνου** για την συμβολή της στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης.

Όλες τις ειδικευόμενες ιατρούς και νοσηλεύτριες της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής για τη συμμετοχή τους στην ομάδα ελέγχου.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλω στον στατιστικολόγο **κ. Αλέξανδρο Γρυπάρη** για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

# Περιεχόμενα

## 1. Γενικό Μέρος

- 1.1 Εισαγωγή.....
- 1.2 Φυσιολογία της ήβης .....
- 1.3 Τα στάδια της ήβης .....
- 1.4 Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την έναρξη της ήβης.....
- 1.5 Πρώιμη ήβη.....
- 1.6 Διάγνωση της πρώιμης ήβης.....
- 1.7 Θεραπεία κεντρικής πρώιμης ήβης.....
- 1.8 Το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα.....
  - 1.8.1 Πολυμορφισμοί οιστρογονικών υποδοχέων.....
  - 1.8.2 Πολυμορφισμοί ERα και έναρξη ήβης.....
- 1.9 Πολυμορφισμοί οιστρογονικών υποδοχέων και καρκίνος του μαστού...
- 1.10 Πολυμορφισμοί του ERα και οστεοπόρωση.....
- 1.11 Πολυμορφισμοί ER και στεφανιαία νόσος.....
- 1.12 Πολυμορφισμοί ER και καρκίνος του ενδομητρίου.....
- 1.13 Πολυμορφισμοί ER και καρκίνος των ωοθηκών.....
- 1.14 Πολυμορφισμοί ER και αναπαραγωγικά γεγονότα.....

## 2. Ειδικό Μέρος

- 2.1 Ασθενείς και Μέθοδοι.....

<b>2.2</b>	<b>Προσδιορισμός Γονότυπου.....</b>
<b>2.3</b>	<b>Στατιστική Ανάλυση.....</b>
<b>2.4</b>	<b>Αποτελέσματα.....</b>
<b>2.5</b>	<b>Συζήτηση.....</b>
<b>2.6</b>	<b>Βιβλιογραφία.....</b>

# Γενικό Μέρος

## 1.1 Εισαγωγή

Εφηβεία με την ευρεία έννοια του όρου, είναι η περίοδος αύξησης και ανάπτυξης του ανθρώπου, κατά την οποία το ανώριμο παιδί μεταμορφώνεται σε άτομο ικανό για αναπαραγωγή. Από βιολογική σκοπιά, η εφηβεία περιλαμβάνει όχι μόνο τις σωματικές αλλά και τις ψυχοκοινωνικές μεταβολές που εκφράζονται με τη συμπεριφορά, ενώ ο όρος «ήβη» αναφέρεται μόνο στις σωματικές μεταβολές (1). Πρόκειται για μια πολύπλοκη αναπτυξιακή διαδικασία η οποία αρχίζει στο τέλος της παιδικής ηλικίας και χαρακτηρίζεται από:

- Ωρίμανση του υποθαλαμικού- υποφυσιακού-γοναδικού (HPG) άξονα
- Εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτηριστικών της ήβης
- Επιτάχυνση της ανάπτυξης (εφηβική αυξητική έκρηξη)
- (τελικά) Ικανότητα για γονιμοποίηση

Η έναρξη της ήβης χαρακτηρίζεται στα κορίτσια από την ανάπτυξη των μαζικών αδένων, ενώ στα αγόρια από την αύξηση του μεγέθους των όρχεων, δηλαδή απόκτηση ορχικού όγκου >3ml. Με βάση μελέτες που διεξήχθησαν πριν από περισσότερα από 50 χρόνια, τα φυσιολογικά όρια της έναρξης της ήβης ορίζονται στα κορίτσια σε ηλικία μεταξύ 8 και 13 χρόνων και στα αγόρια μεταξύ 9 και 14 χρόνων (2,3). Ωστόσο, μελέτες της έναρξης της ήβης δείχνουν ότι στα σύγχρονα κορίτσια η ήβη φαίνεται να αρχίζει νωρίτερα. Σε μελέτη κοριτσιών του ελληνικού πληθυσμού, βρέθηκε ότι, στην εποχή μας, τα όρια έναρξης της ήβης μπορεί να είναι λίγο μικρότερα, δηλ. μεταξύ 7.5 και 12.5 χρ (4). Παρά ταύτα επειδή υπάρχει αβεβαιότητα για τα φυσιολογικά όρια έναρξης της ήβης, οι περισσότεροι παιδίατροι/ενδοκρινολόγοι συνεχίζουν να χρησιμοποιούν τα όρια που ετέθησαν πριν από περισσότερο από μισό αιώνα.

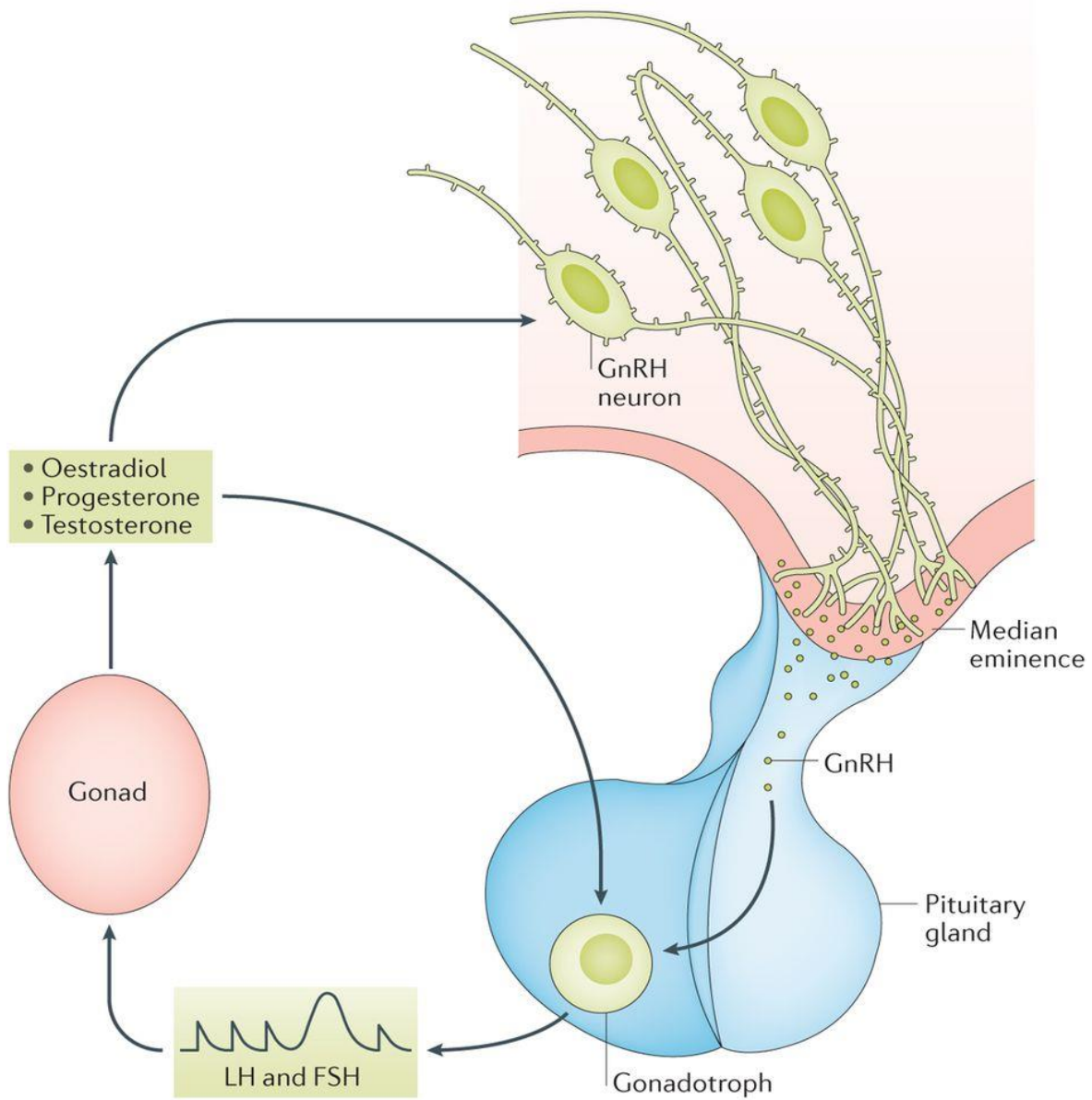
Η ήβη χαρακτηρίζεται ως συμβατική όταν ακολουθεί τη φυσιολογική αλληλουχία των εφηβικών αλλαγών, ενώ αντίθετα η μη φυσιολογική αλληλουχία των γεγονότων οδηγεί σε μη φυσιολογική ήβη.

Οι συνέπειες των διαταραχών της σεξουαλικής ανάπτυξης στα παιδιά είναι τόσο σωματικές όσο και ψυχολογικές. Θα πρέπει κάποιος να έχει κατανοήσει πλήρως τη φυσιολογία και τον χρονισμό των συμβάντων στη φυσιολογική ήβη, για να διαχειριστεί τις περιπτώσεις κοριτσιών που πιθανολογείται ότι παρουσιάζουν διαταραχή στην εφηβική ανάπτυξη (1).

## 1.2 Η φυσιολογία της ήβης

Η ήβη είναι η περίοδος κατά την οποία το ανθρώπινο σώμα ετοιμάζεται να καταστεί ικανό για αναπαραγωγή. Χαρακτηρίζεται από την αύξηση και ωρίμανση των γεννητικών οργάνων, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, την επιτάχυνση της γραμμικής ταχύτητας αύξησης (την εφηβική αυξητική έκρηξη) και, στα κορίτσια, την έναρξη της έμμηνης ρύσης (εμμηναρχή). Η περίοδος αυτών των γρήγορων αλλαγών στην ανθρώπινη φυσιολογία και ψυχολογία ρυθμίζεται από ορμονικούς μηχανισμούς (5).

Η έναρξη της ήβης εμφανίζεται μετά την επανενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (γοναδοστάτης GnRH). Αυτός ο άξονας ενεργοποιείται για πρώτη φορά κατά τη βρεφική ηλικία, όταν συμβαίνει μια φυσιολογική μεταγεννητική αύξηση των γοναδοτροπινών, που ορίζεται ως «μίνι-εφηβεία» της βρεφικής ηλικίας. Αν και η «μίνι εφηβεία» κορυφώνεται στους 1-3 μήνες της ζωής, στα κορίτσια μπορεί να διαρκέσει όσο το δεύτερο έτος της ζωής (6). Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της γοναδοτροπίνης μειώνεται στα επίπεδα της προεφηβικής ηλικίας λόγω της ανάπτυξης ενδογενών μηχανισμών στο κεντρικό νευρικό σύστημα που καταστέλλουν τον άξονα HPG. Η εφηβεία ξεκινά όταν απελευθερώνεται αυτή η καταστολή. Αν και δεν έχει διακριβωθεί απολύτως ο ακριβής μηχανισμός που πυροδοτεί την έναρξη της ήβης, η αρχή της ήβης φαίνεται να καθορίζεται από μία απότομη αύξηση των επιπέδων της GnRH, η οποία εκκρίνεται από τους αντίστοιχους υποθαλαμικούς νευρώνες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης των γοναδοτροπινών -της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH)- από την υπόφυση, αρχικά της LH κατά τη διάρκεια του ύπνου, ενώ καθώς η ήβη εξελίσσεται η έκκριση αυτή γίνεται σε όλο το 24ωρο. Η FSH διεγείρει την ανάπτυξη των ωοθηκών, οι οποίες με τη σειρά τους παράγουν τα οιστρογόνα. Μετά την ωορρηξία, η LH διεγείρει την έκκριση προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο.



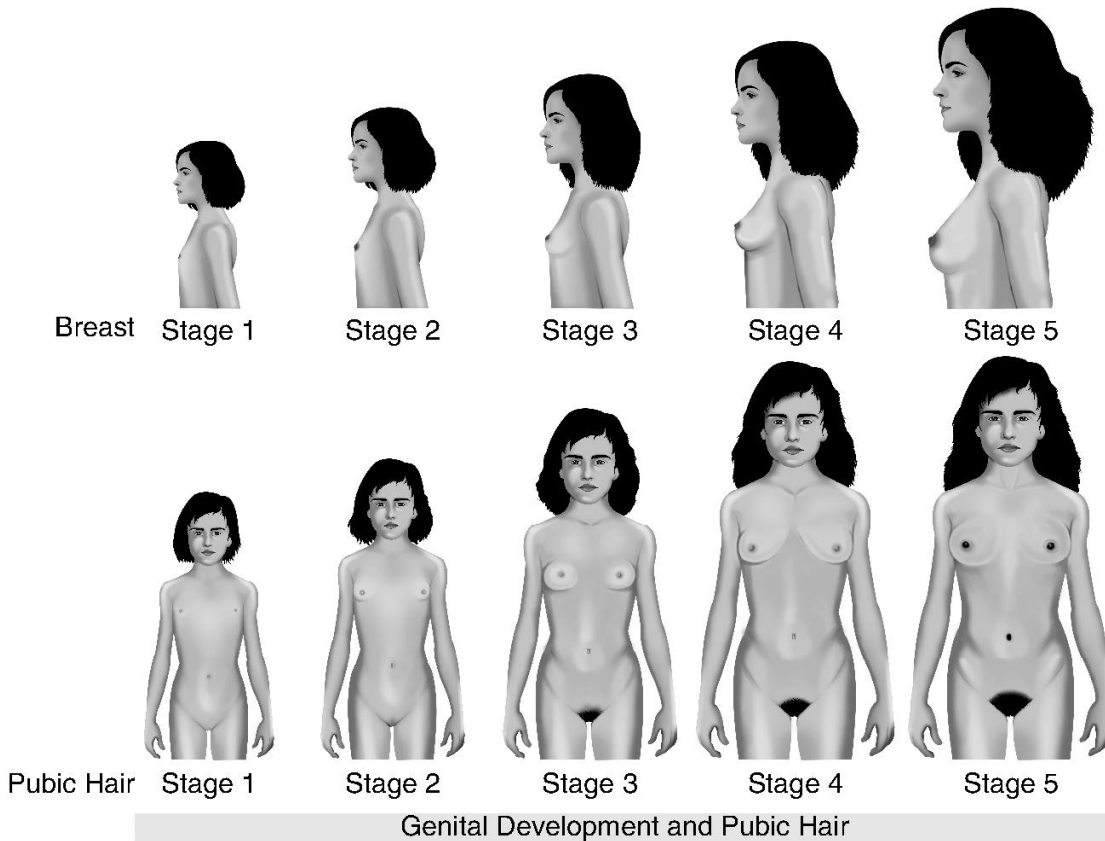
Nature Reviews | Endocrinology

Σχήμα 1: Ορμονικός έλεγχος της ηβικής ανάπτυξης

## 1.3 Τα στάδια της ήβης

### Σωματικές μεταβολές

Η έναρξη της ήβης σηματοδοτείται από την διόγκωση και ανάπτυξη των μαζικών αδένων. Για κλινικούς σκοπούς, ο Tanner διαβάθμισε την ανάπτυξη των μαζικών αδένων σε 5 στάδια.



Σχήμα 2. Τα στάδια της ήβης στα κορίτσια κατά Tanner.

**Στάδιο 1.** Προεφηβικό. Προεξέχει μόνο η θηλή, όπως συμβαίνει και στις μικρότερες ηλικίες

**Στάδιο 2.** Μικρή διόγκωση του μαζικού αδένου, της άλως και της θηλής. («μπουμπούκιασμα του στήθους» - breast bud)

**Στάδιο 3.** Ο μαζικός αδένου και η άλως αυξάνονται ακόμη περισσότερο και ομότιμα

**Στάδιο 4.** Η άλως και η θηλή σχηματίζουν ένα έπαρμα που προεξέχει από τον υπόλοιπο μαστό (second bud).

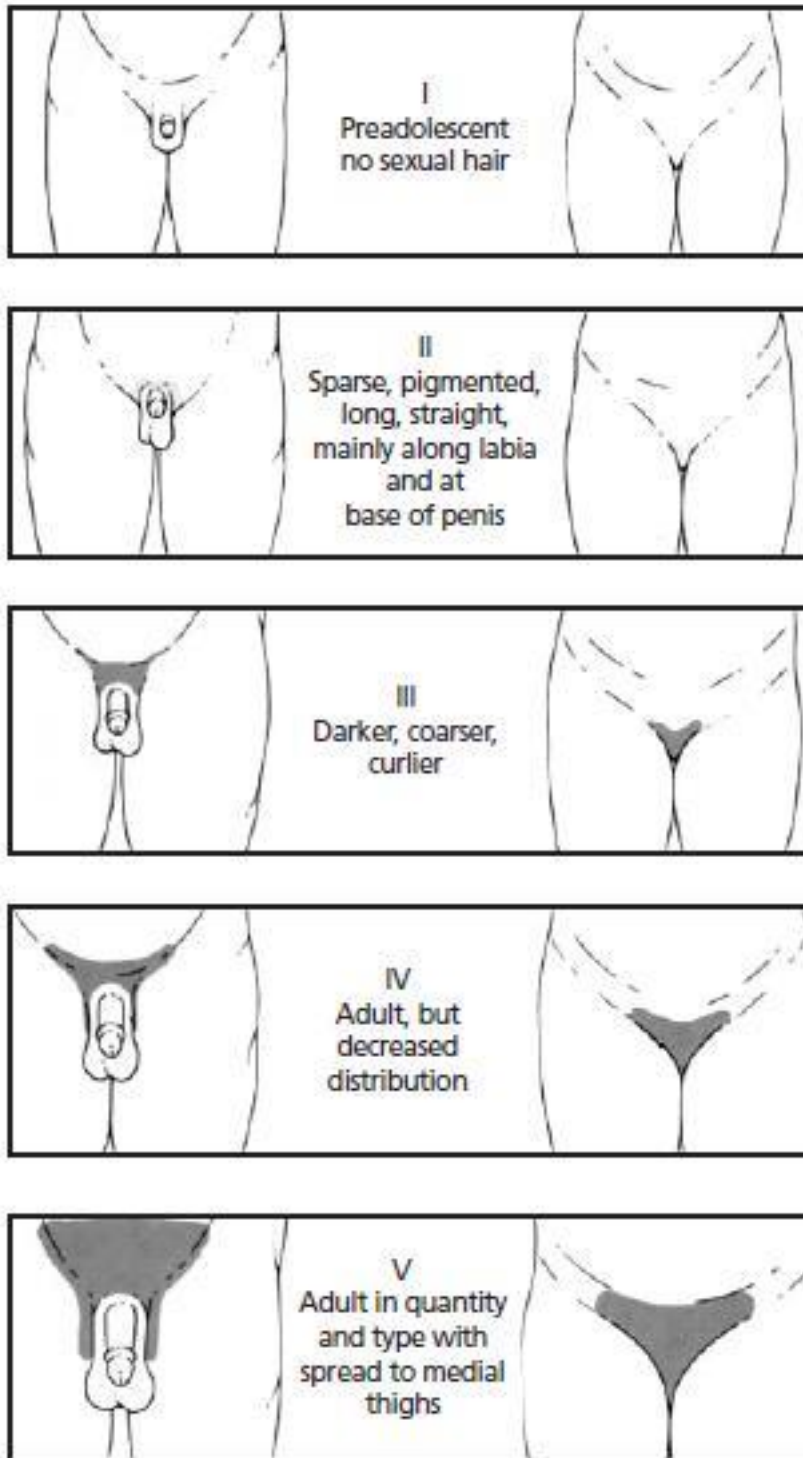
**Στάδιο 5.** Ωριμο στάδιο. Η άλως έχει υποχωρήσει και δεν προεξέχει πια από τον υπόλοιπο μαστό.

Η διαδικασία της μετάβασης από το στάδιο 2 στο στάδιο 5 χρειάζεται κατά μέσο όρο 3-4 χρόνια, όμως ενδέχεται να χρειαστεί μόνο 1,5 χρόνο ή σπανίως περισσότερα από 5 χρόνια.

Ως αδρεναρχή ορίζεται η εμφάνιση κλινικών σημείων της ήβης τα οποία εξαρτώνται από τα επινεφριδικά ανδρογόνα (τριχοφυΐα στην περιοχή του εφηβαίου και της μασχάλης, λιπαρό δέρμα και τριχωτό κεφαλής, ακμή και οσμή τύπου ενηλίκου). Η αδρεναρχή, συνήθως προηγείται της γοναδαρχής (έναρξη λειτουργίας των γονάδων), αρχίζει στην ηλικία των 6-8 ετών και συνεχίζεται μέχρι το τέλος της ήβης (7).

Η τρίχωση στο εφήβαιο εμφανίζεται συνήθως 6-12 μήνες μετά την ανάπτυξη των μαζικών αδένων. Σε αρκετά όμως κορίτσια (περί το 1/3) η τρίχωση προηγείται και αποτελεί το πρώτο εύρημα, που δηλώνει ότι πλησιάζει η έναρξη της ήβης. Τα στάδια ανάπτυξης της τρίχωσης του εφηβαίου κατά Tanner και για τα δυο φύλα είναι τα ίδια (Σχήμα 3).





Σχήμα 3: Διαβάθμιση της ανάπτυξης της τρίχωσης εφηβικού κατά Tanner

**Στάδιο 1.** Προεφηβικό, μη ανάπτυξη τρίχωσης

**Στάδιο 2.** Αραιή τρίχωση κατά μήκος των μεγάλων χειλέων του αιδοίου (ή στη βάση του πέους, για τα αγόρια). Οι τρίχες είναι μακριές, υπέρχρωμες, ίσιες ή ελαφρώς κατσαρές

**Στάδιο 3.** Η τρίχωση επεκτείνεται στην περιοχή πάνω από την ηβική σύμφυση και οι τρίχες είναι σημαντικά πιο σκούρες, πιο σκληρές και πιο κατσαρές

**Στάδιο 4.** Τρίχωση τύπου ενηλίκου, αλλά μικρότερης έκτασης

**Στάδιο 5.** Τρίχωση τύπου ενηλίκου σε πυκνότητα και κατανομή (σχήμα ανεστραμμένου τριγώνου). Η τρίχωση συχνά επεκτείνεται και στην έσω επιφάνεια των μηρών.

Η ανάπτυξη τρίχωσης στη μασχάλη διακρίνεται σε 3 στάδια (κοινά για τα δυο φύλα). Στο στάδιο 1 δεν υπάρχει τρίχωση, στο στάδιο 2 υπάρχει μικρή ανάπτυξή της, ενώ στο στάδιο 3, η τρίχωση μοιάζει σε κατανομή και ποιότητα με αυτή του ενηλίκου.

Κατά την προεφηβική περίοδο παρατηρείται μικρή αλλά σταθερή αύξηση του μεγέθους των ωοθηκών. Μικρά ωοθυλάκια παρατηρούνται από τη βρεφική ακόμη ηλικία, τα οποία αυξάνονται σταδιακά σε μέγεθος και αριθμό καθώς πλησιάζει η ήβη. Ο όγκος των ωοθηκών στο υπερηχογράφημα κατά την έναρξη της ήβης υπερβαίνει τα 2ml. Η οιστρογονική διέγερση από τις ωοθήκες αυξάνει το μέγεθος της μήτρας (επιμήκης διάμετρος >35 χιλ. δηλώνει έναρξη ήβης) και καθιστά το ενδομήτριο ευδιάκριτο.

Η εμμηναρχή εμφανίζεται συνήθως 2-3 χρόνια μετά τη θηλαρχή, στο στάδιο 4 κατά Tanner, ενώ περί το 25% των κοριτσιών εμφανίζει εμμηναρχή σε στάδιο 3. Σε ηλικία 15 ετών το 98% των κοριτσιών θα έχει εμμηναρχή (8). Παρά τις διακυμάνσεις παγκοσμίως και εντός του πληθυσμού των ΗΠΑ, τις τελευταίες δεκαετίες, η μέση ηλικία εμμηναρχής έχει παραμείνει σχετικά σταθερή μεταξύ 12 και 13 ετών (8,9). Ο αμερικανικός εθνικός οργανισμός υγείας αλλά και διατροφικές έρευνες δεν διαπίστωσαν σημαντική μεταβολή στη μέση ηλικία εμμηναρχής τα τελευταία 30 χρόνια, εκτός από τον μη ισπανόφωνο μαύρο πληθυσμό, ο οποίος εμφανίζει 5,5 μήνες νωρίτερα τη μέση ηλικία εμμηναρχής από ό,τι πριν από 30 χρόνια (8). Στην Ελλάδα, η ηλικία εμμηναρχής εξετάστηκε από διάφορους ερευνητές κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα. Το έτος 1935, η Malaspina σε μελέτη της σε κορίτσια από όλη τη χώρα διαπίστωσε ότι η εμμηναρχή συνέβη στο 37,1% των κοριτσιών κατά το έτος που ακολούθησε τα 13α γενέθλιά τους και στο 26,5% μετά το 14ο έτος, ενώ μόνο το 18,6% είχε εμμηναρχή μετά το 12ο έτος (10). Το 1979, οι Dacou-Voutetakis et al διαπίστωσαν ότι η μέση ηλικία εμμηναρχής ήταν 12,5 έτη σε κορίτσια που ζούσαν στην Αθήνα (11) και την ίδια περίπου εποχή, οι Mantzagriotis-Meimaridis, σε μια πανελλαδική μελέτη, διαπίστωσαν ότι η μέση ηλικία εμμηναρχής ήταν 12,59 έτη (12). Το 1996, οι Papadimitriou et al διαπίστωσαν ότι η μέση ηλικία εμμηναρχής σε μαθήτριες που ζούσαν στην Αθήνα ήταν 12,27 έτη και η διάμεσος 12,1 έτη (13), ωστόσο οι ίδιοι ερευνητές σε μεταγενέστερες μελέτες, 10 και 20 χρόνια αργότερα, βρήκαν ότι η ηλικία εμμηναρχής

παρέμεινε η ίδια, στα 12,27 χρόνια (14, 15) Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι κατά τον 20ό αιώνα υπήρχε μια συνεχιζόμενη τάση προς την μικρότερη ηλικία εμμηναρχής στον ελληνικό πληθυσμό, φαίνεται όμως ότι τα τελευταία 25 χρόνια η τάση αυτή έχει σταματήσει.

## **Αύξηση του σώματος**

Κατά την ήβη επιταχύνεται η αύξηση του ύψους του σώματος και μεταβάλλονται το σχήμα και η σύνθεσή του. Η επιτάχυνση της αύξησης κατά την ήβη χαρακτηρίζεται ως «εφηβική αυξητική έκρηξη» (adolescent growth spurt). Μετά τη γέννηση και μέχρι την έναρξη της ήβης ο ρυθμός αύξησης συνεχώς ελαττώνεται. Κατά τα προεφηβικά χρόνια ο ετήσιος ρυθμός αύξησης σε ύψος και στα δυο φύλα είναι 5-6 cm. Στα κορίτσια η επιτάχυνση της αύξησης αρχίζει με την έναρξη της ήβης και η ταχύτητα με την οποία αυξάνεται το ύψος (height velocity) κορυφώνεται μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> σταδίου Tanner. Στα αγόρια η επιτάχυνση αρχίζει δυο χρόνια αργότερα μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> σταδίου (ορχικός όγκος 10ml) και κορυφώνεται μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> σταδίου (ορχικός όγκος τουλάχιστον 12ml). Το μέσο ύψος που αποκτούν κατά την ήβη τα αγόρια είναι 28cm και τα κορίτσια 25cm.

### **1.4 Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την έναρξη της ήβης**

Η έναρξη της ήβης σχετίζεται με την επανενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (γοναδοστάτης GnRH). Το νευρωνικό δίκτυο που παράγει την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) ενσωματώνει εσωτερικά και εξωτερικά σήματα και είναι υπεύθυνο τόσο για την έναρξη της ήβης όσο και για τη γονιμότητα. Αν και η ακριβής λειτουργία και τα στοιχεία αυτού του δικτύου δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα, είναι σαφές ότι ο νευρώνας που παράγει την GnRH αποτελεί και το τελικό σημείο αυτού του δικτύου και ελέγχει την έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση. Η έκκριση των γοναδοτροπινών γίνεται τόσο με μορφή παλμικής έκκρισης, όσο και ως απότομη αύξηση. Βλάβες στον νευρώνα GnRH ή σε νευρωνικά και νευρογλοιακά κύτταρα που συνδέονται με αυτόν έχουν ως επακόλουθο ανωμαλίες στην ήβη αλλά και επίδραση στη γονιμότητα. (16,17)

Κατά την ήβη η παλμική έκκριση GnRH, και η επακόλουθη έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση, η οποία είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των γονάδων, προκαλείται από την ενεργοποίηση της παλμογεννήτριας GnRH. Παρόλο που είναι καλά εδραιωμένο ότι η παλμική απελευθέρωση της GnRH είναι υπεύθυνη για την παλμική έκκριση των γοναδοτροπινών σε όλα τα θηλαστικά, ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η έκκριση της GnRH από τους αντίστοιχους νευρώνες δεν είναι απολύτως εξακριβωμένος.

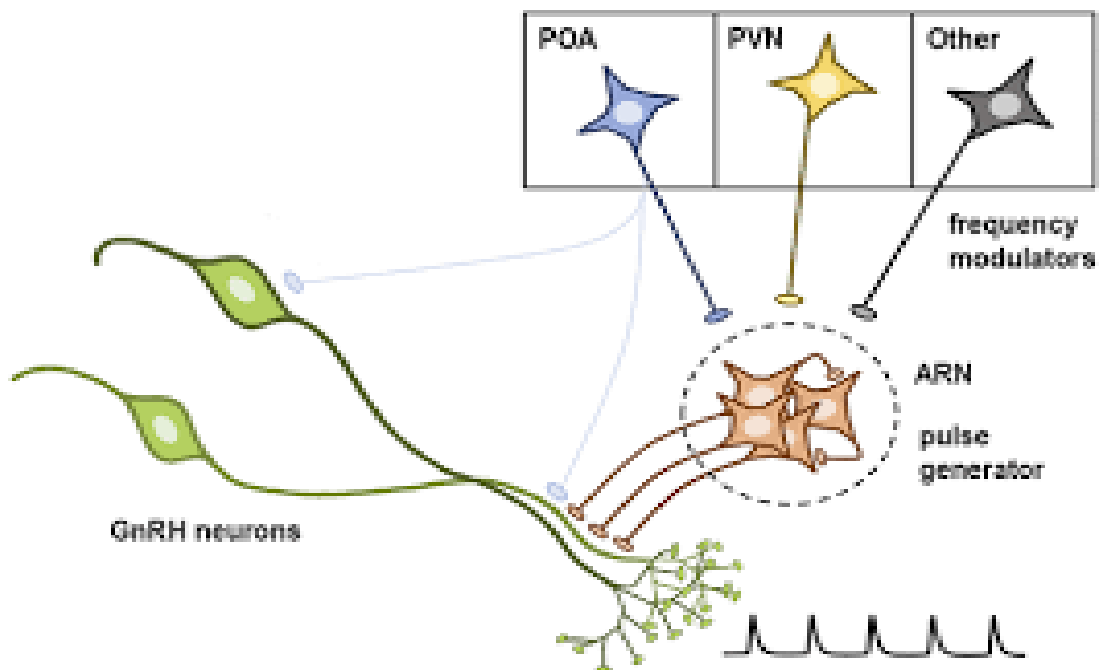
Η παλμογεννήτρια GnRH αποτελείται από διάσπαρτους νευρώνες που κατανέμονται στον τοξοειδή πυρήνα της μεσο-βασικής περιοχής του υποθάλαμου και στην προοπτική περιοχή του υποθαλάμου (18). Η παλμική έκκριση GnRH εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση των διάσπαρτων νευρώνων GnRH. Πολλοί διαφορετικοί νευροδιαβιβαστές (συμπεριλαμβανομένων του νευροπεπτιδίου Υ και ενδογενών οπιοειδών) εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των νευρώνων GnRH κατά την έναρξη της ήβης. Οι νευροδιαβιβαστές που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι η κισπεπτίνη (kisspeptin) (γίνεται αναφορά στη συνέχεια), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και το γλουταμικό οξύ (glutamate). Είναι γνωστό πως GABAεργικοί νευροδιαβιβαστές, όπως και ενδογενή οπιοειδή, NPY, κ.α., έχουν ανασταλτικό ρόλο, ενώ διάφορα νευροπεπτίδια και νευροδιαβιβαστές έχουν διεγερτικό ρόλο (π.χ. γλουταμικό, νοραδρεναλίνη) στην παλμική έκκριση της LH.

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες που αναφέρονται στον ενδογενή ή εξωγενή τρόπο λειτουργίας της παλμογεννήτριας GnRH (19,20). Η θεωρία για τον ενδογενή τρόπο λειτουργίας βασίζεται στην υπόθεση ότι οι νευρώνες GnRH συγχρονίζουν τη λειτουργία τους ώστε να ξεκινήσει η παλμική έκκριση GnRH. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε αρχικά στην εύρεση των GT1 κυττάρων, τα οποία είναι κύτταρα που εκκρίνουν αποκλειστικά GnRH. Καθώς τα GT1 κύτταρα έχουν τη δυνατότητα παλμικής έκκρισης GnRH θεωρήθηκε ότι οι νευρώνες GnRH είναι έτσι οργανωμένοι ώστε να συγχρονίζουν την δραστηριότητα τους και να προκαλούν παλμική έκκριση της ορμόνης.(21) Η θεωρία αυτή ενισχύθηκε αργότερα όταν σε παρατήρηση ομάδων GT1 κυττάρων από πιθήκους, πρόβατα και ποντίκια διαπιστώθηκε η συγχρονισμένη δραστηριότητα των GnRH νευρώνων στην παλμική έκκριση της ορμόνης (22-25). Ωστόσο υπήρξε δυσκολία στη κατανόηση του πως επιτυγχάνεται αυτός ο συγχρονισμός. Οι νευρώνες GnRH βρίσκονται ευρέως διάσπαρτοι στον υποθάλαμο, επομένως επικοινωνία μέσω συνάψεων ή χυμική επικοινωνία, όπως συμβαίνει in vitro, δεν μπορεί να επιτύχει συγχρονισμό in vivo. Όμως, διάφοροι νευροδιαβιβαστές, όπως το γλουταμικό, είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν τη διέγερση των νευρώνων GnRH, και επομένως δυνατόν να επιτύχουν κάποιου βαθμού συγχρονισμό των νευρώνων.

Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι παρασκευάσματα «φρέσκου» υποθαλαμικού ιστού που δεν περιέχουν κυτταρικά σώματα νευρώνων GnRH παρουσιάζουν κατά ώσεις έκκριση GnRH για αρκετές ώρες. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι για την κατά ώσεις έκκριση της GnRH στο μέσο έπαρμα (median eminence) δεν είναι απαραίτητη η επικοινωνία ή ο συγχρονισμός των κυτταρικών σωμάτων των νευρώνων. Μια πιθανή εξήγηση δίνεται από το εύρημα ότι, στον ποντικό, οι νευρώνες GnRH δεν προβάλλουν άξονες στο μέσο έπαρμα αλλά μια ασυνήθη προσεκβολή που έχει χαρακτηριστικά και δενδρίτη και άξονα, και ονομάστηκε «δένδρον». Το δένδρον όχι μόνο είναι αγωγός δυναμικών αλλά και προσλαμβάνει πληροφορίες μέσω των συνάψεων, ιδιαίτερα στο πλέον άπω τμήμα του, από

διάφορους νευροδιαβιβαστές. Ως εκ τούτου, τα άπω «δένδρα» δυνατόν να αποτελούν πιθανή θέση εισόδου νευρικών σημάτων που με την σειρά τους θα προκαλέσουν παλμική έκκριση GnRH (26,27).

Αντίθετα το εξωγενές μοντέλο λειτουργίας βασίζεται στο ότι οι νευρώνες GnRH δεν έχουν καμία άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Ο συγχρονισμός των νευρώνων GnRH προκύπτει από μια εντελώς ξεχωριστή ομάδα νευρώνων, η οποία απαιτείται ώστε να παράγει ένα συγχρονισμένο πρότυπο δραστηριότητας που ενεργοποιεί αρκετούς νευρώνες GnRH, οι οποίοι με την σειρά τους θα προκαλέσουν την παλμική έκκριση LH (28). Διάφορες πειραματικές μελέτες κατέληξαν σε ένα μοντέλο στο οποίο η παλμογεννήτρια εντοπίζεται στον τοξοειδή πυρήνα και οδηγεί τα άπω «δένδρα» του GnRH νευρώνα να απελευθερώσουν GnRH με παλμικό τρόπο. Διάφορα νευρικά σήματα στην παλμογεννήτρια στον τοξοειδή πυρήνα δυνατόν να είναι υπεύθυνα για την διαμόρφωση της συχνότητας παραγωγής των εκκριτικών αιχμών, όπως και νευρικά σήματα τόσο σε εγγύς όσο και σε άπω περιοχές του ίδιου του νευρώνα GnRH.



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση προτεινόμενου μοντέλου για παλμογεννήτρια GnRH. Μια ομάδα νευρώνων στον τοξοειδή πυρήνα (ARN) παρουσιάζει εγγενή συγχρονισμό και ενεργοποιεί τις περιφερικές διαδικασίες των νευρώνων GnRH για έκκριση GnRH. Η συχνότητα αυτών των επεισοδίων καθορίζεται από τη γεννήτρια ερεθισμάτων ARN αλλά μπορεί να διαμορφωθεί από εξωτερικές εισροές από περιοχές του εγκεφάλου, όπως η προοπτική περιοχή (POA), ο παρακοιλιακός πυρήνας (PVN) και άλλες θέσεις. Είναι πιθανό ότι οι άμεσες εισροές από όλες αυτές τις περιοχές του εγκεφάλου στους νευρώνες GnRH μπορεί επίσης να ρυθμίζουν την παλμική έκκριση

Παράδειγμα μετάδοσης πληροφοριών στους νευρώνες GnRH αποτελεί η μικροέγχυση GABAεργικών ουσιών στη μέση προοπτική περιοχή του υποθαλάμου ή στον παρακοιλιακό πυρήνα σε ποντίκια (29,30). Μελέτες απέδειξαν ότι το GABA μεταβάλλει την απελευθέρωση του GnRH από τον τοξοειδή πυρήνα (ARC) και η χορήγησή του απευθείας στον ARC αναστέλλει σημαντικά την παλμική έκκριση ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) σε αρουραίους. Η χορήγηση bicuculline, ενός αναστολέα του GABA υποδοχέα, μείωσε δραστικά την παραγωγή κισπεπτίνης, εμπλέκοντας το GABA στον μηχανισμό έναρξης της ήβης. Στους ανθρώπους, σε πρόσφατη μελέτη του γονιδιώματος (genome wide association study – GWAS), δείχθηκε πως πολυμορφισμός ενός μόνο νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism-SNP) στο σηματοδοτικό μονοπάτι του GABA σχετίζεται με την ηλικία εμμηναρχής (31). Επιπλέον, αμφότεροι οι υπότυποι υποδοχέων GABA (NMDA and AMPA υποδοχείς) στον ARC φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση της παλμικής έκκρισης LH.

Το γλουταμικό οξύ, το οποίο είναι από τους κυριότερους διεγερτικούς νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου, παίζει επίσης κύριο ρόλο στην ενεργοποίηση των GnRH νευρώνων. Η υποθαλαμική έκκριση γλουταμικού οξέος αυξάνεται ραγδαία κατά την διάρκεια της ήβης (32). Η χορήγηση N-methyl-D-aspartate (NMDA), ανάλογο αμινοξέος που μιμείται τη διεγερτική δράση του γλουταμικού οξέος, σε πιθήκους οδήγησε σε πρόωρη έναρξη της ήβης (33).

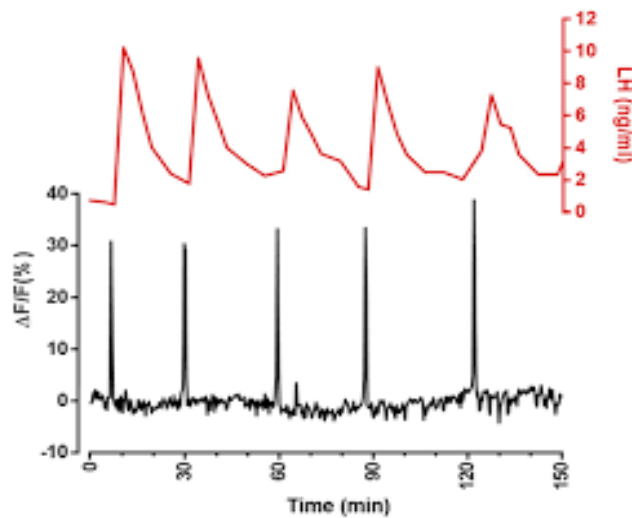
Μεγάλο βάρος στην ερμηνεία του μηχανισμού έναρξης της ήβης έχει δοθεί στην κισπεπτίνη, πεπτιδικό προϊόν του γονιδίου *Kiss1*. Η κισπεπτίνη, η οποία αρχικά ονομαζόταν metastin, ανακαλύφθηκε το 2001. Πολλές μελέτες απέδειξαν ότι είναι ο βασικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης των νευρώνων GnRH για την έναρξη της ήβης. Οι νευρώνες της κισπεπτίνης εντοπίζονται κυρίως σε δύο περιοχές του υποθαλάμου, τον τοξοειδή πυρήνα (ARC) και σε περικολιακές περιοχές, όπως η προοπτική περιοχή (POA), ο περικολιακός πυρήνας (PeN) ή ο προσθιοκοιλιακός πυρήνας (AVPV). Οι νευρώνες της κισπεπτίνης του τοξοειδούς πυρήνα ρυθμίζουν την ανάπτυξη ωοθυλακίων ελέγχοντας την παλμική έκκριση GnRH/γοναδοτροπινών, ενώ οι νευρώνες κισπεπτίνης που εντοπίζονται στον πρόσθιο υποθάλαμο καθορίζουν την ωορρηξία ελέγχοντας την κυματοειδή μορφή έκκρισης GnRH/LH. Το μοντέλο αυτό είναι πλέον παραδεκτό για πολλά είδη θηλαστικών μεταξύ των οποίων και για τον άνθρωπο.(34)

Οι υποθαλαμικοί νευρώνες της κισπεπτίνης, οι οποίοι εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα α (ERα) θεωρούνται ως κύριος στόχος της θετικής και αρνητικής ανάδρασης μέσω των οιστρογόνων, και επομένως άμεσος διεγέρτης της έκκρισης GnRH μέσω του GPR54/Kiss1R, υποδοχέα της κισπεπτίνης που εκφράζεται στους νευρώνες GnRH (35). Σε ποντίκια η απαλοιφή των γονιδίων Kiss1 και Kiss1R είχε ως αποτέλεσμα την παντελή έλλειψη παλμικής έκκρισης LH. Η έλλειψη αυτή ήταν δυνατό να αποκατασταθεί αν στα ποντίκια αυτά διασώζονταν εκλεκτικά η έκφραση του Kiss1R στους νευρώνες GnRH. Επιπλέον τα ποντίκια που δεν έφεραν τους νευρώνες κισπεπτίνης απέτυχαν να ανταποκριθούν στο μηχανισμό ανάδρασης της οιστραδιόλης (δεν παρουσιάζουν αύξηση της LH σε απάντηση στα οιστρογόνα) (36) υποδεικνύοντας πως το μονοπάτι από τον νευρώνα κισπεπτίνης έως τον νευρώνα GnRH μεσολαβεί στον μηχανισμό ανάδρασης των οιστρογόνων για την έκκριση γοναδοτροπινών. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σηματοδότηση Kisspeptin-GPR54 είναι απαραίτητη τόσο για τη παλμική έκκριση GnRH αλλά και για τον έλεγχο του μηχανισμού ανάδρασης μέσω των οιστρογόνων (34-39).

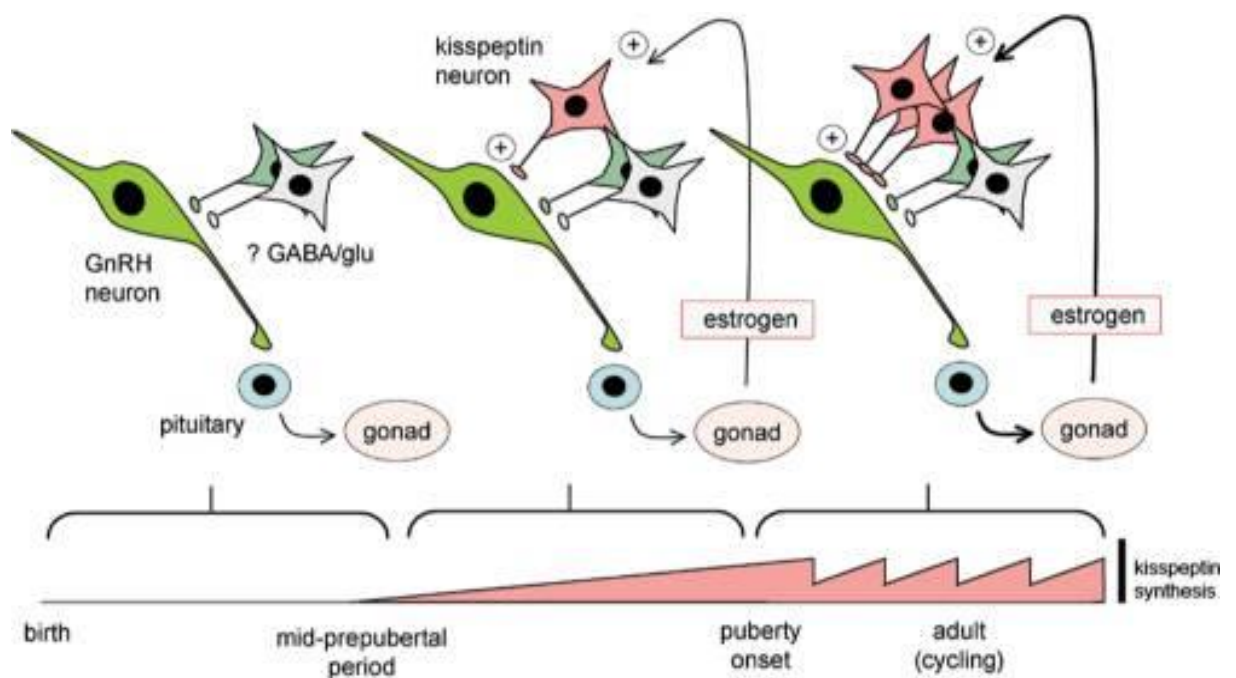
Είναι πλέον καθιερωμένη γνώση ότι η αναπαραγωγική λειτουργία επηρεάζεται μέσω των υποθαλαμικών νευρώνων κισπεπτίνης που ενεργοποιούν άμεσα τους νευρώνες GnRH. Σχεδόν όλοι οι νευρώνες GnRH εκφράζουν το GPR54/Kiss1R mRNA και ενεργοποιούνται από την κισπεπτίνη. Τα συνολικά επίπεδα του mRNA τόσο της κισπεπτίνης όσο και του GPR54 αυξάνονται κατά την διάρκεια της μεταγεννητικής περιόδου, υποδηλώνοντας ότι η σηματοδότηση kisspeptin-GPR54 στον υποθάλαμο αυξάνει την ανταπόκριση των νευρώνων GnRH για έναρξη της ήβης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα επίπεδα μεταγραφής του GPR54 στους νευρώνες GnRH δεν αλλάζουν κατά την εφηβεία, σε αντίθεση με τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν mRNA κισπεπτίνης που αυξάνονται κατά επτά φορές την ίδια περίοδο (40). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν πως το σήμα για την αρχική ενεργοποίηση του κυκλώματος kisspeptin-GPR54-GnRH, και την έναρξη της ήβης, είναι η αύξηση της βιοσύνθεσης της κισπεπτίνης. Αυτό αποδείχτηκε με την εξωγενή χορήγηση κισπεπτίνης σε αγοναδικούς νεαρούς αρσενικούς πιθήκους, με αποτέλεσμα την έναρξη της ήβης (41). Επομένως η ενεργοποίηση των νευρώνων GnRH μέσω της κισπεπτίνης φαίνεται πως είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την έναρξη της ήβης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νευρώνες κισπεπτίνης που εντοπίζονται στην περικοιλιακή περιοχή της 3<sup>ης</sup> κοιλίας (RP3V:rostral periventricular area of the third ventricle). Αρκετές μελέτες έδειξαν πως οι νευρώνες της κισπεπτίνης στην RP3V είναι εκείνοι που νευρώνουν άμεσα τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων GnRH. Επιπλέον οι νευρώνες κισπεπτίνης στην RP3V ενεργοποιούνται ταυτόχρονα με τους νευρώνες GnRH ακριβώς την στιγμή της ώσης GnRH/LH (42,43). Σε μελέτη των Clarkson et al (2009) σε ποντίκια αποδείχτηκε πως η έκφραση των RP3V

νευρώνων κισπεπτίνης είναι απόλυτα εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα. Τα ευρήματα έδειξαν πως η 17-β-οιστραδιόλη (E2) είναι αναγκαία για την αύξηση της έκφρασης των RP3V πεπτιδίων κισπεπτίνης που θα οδηγήσουν στην ήβη και προτείνει πως οι RP3V νευρώνες κισπεπτίνης εμπλέκονται σε έναν μηχανισμό θετικής ανάδρασης (E2-νευρώνες κισπεπτίνης -GnRH-γοναδοτροπίνες-E2) που είναι απαραίτητος για έναρξη της ήβης (44).



Σχήμα 5: Συγχρονισμένη δραστηριότητα των νευρώνων κισπεπτίνης που συσχετίζονται απόλυτα με την παλμική έκκριση LH.





Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την προτεινόμενη ενεργοποίηση των νευρώνων kisspeptin RP3V από την E2 από τη γέννηση. Στην αρχική φάση μέχρι την περίοδο της μέσης προεφηβικής ηλικίας, δεν υπάρχει έκφραση κισπεπτίνης (που αντιπροσωπεύεται από ροζ μπάρα στο κάτω μέρος). Με την αυξανόμενη έκθεση στην E2, ξεκινά η έκφραση της κισπεπτίνης και διευκολύνει την ενεργοποίηση του νευρώνα GnRH. Με την έναρξη της ήβης, η έκφραση της κισπεπτίνης αναπτύσσεται πλήρως και λειτουργεί για να ενισχύσει τη δραστηριότητα του νευρώνα GnRH. Μετά την ήβη, η έκφραση της κισπεπτίνης στο RP3V κυμαίνεται μαζί με κυκλικά επίπεδα E2 όπου διευκολύνει την προωοθυλακική αύξηση GnRH / LH σε κάθε κύκλο. GABA: γ-αμινοβουτυρικό οξύ; glu: γλουταμινικό

Όπως αναφέρθηκε, τα θηλαστικά έχουν δύο κύριους πληθυσμούς νευρώνων κισπεπτίνης στον εγκέφαλο, ωστόσο αυτοί που εντοπίζονται στον τοξοειδή πυρήνα απέκτησαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν ανακαλύφθηκε πως οι neurokinin B (NKB), dynorphin αλλά και οι υποδοχείς τους εκφράζονται επίσης στον τοξοειδή πυρήνα. Αυτό οδήγησε και στην «KNDy hypothesis», κατά την οποία οι νευρώνες του τοξοειδούς πυρήνα που εκφράζουν την κισπεπτίνη, NKB και dynorphin, γνωστοί και ως KNDy (kisspeptin–NKB–dynorphin) νευρώνες, αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας ένα συγχρονισμένο, με ενδογενή λειτουργία δίκτυο νευρώνων που προβάλλεται στους GnRH νευρώνες (45)

Έρευνες των τελευταίων 5 ετών υποστηρίζουν την «KNDy hypothesis», ωστόσο πως επιτυγχάνεται ο συγχρονισμός των νευρώνων KNDy είναι ακόμα άγνωστο. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες δείχνουν πως η NKB διεγείρει, ενώ η dynorphin δράντας μέσω του υποδοχέα των ενδογενών οπιοειδών (kappa-opioid receptor, KOR) αναστέλλει την κισπεπτίνη και συνεπώς την έκκριση της GnRH. Οι φαρμακευτικές θεραπείες των αναπαραγωγικών διαταραχών, που στοχεύουν στα πεπτίδια KNDy, θα βοηθήσουν στην πλήρη κατανόηση της λειτουργίας τους, την αλληλεπίδραση τους με την έκκριση GnRH, αλλά και τις διαφορές του συστήματος KNDy μεταξύ των διαφόρων ειδών.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εργασία των Abreu et al (2013) που απέδειξε πως γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο MKRN3 συσχετίζονται με αρκετές περιπτώσεις κεντρικής πρόωμης ήβης. Σε μελέτη κοορτής 40 ατόμων από δεκαπέντε οικογένειες με κεντρική πρόωμη ήβη, βρέθηκε η ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο MKRN3 σε 5 οικογένειες, συσχετίζοντας την απώλεια λειτουργίας του γονιδίου με την εμφάνιση ενωρίτερης ήβης. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η διαγραφή του MKRN3 οδηγεί στην πρόωμη επανενεργοποίηση της παλμικής έκκρισης της GnRH μένει να διευκρινιστεί. Το MKRN3 γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 15q11.2 και κωδικοποιεί την makorin ring finger protein 3. Μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο έχουν συσχετιστεί και με το σύνδρομο Prader-Willi, ωστόσο οι Abreu et al κατέληξαν πως οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε εμφάνιση πρόωμης ήβης δεν φαίνεται να σχετίζονται με εμφάνιση συμπτωμάτων του προαναφερθέντος συνδρόμου. Το

αποτέλεσμα της παραπάνω έρευνας έρχεται να ενισχυθεί και από μελέτη GWAS η οποία έδειξε πως ένας μονοκλουεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) του MKNR3 αναστέλλει την έναρξη της ήβης (46).

Συνοψίζοντας, η έναρξη της ήβης χαρακτηρίζεται από απότομη μείωση των ανασταλτικών σημάτων στο νευρωνικό δίκτυο GnRH, που ακολουθείται από έκρηξη διεγερτικών σημάτων. Ωστόσο υπάρχουν και σήματα από «την περιφέρεια» που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργία αυτών των ενδογενών συστημάτων. Η έναρξη της ήβης επηρεάζεται τόσο από γενετικούς παράγοντες, από την δράση διεγερτικών ή ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών, αλλά και από θρεπτικούς, περιβαλλοντικούς και κοινωνικούς παράγοντες

### **1.4a Εξωγενείς Παράγοντες**

#### **ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ**

Η επιγενετική συμμετέχει σε κάθε λειτουργία της ανάπτυξης του οργανισμού συμπεριλαμβανομένης της ήβης. Ο όρος επιγενετική αναφέρεται σε τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων, που δεν μπορεί να αποδοθεί σε αυτόλογες αλλαγές του DNA. Τέτοιες τροποποιήσεις αφορούν κυρίως στη μεθυλίωση του DNA, και την ακετυλίωση ή τη μεθυλίωση των ιστονών (47).

Η υπερμεθυλίωση του DNA των γονιδιακών υποκινητών (gene promoters) συσχετίζεται με την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων. Πειράματα σε πιθήκους έδειξαν πως η μεθυλίωση και η τροποποίηση των ιστονών του γονιδίου της GnRH επηρεάζουν τη λειτουργία του (48). Σύμφωνα με την παραπάνω παραδοχή, η χορήγηση παραγόντων που στοχεύουν σε επιγενετικές τροποποιήσεις μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόωμη έναρξη της ήβης. Μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι η ολική αναστολή μεθυλίωσης του DNA μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μη έναρξη της ήβης ενώ αντίθετα, η έναρξη της ήβης πυροδοτείται από την μεθυλίωση του DNA. (49)

Ο πιο χαρακτηριστικός επιγενετικός μηχανισμός φαίνεται πως είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών γνωστό ως «polycomb». Το 2013 οι Lomniczi et al έδειξαν πως η έκφραση του *Kiss1* στον ARC πυρήνα, αναγκαία για την παλμική έκκριση GnRH και στα δύο φύλα, αναστέλλεται έπειτα από την μεθυλίωση του DNA τμημάτων ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος γνωστό ως polycomb group. Κατά την έναρξη της ήβης, αυξάνεται η μεθυλίωση του DNA των *Eed* και *Cbx7* (γονιδίων του polycomb) με αποτέλεσμα τη μείωση έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων και κατ' επέκταση τη σχέση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος PcG με τον υποκινητή του *Kiss1*. Αναστολή της μεθυλίωσης αποτρέπει τη μείωση έκφρασης των *Eed* και *Cbx7* επομένως και της απομάκρυνσης τους από τον υποκινητή του *Kiss1* που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της ήβης (49)

Σημειωτέον πως το επιγονιδίωμα επαναπρογραμματίζεται συνεχώς κατά την διάρκεια της ζωής και η ευπλαστότητα του λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός ώστε να επιτρέψει στην έναρξη της ήβης να λάβει χώρα την κατάλληλη χρονική στιγμή για την ανάπτυξη του οργανισμού.

## **ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ**

Καθημερινά οι άνθρωποι εκτίθενται σε πολυάριθμες χημικές ουσίες, ορισμένες από τις οποίες μπορούν να διαταράξουν το ενδοκρινικό σύστημα. Οι λεγόμενοι ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs) μπορούν να συνδεθούν με ορμονικούς υποδοχείς οδηγώντας είτε σε αναστολή ή σε ενεργοποίηση της σύνθεσης ορμονών. Ανάμεσα στους EDCs ανήκουν και τα παρασιτοκτόνα όπως η τριχλωροεθάνη (DDT) και ο κύριος μεταβολίτης της DDE που έχει μελετηθεί εκτενώς και η σχέση τους με την διαφοροποίηση των γονάδων αλλά και την ήβη (50). Στους ανθρώπους είναι πολύ δύσκολο να αποδειχτεί, πως τα EDCs επιδρούν στην ήβη, καθώς οι άνθρωποι εκτίθενται σε πολλά από αυτά τα χημικά. Επομένως μια σαφής συσχέτιση είναι πάρα πολύ δύσκολη.

Η αφθονία των EDCs και η ικανότητα τους να παρεμβαίνουν στο ενδοκρινικό σύστημα σε συνδυασμό με την τάση για πρωιμότερη έναρξη της ήβης έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές να συσχετίσουν τα EDCs με την πρόωμη ήβη, ιδίως δεδομένου πως ορισμένα από αυτά έχουν οιστρογονική δράση. Ωστόσο οι σχετικές μελέτες παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα. Τα υπάρχοντα δεδομένα υποδηλώνουν πως οι EDCs έχουν μικρή ή καμία επίδραση στον χρόνο έναρξης της ήβης στα κορίτσια (51).

## **ΛΙΠΩΔΗΣ ΙΣΤΟΣ**

Η συσχέτιση του βάρους σώματος στην παιδική ηλικία και της ηλικίας έναρξης της ήβης είναι γνωστή εδώ και αρκετές δεκαετίες. Δεδομένα από προοπτικές μελέτες έδειξαν πως υπερβολική αύξηση του BMI κατά την παιδική ηλικία μπορεί να οδηγήσει σε πρόωμη ήβη σε κορίτσια (52). Επιπλέον δεδομένα από μελέτη GWAS έδειξαν πως η αύξηση του BMI σχετίζεται με μικρότερη ηλικία εμμηναρχής (53). Πράγματι, σύμφωνα με την "σωματομετρική υπόθεση" (Somatometer Hypothesis) -υπόθεση που συνδέει την αύξηση με την εφηβική ωρίμανση- μια ορισμένη ποσότητα λιπώδους μάζας είναι ουσιώδης για την έναρξη της ήβης (54). Σημαντικοί μεσολαβητές αυτού του μηχανισμού περιλαμβάνουν την αυξητική ορμόνη, τον αυξητικό παράγοντα-1 (Insulin-like Growth Factor-1 - IGF-1) αλλά και την λεπτίνη (55). Τον κυριότερο ρόλο σε αυτή την διαδικασία τον παίζει η λεπτίνη, ορμόνη που παράγεται από τα λιποκύτταρα και δρά ως διαβιβαστής στον υποθάλαμο μεταφέροντας πληροφορίες σχετικά με τον λιπώδη ιστό και τα ενεργειακά επίπεδα του οργανισμού. Ο τοξοειδής

πυρήνας του υποθαλάμου θεωρείται ως ο πρωταρχικός τόπος δράσης της λεπτίνης, όπου η λεπτίνη ενεργοποιεί τους νευρώνες της προοπιομελανοκορτίνης (POMC), ενώ αναστέλλει τους νευρώνες του νευροπεπτιδίου Y (NPY) (56). Η σηματοδότηση από την λεπτίνη, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μεταβάλλει τη λειτουργία του εγκεφάλου και άλλων ιστών για την εφαρμογή κατάλληλων αλλαγών στην πρόσληψη τροφής και την ενεργειακή δαπάνη (57). Η σημασία της λεπτίνης προκύπτει από πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες. Ποντίκια ομόζυγα για μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης (*LEP*), οι οποίες εμποδίζουν την παραγωγή λεπτίνης ή οδηγούν στην έκκριση ενός ανενεργού μορίου λεπτίνης (ποντίκια *ob/ob*), εμφανίζουν υπερφαγία, αντίσταση στην ινσουλίνη, παχυσαρκία πρώιμης έναρξης, διαβήτη, λιπώδες ήπαρ και διάφορες νευροενδοκρινικές ανωμαλίες. (56,57). Τα ποντίκια αυτά επιπλέον εμφανίζουν και στα δύο φύλα διαταραχές αναπαραγωγής, όπως στειρότητα, αν και έχει περιγραφεί κάποιος βαθμός αναπαραγωγικής ικανότητας σε νεαρά *ob/ob* αρσενικά ποντίκια (58). Στα προ-εφηβικά στάδια, τα αναπαραγωγικά όργανα των *ob/ob* ποντικών δεν διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ποντικών, αλλά στην συνέχεια ούτε τα αρσενικά ούτε τα θηλυκά επιτυγχάνουν σεξουαλική ωρίμανση. Η σεξουαλική ανάπτυξη και γονιμότητα επιτυγχάνεται μόνο εάν χορηγηθεί λεπτίνη (59).

Λόγω των διαταραχών αναπαραγωγής στα ποντίκια *ob/ob* και της πλήρους διάσωσης της γονιμότητας μετά τη χορήγηση λεπτίνης, η λεπτίνη θεωρήθηκε αρχικά ως το βασικό σήμα για την έναρξη της εφηβείας. Ωστόσο, σύντομα κατέστη σαφές ότι η λεπτίνη είναι μάλλον ένας επιτρεπτικός παράγοντας που απαιτείται, αλλά δεν επαρκεί, για τη φυσιολογική σεξουαλική ωρίμανση. Η λεπτίνη δεν μπορεί να υποδείξει πότε θα ξεκινήσει η ήβη αλλά σηματοδοτεί την έναρξη της όταν τα κυκλοφορούντα επίπεδα της φτάσουν στο επιθυμητό επίπεδο. (60)

Αν και η ανακάλυψη της λεπτίνης εισήγαγε νέα δεδομένα στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας, πολλά άλλα κομμάτια της ενεργειακής ομοιόστασης και της ενδοκρινικής λειτουργίας του λιπώδους ιστού παραμένουν άγνωστα. Οι υποδοχείς λεπτίνης εκφράζονται σε πολλά όργανα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με τον έλεγχο της αναπαραγωγικής φυσιολογίας (π.χ. υποθάλαμος, υπόφυση και γονάδες). Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει καταστεί σαφές ότι οι υποδοχείς λεπτίνης που βρίσκονται στον εγκέφαλο είναι κύριοι παράγοντες για τις περισσότερες δράσεις της λεπτίνης, συμπεριλαμβανομένης της αναπαραγωγής. (61) Επιπλέον, η πρόσφατη ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για τη χαρτογράφηση του εγκεφάλου και η χρήση γενετικά τροποποιημένων μοντέλων ποντικών έχουν δημιουργήσει νέα κρίσιμα ευρήματα για την κατανόηση της φυσιολογίας της λεπτίνης και των μεταβολικών επιδράσεων στην αναπαραγωγική υγεία. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές αποδείχθηκε ότι η λεπτίνη ενεργοποιεί τους γλουταμεργικούς νευρώνες PMV και αναστέλλει τους GABAεργικούς AgRP (Agouti-related peptide)

νευρώνες στον τοξοειδή πυρήνα. Και οι δύο πληθυσμοί, με τη σειρά τους, επιδρούν στους νευρώνες της GnRH ή/και της κισπεπτίνης, διαμορφώνοντας ενδεχομένως τον αναπαραγωγικό νευροενδοκρινικό άξονα. Η ενσωμάτωση αυτών των αντίθετων σημάτων είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της έγκαιρης έκκρισης της GnRH κατά την εφηβική ωρίμανση και σε καταστάσεις ενεργειακών προκλήσεων. Είναι σημαντικό ότι η έλλειψη δράσης της λεπτίνης σε μία από αυτές τις ομάδες νευρώνων δεν αποκλείει τη σεξουαλική ωρίμανση, υποδεικνύοντας ότι ο ένας νευρωνικός πληθυσμός μπορεί να αντισταθμίσει τις επιδράσεις του άλλου (62). Επιπλέον, η κατανόηση των εναλλακτικών σηματοδοτικών οδών που επιστρατεύονται από τη λεπτίνη θα επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους η λεπτίνη δρα ως επιτρεπτικός παράγοντας στην εφηβική ωρίμανση και την αναπαραγωγή.

Οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας λεπτίνης αυξάνουν σταδιακά με την ηλικία πριν την ήβη και αυτό είναι ενδεικτικό της ύπαρξης ενός σημείου πέρα από το οποίο η αύξηση λεπτίνης πυροδοτεί και την έναρξη της ήβης (63). Ασθενείς που φέρουν απενεργοποιές μεταλλάξεις της λεπτίνης ή του υποδοχέα της δεν αναπτύσσουν ήβη. Αντίθετα εξωγενής χορήγηση λεπτίνης σε ασθενείς με έλλειψη της ορμόνης έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της ήβης. Το φαινόμενο αποδίδεται σε απευθείας δράση της λεπτίνης στους νευρώνες συνθάσης του νιτρικού οξειδίου στην προοπτική περιοχή του υποθαλάμου, προκαλώντας έκκριση LH, πιθανώς ανεξάρτητα από το KNDy σύστημα (64). Η δράση αυτή της λεπτίνης στην έναρξη ήβης είναι απαραίτητη χωρίς όμως και να αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα, καθώς υπάρχουν ασθενείς με λιποδυστροφίες, στους οποίους παράγεται ελάχιστη ποσότητα λεπτίνης και όμως παρουσιάζουν φυσιολογική ήβη (60).

Άλλοι παράγοντες πέρα από την λεπτίνη που σχετίζονται με τον λιπώδη ιστό είναι η DLK-1 (Delta-like Homolog 1) ή preadipocyte factor 1 (Pref-1), μια πρωτεΐνη που αποτρέπει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων. Ο συγκεκριμένος παράγοντας εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 και εκφράζεται στους νευρώνες κισπεπτίνης αλλά και σε ορισμένους πυρήνες του υποθαλάμου. Σε μελέτη GWAS δείχτηκε πως 10 γυναίκες με ιστορικό πρώιμης ήβης έφεραν μετάλλαξη του DLK-1. Αξίζει να σημειωθεί πως οι γυναίκες αυτές επίσης παρουσίαζαν παχυσαρκία, ινσουλινοαντίσταση, δυσλιπιδαιμία και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, δηλαδή είχαν συστατικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου. Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν σε ποντίκια DKL1-null, υποστηρίζοντας τη θεωρία πως το DKL-1 αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ αναπαραγωγής και μεταβολισμού (64).

## ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Μια σημαντική ανακάλυψη των τελευταίων δεκαετιών είναι το μικροβίωμα και ο καθοριστικός ρόλος του στη διατήρηση της ομοιόστασης. Το μικροβίωμα είναι ένα περίπλοκο

αλληλένδετο σύστημα μικροοργανισμών που ζει στο ανθρώπινο σώμα και είναι μοναδικό για κάθε άτομο, όπως το δαχτυλικό αποτύπωμα. Το μικροβίωμα αποτελεί κυρίαρχο ρυθμιστικό παράγοντα της ομοιόστασης. Αλληλεπιδρά με τον εγκέφαλο και επομένως είναι πολύ πιθανή η συσχέτισή του με την ήβη. Έχουν παρατηρηθεί διάφορες αλλαγές στο μικροβίωμα κατά την διάρκεια της ήβης. Σημαντική είναι η παρατήρηση πως η χορήγηση συγκεκριμένων μικροβιακών ειδών μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργία του εγκεφάλου επηρεάζοντας τα επίπεδα και τη διαθεσιμότητα νευροδιαβιβαστών σημαντικών στη διαδικασία της ήβης, όπως το γλουταμικό και το GABA (65).

Ακόμα ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγων μεταξύ γαστρεντερικού συστήματος και ήβης είναι η γκρελίνη (ghrelin), ορμόνη που εκκρίνεται κυρίως από το στομάχι. Η γκρελίνη δρα ως σηματοδότης ενεργειακού ελλείματος του οργανισμού, καθώς αυξάνεται κατά την περίοδο νηστείας και μειώνεται μετά τη λήψη τροφής. Μαζί με τη λεπτίνη φαίνεται πως είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες ρύθμισης της ενεργειακής ομοιόστασης. Υποδοχείς της γκρελίνης (GHSR-1a) εκφράζονται σε όλα τα σημεία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες και φαίνεται ότι η γκρελίνη παίζει ανασταλτικό ρόλο στην ήβη. Μελέτες έδειξαν ότι αύξηση της γκρελίνης αναστέλλει την εκκριτική αιχμή της LH και την παραγωγή στεροειδών ορμονών του φύλου (66-67).

Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο αυξητικός παράγων των ινοβλαστών-21 (Fibroblast Growth Factor 21 - FGF21) συσχετίζεται με την έναρξη της ήβης. Ο FGF21 είναι μια ηπατοκίνη που αυξάνεται κατά τη νηστεία και ρυθμίζει την αντίδραση του οργανισμού σε περίοδο νηστείας, αυξάνοντας την κετογένεση. Επίσης ελαττώνει τον ρυθμό της αύξησης του παιδιού και ρυθμίζει τη χειμερία νάρκη στα ζώα. Σχετικά με την ήβη, αποδείχτηκε ότι δρα στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN) στον υποθάλαμο αναστέλλοντας τον καταρράκτη ενεργοποίησης της κισπεπτίνης (68). Φαίνεται πως ο FGF21 συμμετέχει ενεργά στο γαστρεντερικό-νευροενδοκρινικό άξονα που ρυθμίζει την ήβη και την αναπαραγωγή και στα δύο φύλα.

## **ΑΔΡΕΝΑΡΧΗ**

Ως αδρεναρχή ορίζεται η ενεργοποίηση της δικτυωτής ζώνης των επινεφριδίων που οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής επινεφριδιακών ανδρογόνων. Κλινικά η αδρεναρχή εκδηλώνεται με την εμφάνιση τρίχωσης στο εφήβαιο, γνωστή και ως "εφηβαρχή". Αν και οι δύο αυτές οι έννοιες συχνά θεωρούνται συνώνυμες, αντιπροσωπεύουν δύο εντελώς ξεχωριστές έννοιες και δεν πρέπει να συγχέονται.

Η αιτία έναρξης της αδρεναρχής δεν είναι σαφής. Παράγοντες όπως η προλακτίνη, τα οιστρογόνα, η αγγειοτενσίνη, οι γοναδοτροπίνες, η ινσουλίνη αλλά και πολλοί άλλοι σχετίζονται με την ανάπτυξη και λειτουργία της δικτυωτής ζώνης των επινεφριδίων. Πρόσφατη παρατήρηση που

παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η συσχέτιση της κισπεπτίνης με την λειτουργία των επινεφριδίων κατά την εμβρυική ζωή (69). Η έκφραση της κισπεπτίνης οδηγεί σε αύξηση παραγωγής από τα εμβρυικά επινεφρίδια της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA). Αν και φαίνεται πως η κισπεπτίνη παίζει κάποιο ρόλο στην αδρεναρχή και στον μηχανισμό παραγωγής επινεφριδιακών ανδρογόνων στο έμβρυο αυτός ο ρόλος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Τα επίπεδα των επινεφριδιακών ανδρογόνων αρχίζουν να αυξάνονται περίπου 2 έτη πριν την εμφάνιση γοναδαρχής, υποδηλώνοντας μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δύο βιολογικών διαδικασιών, της αδρεναρχής και της γοναδαρχής. Ωστόσο η αδρεναρχή δεν αποτελεί προαπαιτούμενο της γοναδαρχής, καθώς όπως δείχθηκε σε κλινικές μελέτες σε περιπτώσεις απουσίας της αδρεναρχής, η γοναδαρχή και η εξέλιξη της ήβης ήταν φυσιολογικές. Γενικά, η ηλικία γοναδαρχής και εμμηναρχής σε παιδιά με πρόωμη αδρεναρχή δεν διαφέρει από αυτή του γενικού πληθυσμού. Ωστόσο κορίτσια που είχαν πρόωμη αδρεναρχή και εφηβαρχή παρουσίασαν και εμμηναρχή νωρίτερα του μέσου όρου, γεγονός που υποδηλώνει πως η έκκριση επινεφριδιακών ανδρογόνων παίζει κάποιο ρόλο στην έναρξη της δράσης των γονάδων.

## **ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΖΩΗ / ΨΥΧΟΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΑΓΧΟΣ**

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός δεδομένων δείχνει πως είτε προγεννητικές ή κατά τα πρώτα χρόνια ζωής στρεσογόνες καταστάσεις (πχ διατροφικές διαταραχές της μητέρας, καταστάσεις που οδηγούν σε ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης, ελλιπής βρεφική διατροφή, παιδικές αντιξοότητες, ψυχοκοινωνική αποστέρηση και αβεβαιότητα και κακές ενδοοικογενειακές σχέσεις) σχετίζονται με πρόωμη αναπαραγωγική ωριμότητα. Στρεσογόνες καταστάσεις στην ενδομήτρια ζωή οδηγούν σε ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης με συνέπεια την αυξημένη πιθανότητα νοσηρότητας ή και θνητότητας. Μια θεωρία υποστηρίζει πως τα συγκεκριμένα παιδιά έχουν την τάση να εμφανίζουν ικανότητα αναπαραγωγής σε μικρότερη ηλικία σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ώστε να ολοκληρώσουν πιο γρήγορα τον βιολογικό κύκλο ζωής (70).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ενδομήτριος υποσιτισμός συνδέεται στενά με την εμφάνιση ασθενειών μετά τη γέννηση (70). Ο περιγεννητικός υποσιτισμός είναι γνωστό ότι διαταράσσει την ανάπτυξη της αναπαραγωγικής λειτουργίας και καθυστερεί την έναρξη της ήβης σε ορισμένα είδη. Σε μελέτη που διενεργήθηκε σε αρουραίους, προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις του προγεννητικού υποσιτισμού στην ανάπτυξη του υποθαλαμικού συστήματος της κισπεπτίνης και αξιολογήθηκε κατά πόσον η μεταβολή του συστήματος αυτού συμβάλλει στην καθυστερημένη έναρξη της ήβης που προκαλείται από τον προγεννητικό υποσιτισμό. Μετρήθηκαν επίσης οι συγκεντρώσεις λεπτίνης στον ορό, καθώς η αντίσταση στη λεπτίνη ενδέχεται να εμπλέκεται στη μεταβολή του υποθαλαμικού

συστήματος της κισπεπτίνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι η δράση του υποθαλαμικού συστήματος κισπεπτίνης κατά την αναπτυξιακή περίοδο καταστέλλεται σε θηλυκούς αρουραίους που υποσιτίζονται κατά την ενδομήτριο ζωή. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να συμβάλλουν στην καθυστερημένη έναρξη της ήβης στα ζώα αυτά, διότι η χρόνια έγχυση της κισπεπτίνης ομαλοποίησε τον χρόνο έναρξης της ήβης (71). Επιπλέον συγκεκριμένες καταστάσεις κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, όπως παχυσαρκία και υπεργλυκαιμία της μητέρας, και το αυξημένο βάρος γέννησης του παιδιού, επηρεάζουν επίσης την ενδοκρινική ομοιόσταση. Κορίτσια που γεννήθηκαν με χαμηλό βάρος γέννησης εμφάνισαν πρόωμη αδρεναρχή, νωρίτερη εμμηναρχή, αντίσταση στην ινσουλίνη, υπερανδρογοναιμία και διαταραγμένο μεταβολικό προφίλ (72).

Μια άλλη συσχέτιση στρεσογόνων γεγονότων και μεταγεννητικών συνθηκών διαβίωσης έχει παρατηρηθεί σε νεαρά κορίτσια προερχόμενα από αναπτυσσόμενες χώρες και τα οποία δόθηκαν για υιοθεσία. Στον βιομηχανικό κόσμο η πρόωμη ήβη δεν είναι ασυνήθιστη στα κορίτσια που υιοθετούνται από αναπτυσσόμενες χώρες. Στο Βέλγιο τα κορίτσια αυτά αντιπροσωπεύουν το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων πρόωμης ήβης (73), με τα ποσοστά αυτά να αυξάνονται και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Σουηδία και η Ιταλία. Έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις που να εξηγούν αυτή την πρόωμη έναρξη της ήβης. Μελέτες σε λιποκύτταρα *in vitro* δείχνουν ότι υπάρχει τοπική μετατροπή των επινεφριδιακών ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Ως εκ τούτου, η ταχεία αύξηση των σωματικού βάρους που παρατηρήθηκε στα παιδιά αυτά λόγω βελτίωσης των συνθηκών διατροφής, πιθανώς σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ενεργών στεροειδών στην κυκλοφορία, τα οποία θα μπορούσαν να προετοιμάσουν τα υποθαλαμικά κέντρα και να προκαλέσουν πρόωρη διέγερση του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- γονάδες. Επιπλέον πολιτισμικοί αλλά και ψυχολογικοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν επίσης υπόψιν. (74) Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με δεδομένα από προοπτικές μελέτες και καταδεικνύουν ότι κορίτσια που γεννήθηκαν με χαμηλό βάρος γέννησης αλλά έγιναν υπέρβαρα στην προεφηβεία εισήλθαν νωρίτερα στην ήβη από τις συνομήλικές τους με χαμηλό βάρος γέννησης που παρέμειναν με φυσιολογικό βάρος. Φαίνεται ότι η έκθεση σε προγεννητική ή/και πρόωμη στέρηση θρεπτικών ουσιών και η διατροφική υπερβολή στην παιδική ηλικία διαταράσσουν τη φυσιολογική ωρίμανση του αναπαραγωγικού άξονα. (75).

Το κοινωνικό stress δεν πρέπει να παραβλέπεται ως παράγοντας που επηρεάζει την έναρξη ήβης, καθώς το στρες επηρεάζει τόσο τη δομή όσο και την λειτουργία του εγκεφάλου. Παιδιά προερχόμενα από οικογένειες χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου καθώς και παιδιά που υπέστησαν τουλάχιστον δύο τραυματικά γεγονότα, όπως έκθεση σε παιδική κακοποίηση, σεξουαλική επίθεση, παραμέληση και χρόνια φτώχεια, ανέπτυξαν πρόωμη ήβη (76)(77). Στην μελέτη που αναφέρθηκε προηγουμένως με τα υιοθετημένα κορίτσια από αναπτυσσόμενες χώρες, μία από τις



ασθενείς που είχε παραμεληθεί και κακοποιηθεί από την πρώτη της θετή οικογένεια, εμφάνισε πρόωρη ήβη λίγο μετά την επανυιοθεσία της σε ηλικία 6 ετών (77). Η υπόθεση πως στρεσογόνοι παράγοντες επιταχύνουν την εμφάνιση ήβης (stress acceleration hypothesis) υποστηρίζει ότι η νωρίτερη εμφάνιση της ήβης πιθανότατα αποτελεί αμυντικό εξελικτικό μηχανισμό του ατόμου (76).

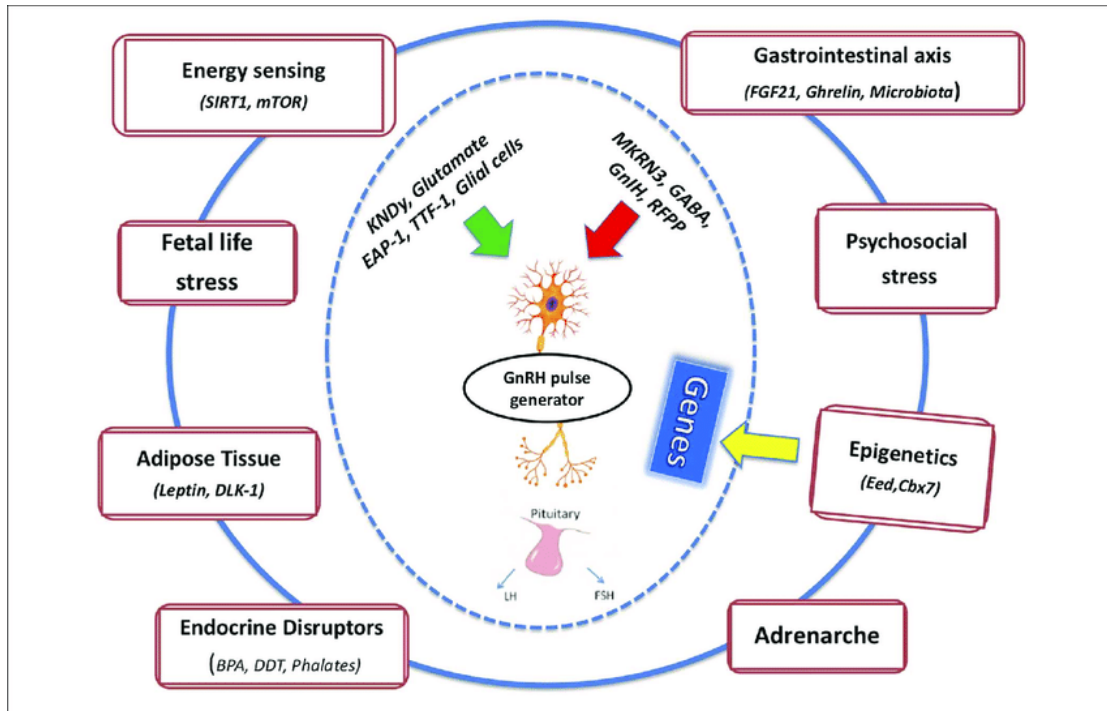
## ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ

Ο μηχανισμός της εφηβικής ωρίμανσης είναι μια διαδικασία που απαιτεί αυξημένα ενεργειακά αποθέματα. Καταστάσεις που διαταράσσουν την ενεργειακή ισορροπία, όπως οι διατροφικές διαταραχές ή η εξαιρετικά έντονη άσκηση, μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της εφηβικής ανάπτυξης και ως εκ τούτου καθυστέρηση της ήβης.

Σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που διατηρούν και ρυθμίζουν την ενεργειακή ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών συστημάτων. Κυριότερος από αυτούς είναι το mTOR (mammalian target of rapamycin), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που λειτουργεί ως αισθητήρας του κυτταρικού ενεργειακού επιπέδου και διεγείρει την έκκριση LH σε εφήβους θήλειες επίμωες μέσω τροποποίησης της υποθαλαμικής έκφρασης του Kiss1, και η κινάση AMP (AMPK). Το μονοπάτι mTOR ανιχνεύει τα επίπεδα γλυκόζης και αμινοξέων σε κυτταρικό επίπεδο και ελέγχει την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, ενώ το μονοπάτι της AMPK είναι ο βασικότερος κυτταρικός παράγοντας στην ανίχνευση των επιπέδων AMP και ATP. Το μονοπάτι του mTOR μπορεί να ενεργοποιηθεί, όπως ήδη αναφέρθηκε, από τα επίπεδα γλυκόζης και αμινοξέων αλλά και από ορμονικά σήματα (IGF-1, ινσουλίνη) που μπορούν έτσι να επηρεάσουν την μετάφραση των πρωτεϊνών και την κυτταρική ανάπτυξη (78).

Καθώς τα ενεργειακά ρυθμιστικά συστήματα έχουν ουσιώδη σημασία στην κυτταρική λειτουργία και ακεραιότητα, τέθηκε το ερώτημα εάν τα συστήματα αυτά μπορούν να επηρεάζουν και τις διαδικασίες της ήβης. Όντως, το μονοπάτι mTOR/AMPK είναι μερικώς ρυθμιζόμενο από την Sirtuin1 (Sirt1), που είναι μια NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)-εξαρτώμενη Class III διακετυλάση. Η Sirt1 σε κυτταρικό επίπεδο ανιχνεύει τα επίπεδα ενέργειας και ενεργοποιείται κατά την νηστεία ή τον περιορισμό θερμιδικής πρόληψης οπότε αυξάνει την οξειδωση λιπαρών οξέων, την γλυκονεογένεση και περιορίζει την έκκριση ινσουλίνης, τη δράση της ινσουλίνης και τη λιπογένεση (79). Η Sirt1 πέρα από την έκφρασή της σε μύες, λιπώδη ιστό και ήπαρ, εκφράζεται επίσης στον υποθάλαμο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφρασή της στον υποθαλαμικό Kiss1 νευρώνα όπου αλληλεπιδρά με το Polycomb silencing complex μειώνοντας την δραστηριότητα του Kiss1 promoter. Η πρόωρη έναρξη πρόσληψης μεγάλου αριθμού θερμίδων (early-onset overnutrition) οδηγεί σε

έκφραση του *Kiss1* και επιταχύνει την εμφάνιση ήβης. Αντίθετα ο υποσιτισμός αυξάνει τα επίπεδα της *SIRT1*, προκαλώντας αναστολή της έκφρασης *Kiss1* και καθυστέρηση ήβης (80).



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση των ενδογενών και εξωγενών παραγόντων και της επίδρασης τους στην έναρξη της ήβης.

## 1.5 Πρώιμη ήβη

Πρώιμη ήβη καλείται η εμφάνιση δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου πριν από την ηλικία των 8 χρόνων στα κορίτσια και των 9 χρόνων στα αγόρια. Σε κορίτσια ελληνικής καταγωγής η ανάπτυξη στήθους μαζικών αδένων εμφανίζεται κατά μέσο όρο στην ηλικία των 10 (SD 1.0) ετών (5), επομένως κορίτσια με εμφάνιση ανάπτυξη στήθους μαζικών αδένων μετά την ηλικία των 8 αλλά πριν την ηλικία των 9 ετών θεωρούνται πως παρουσιάζουν νωρίς ήβη, δηλαδή φυσιολογική ήβη που εμφανίζεται νωρίς. Γενικά η επίπτωση της πρώιμης ήβης υπολογίζεται ότι είναι περίπου 1:5000 μέχρι 1:10000 παιδιά με την αναλογία εμφάνισης σε κορίτσια προς αγόρια να είναι περίπου 10:1 (81).

Η πρώιμη ήβη διακρίνεται σε κεντρική ή εξαρτώμενη από τις γοναδοτροπίνες και περιφερική ή ανεξάρτητη από τις γοναδοτροπίνες.

Η κεντρική πρώιμη ήβη (central precocious puberty-CPP) ή εξαρτώμενη από τις γοναδοτροπίνες, είναι το αποτέλεσμα της πρώιμης επανενεργοποίησης του άξονα υποθαλάμου-

υπόφυσης-γονάδες (HPG) (82). Οι αιτίες είναι παρόμοιες σε αγόρια και κορίτσια, αν και η ιδιοπαθής νόσος είναι πολύ πιο συχνή στα κορίτσια - περίπου το 90% των περιπτώσεων. Αντίθετα, σε 50-70% των αγοριών η κεντρική πρόωμη ήβη οφείλεται σε αναγνωρίσιμες παθολογικές καταστάσεις. Ανωμαλίες του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη διαταραχή περιλαμβάνουν υποθαλαμικά αμαρτώματα, εγκεφαλίτιδα, υδροκεφαλία, νευροϊνωμάτωση τύπου 1, μηνιγγομυελοκήλη και νεογνική εγκεφαλοπάθεια.

Η περιφερική πρόωμη ήβη (peripheral precocious puberty-PPP) ή ανεξάρτητη από την GnRH πρόωμη ήβη, ορίζεται ως η πρόωμη εφηβική ωρίμανση που δεν είναι αποτέλεσμα κεντρικής ενεργοποίησης του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδες. Η αιτιολογία της PPP μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε γενετικές ή σε επίκτητες διαταραχές και ορισμένες διαφέρουν ανάλογα με το φύλο του παιδιού. Συγγενείς ή γενετικές αιτίες περιλαμβάνουν το σύνδρομο McCune-Albright (MAS), τη συγγενή πρόωμη ήβη στους άρρενες (FMPP) ή τεστοτοξίκωση και τη συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων. Οι επίκτητες αιτίες περιλαμβάνουν όγκους ή κύστεις που εκκρίνουν ορμόνες, έκθεση σε εξωγενείς ορμόνες και την πρόωμη ψευδοήβη όπως συναντάται σε ασθενείς με βαρύ πρωτοπαθή υποθυρεοειδισμό (83). Η θεραπεία της περιφερικής πρόωμης ήβης εξαρτάται αποκλειστικά από την αιτία που την προκαλεί.

## **ΑΙΤΙΑ ΠΡΩΙΜΗΣ ΗΒΗΣ**

### **Αιτίες κεντρικής πρόωμης ήβης**

#### **Βλάβες στο ΚΝΣ**

##### **- συγγενείς δυσπλασίες**

- Υποθαλαμικό αμάρτωμα
- Αραχνοειδείς κύστεις
- Υδροκεφαλία
- Γλοίωμα - νευρινωμάτωση τύπου 1
- Φυματίωση
- Δυσπλασία Chiari II και μηνιγγομυελοκήλη

### - επίκτητες προσβολές

- Όγκοι: αστροκύτωμα, επενδύωμα, υποθαλαμικό ή οπτικό γλοίωμα, κρανιοφαρυγγίωμα, δυσγερμίνωμα (χωρίς έκκριση hCG), μηνιγγίωμα
- Τραυματισμός, ακτινοβολία κρανίου, κρανιοεγκεφαλική κάκωση, λοιμώδη αίτια
- Κοκκιωματώδης νόσος
- Εγκεφαλική παράλυση

### Χωρίς αλλοιώσεις στο ΚΝΣ

- Ιδιοπαθής πρόιμη ήβη
- Γενετικές αλλαγές: ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την κισπετίνη (KISS1) και τον υποδοχέα της (KISS1R), απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *MKRN3* και του *DLK1*
- Εκθεση σε στεροειδή φύλου (δευτερογενής κεντρική πρόιμη ήβη)

### Αιτίες περιφερικής πρόιμης ήβης

#### Κορίτσια

- Όγκος ωοθηκών
- Κύστη ωοθηκών
- Αυξημένη έκκριση αρωματάσης

#### Αγόρια

- Συγγενής πρόιμη ήβη (τεστοτοξίκωση)
- Όγκος κυττάρων Leydig
- Όγκος που εκκρίνει β-hCG

### Και στα δύο φύλα

- Σύνδρομο McCune-Albright
- Όγκος επινεφριδίων
- Εξωγενής έκθεση σε στεροειδείς ορμόνες
- Συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων

- Σύνδρομο Peutz-Jeghers

## 1.6 Διάγνωση της πρόωμης ήβης

Στην εκτίμηση ενός παιδιού με πρόωμη ηβική ωρίμανση, το πιο σημαντικό βήμα είναι η διάκριση μεταξύ κεντρικής και περιφερικής πρόωμης ήβης.

Ο ενδεδειγμένος έλεγχος της πρόωμης ήβης θα διενεργηθεί εφόσον έχει αποκλεισθεί ότι το παιδί παρουσιάζει απλή πρόωμη θηλαρχή ή πρόωμη αδρεναρχή. Η μονήρης ανάπτυξη των μαζικών αδένων σε ένα κορίτσι βρεφικής ηλικίας συνήθως οφείλεται σε απλή θηλαρχή. Επίσης, κορίτσια με ανάπτυξη τρίχωσης στο εφήβαιο ή στην περιοχή της μασχάλης χωρίς ανάπτυξη μαζικών αδένων είναι πολύ πιθανό να έχουν αδρεναρχή. Ευρήματα τα οποία υποδηλώνουν κάποια ενδεχομένως παθολογική κατάσταση περιλαμβάνουν ταχύ ρυθμό αύξησης, προχωρημένη ανάπτυξη για την ηλικία, προχωρημένη σκελετική ωρίμανση και στα κορίτσια η ύπαρξη ηβικής τριχοφυΐας με ταυτόχρονη ανάπτυξη των μαζικών αδένων, αν και η ιδιοπαθής πρόωμη ήβη μπορεί να περιλαμβάνει όλα τα προαναφερθέντα ευρήματα.

Η αρχική διαγνωστική προσέγγιση περιλαμβάνει λεπτομερές ατομικό και οικογενειακό ιστορικό αλλά και ενδεδειγμένα κατά συστήματα κλινική εξέταση για τον αποκλεισμό παθολογικών καταστάσεων. Η φυσική εξέταση περιλαμβάνει την αξιολόγηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών της ήβης - δηλαδή, την ανάπτυξη του μαστού στα κορίτσια και την εκτίμηση του όγκου των όρχεων στα αγόρια και την ανάπτυξη τρίχωσης εφηβαίου και στα δύο φύλα. Το στάδιο κάθε δευτερογενούς χαρακτηριστικού της ήβης εκτιμάται με βάση τα κριτήρια των Marshall και Tanner. Το ατομικό και κληρονομικό ιστορικό, η ηλικία έναρξης της ήβης, η πρόοδος της εφηβικής ωρίμανσης και ο υπολογισμός του ρυθμού αύξησης είναι ιδιαίτερης σημασίας. Σημαντικό ρόλο για την ενδεχόμενη έναρξη θεραπείας παίζει η διάκριση της ήβης σε εξελισσόμενη και μη εξελισσόμενη. Η διάκριση συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Κριτήρια για τη διαφοροποίηση της εξελισσόμενης από τη μη εξελισσόμενη μορφή της πρόωμης εφηβείας στα κορίτσια.

Κριτήρια	Εξελισσόμενη Πρόωμη Ήβη	Μη Εξελισσόμενη Πρόωμη Ήβη
<b>Κλινικά</b>		
Πρόοδος ήβης κατά Tanner	Πρόοδος από το ένα στάδιο στο άλλο σε 3-6 μήνες	Σταθεροποίηση ή υποστροφή σημείων εφηβείας

Ταχύτητα ανάπτυξης	Επιτάχυνση (> 6εκ ανά έτος)	Φυσιολογική και συμβατή με την χρονολογική ηλικία
Οστική ηλικία	Προχωρημένη τουλάχιστον κατά 1 έτος	Απόκλιση μικρότερη του 1 έτους σε σχέση με την φυσιολογική ηλικία
Προβλεπόμενο τελικό ανάστημα	Κάτω από το ύψος στόχος	Εντός των ορίων του ύψους στόχος
<b>Εμφάνιση έσω γεννητικών οργάνων</b>		
Γυναικολογικός υπέρηχος	Όγκος μήτρας > 20 κ.εκ ή μήκος >34mm, απιοειδής μήτρα, πάχυνση ενδομητρίου	Όγκος μήτρας <20 κ.εκ ή μήκος ≤34 mm
<b>Επίπεδα ορμονών</b>		
Οιστραδιόλη	Ανιχνεύσιμα επίπεδα	Μη ανιχνεύσιμα επίπεδα
Μέγιστη τιμή LH μετά από διέγερση με GnRH αγωνιστή	Εφηβική απάντηση	Προεφηβική απάντηση

Carel JC, Léger J. Clinical practice. Precocious puberty. N Engl J Med. 2008 May 29;358(22):2366-77. doi: 10.1056/NEJMcpr0800459. PMID: 18509122.

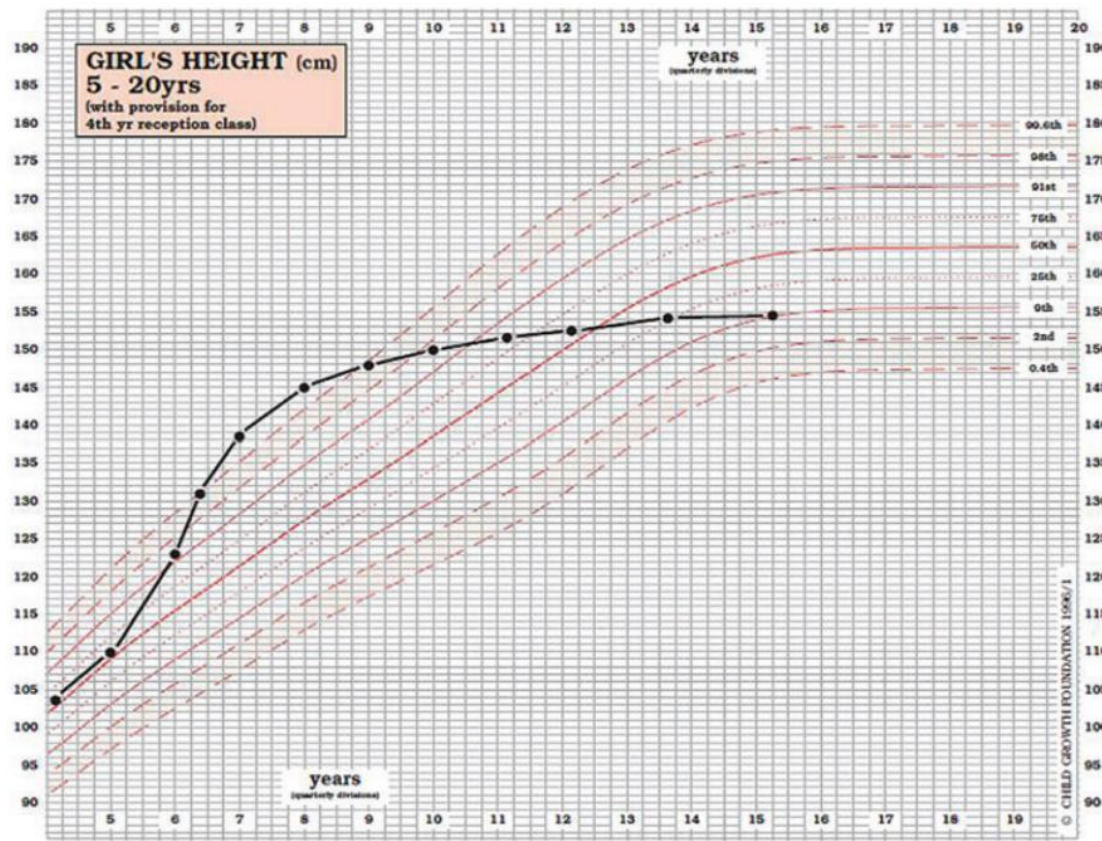
Ο εργαστηριακός έλεγχος και το βιοχημικό προφίλ για την διάγνωση της πρόωμης ήβης βασίζεται στην εκτίμηση των επιπέδων των γοναδοτροπινών, κυρίως της LH, έπειτα από διέγερση με εξωγενή χορήγηση GnRH ή GnRH αγωνιστή. Ερευνητές χρησιμοποιώντας νεότερη εργαστηριακή μέθοδο πρότειναν πως με μια τυχαία μέτρηση της βασικής LH χωρίς διέγερση μπορούν να εκτιμήσουν την πιθανότητα ενεργοποίησης του γοναδοτροπικού άξονα. Ωστόσο αρκετές μελέτες έδειξαν πως η ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ 60 και 100%. Σε ασθενείς με κλινικά στοιχεία πρόωμης ήβης αλλά προεφηβικά επίπεδα βασικής LH, η δοκιμασία διέγερσης GnRH ενδείκνυται για να καθορισθεί το επίπεδο ενεργοποίησης του γοναδοτροπικού άξονα. Γενικά, τα διάφορα πρωτόκολλα προτείνουν λήψη αίματος για μέτρηση των γοναδοτροπινών σε ένα ή περισσότερα χρονικά σημεία, που κυμαίνονται από 30' έως και 180 λεπτά μετά από ενδοφλέβια ή υποδόρια χορήγηση GnRH (82,83). Μερικοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι μία μόνο μέτρηση 30 ή 40 λεπτά μετά την έγχυση GnRH είναι επαρκής για να εκτιμηθεί η ενεργοποίηση του γοναδοτροπικού άξονα. Συγκεντρώσεις της LH >5IU/L, εφόσον έχουν μετρηθεί με υπερευαίσθητες μεθόδους (π.χ ανοσοφθορομετρικές, ανοσοχημειοφωτομετρικές και ηλεκτροχημειοφωτομετρικές), είναι συνήθως ενδεικτικές ενός ενεργοποιημένου γοναδοτροπικού άξονα, ήτοι έναρξης της ήβης (84,85). Σε αντίθεση με την LH, οι συγκεντρώσεις της βασικής αλλά και της διεγερμένης από την GnRH ωοθυλακιοτρόπου

ορμόνης (FSH) επικαλύπτονταν μεταξύ των διαφόρων εφηβικών σταδίων σε φυσιολογικά άτομα και, γενικά, δεν ήταν χρήσιμα στη διαφορική διάγνωση της πρόωρης ήβης. Ωστόσο χαμηλές συγκεντρώσεις της FSH, όπως και της LH, μετά από διέγερση με GnRH με ταυτόχρονη αύξηση των στεροειδών του φύλου (οιστραδιόλη για τα κορίτσια και τεστοστερόνη για τα αγόρια) μπορεί να δηλώνουν πιθανή περιφερική πρόωμη ήβη. Αντίστοιχα ο λόγος LH/FSH μετά διέγερση με GnRH όταν είναι >0.66 υποδηλώνει επίσης CPP. (82)

Γίνονται ερευνητικές προσπάθειες για την εύρεση και άλλων βιοχημικών δεικτών που θα βοηθήσουν στη διάγνωση της πρόωμης ήβης. Ένας από τους δείκτες που μελετάται είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης MKRN3 στον ορό, η οποία κωδικοποιείται από ένα πατρικά εκφραζόμενο γονίδιο το *MKRN3* που βρίσκεται στην κρίσιμη περιοχή του συνδρόμου Prader-Willi (χρωμόσωμα 15q11-q13). Σε πληθυσμιακή μελέτη σε κορίτσια στη Δανία εκτιμήθηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης της MKRN3 στον ορό. Οι συγκεντρώσεις MKRN3 μειώθηκαν πριν από την έναρξη της εφηβείας και συσχετίστηκαν αρνητικά με τις συγκεντρώσεις γοναδοτροπινών σε κορίτσια προεφηβικής ηλικίας. Μη ανιχνεύσιμες ή χαμηλές συγκεντρώσεις MKRN3 παρατηρήθηκαν σε μια υποομάδα ασθενών με πρόωμη έναρξη ήβης. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι MKRN3 στον ορό ενδέχεται να είναι χρήσιμη στην εκτίμηση της πρόωμης ήβης (86).

Έμφαση πρέπει να δοθεί και στις απεικονιστικές μεθόδους στη διάγνωση της πρόωμης ήβης. Η εκτίμηση της οστικής ηλικίας, χρησιμοποιώντας τον άτλαντα των Greulich και Pyle, μπορεί να καταδείξει την επίδραση των στεροειδών του φύλου στην επιφυσιακή ωρίμανση. Η οστική ηλικία των ασθενών με πρόωμη ήβη είναι γενικά μεγαλύτερη από τη χρονολογική ηλικία τους, και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του τελικού αναστήματος, αν και η ακρίβεια είναι χαμηλή (απόκλιση περίπου 6 cm κάτω ή πάνω από την προβλεπόμενη τιμή). Ο γυναικολογικός υπέρηχος μπορεί να δώσει χρήσιμα στοιχεία για μεταβολές της μήτρας λόγω της έκθεσης σε οιστρογόνα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης πρόωμης εφηβείας. Όγκος της μήτρας μεγαλύτερος από 20 cm<sup>3</sup> έχει αναφερθεί ότι έχει 89% ευαισθησία και ειδικότητα για πρόωμη ήβη. Στην μελέτη των Sathasivam et al σε 50 κορίτσια (ηλικίας 3.1-9.5 ετών) με υποψία πρόωμης ήβης έγινε σύγκριση της χρήσης του όγκου των ωοθηκών και της μήτρας που μετρήθηκαν με υπερηχογράφημα ως διαγνωστικού εργαλείου σε σύγκριση με τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της βασικής LH και οιστραδιόλης αλλά και έπειτα από διέγερση με λευπρολίδη (GnRH ανάλογο). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με το υπερηχογράφημα μόνο δεν είναι ασφαλής η διάκριση μεταξύ προεφηβικού κοριτσιού από αυτό που είναι στην αρχή της ήβης (87). Αντίστοιχα στα αγόρια το υπερηχογράφημα των όρχεων μπορεί να ανιχνεύσει όγκους κυττάρων Leydig και θα πρέπει να διενεργείται σε περιπτώσεις ασύμμετρου όγκου όρχεων ή περιφερικής πρόωμης ήβης.

Σημαντικό απεικονιστικό εργαλείο είναι η μαγνητική τομογραφία (MRI) του εγκεφάλου για την ανίχνευση υποθαλαμικής βλάβης σε περιπτώσεις κεντρικής πρόωμης ήβης. Η MRI πρέπει να γίνεται σε όλες τις περιπτώσεις κεντρικής πρόωμης ήβης. Η μελέτη του Mogensen et al έδειξε πως 13 (6%) από τα 208 κορίτσια με CPP που μελετήθηκαν εμφάνιζαν ανωμαλίες στην MRI εγκεφάλου. Σημαντικό στοιχείο είναι πως οι ανωμαλίες που εμφανίστηκαν στον απεικονιστικό έλεγχο δεν είχαν γίνει αντιληπτές κατά τον κλινικό ή ορμονολογικό έλεγχο, καταδεικνύοντας την χρησιμότητα του απεικονιστικού ελέγχου στην διαγνωστική προσέγγιση της πρόωμης ήβης (88). Σε αντίστοιχη μελέτη των Pedicelli et al το ποσοστό των κοριτσιών με παθολογική MRI ήταν στο 14%. (89)



Σχήμα 9. Διάγραμμα ύψους κοριτσιού με πρόωμη ήβη, το οποίο δείχνει ότι η πρόωμη εφηβική ανάπτυξη σταματά νωρίς τη γραμμική αύξηση και καταλήγει σε χαμηλό ύψος στην ενήλικη ζωή.

Συνοψίζοντας, τα περισσότερα παιδιά με πρόωμη σεξουαλική ανάπτυξη χρειάζονται παραπομπή σε παιδοενδοκρινολόγο για περαιτέρω εκτίμηση και διάγνωση. Η εκτίμηση θα πρέπει να περιλαμβάνει λεπτομερές ιστορικό και πλήρες εύρος εξετάσεων οι κυριότερες από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω.

- Ιστορικό



- Ηλικία έναρξης της ήβης, αλληλουχία εξέλιξης των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου
- Οικογενειακό ιστορικό: ηλικία έναρξης της ήβης στη μητέρα και στα αδέρφια
- Νευρολογικά συμπτώματα
- Έκθεση σε εξωγενή στεροειδή στις τροφές, στα φάρμακα ή στα καλλυντικά (στεροειδείς κρέμες, οιστρογόνα, αναβολικά στεροειδή)
- Κοινωνικό ιστορικό: ιστορικό υιοθεσίας ή σεξουαλική κακοποίηση
- Κλινική εξέταση
- Μέτρηση ύψους και βάρους, χρησιμοποιώντας διαγράμματα ανάπτυξης
- Δείκτης σωματικού βάρους (BMI)
- Στάδια ήβης κατά Tanner
- Νευρολογική εξέταση
- Οφθαλμολογική εξέταση, συμπεριλαμβανομένων οπτικών πεδίων και βυθοσκόπηση
- Εξέταση της κοιλιάς
- Εξέταση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων
- Σημάδια αρρενοποίησης, κλειτοριδομεγαλία, βάθεμα φωνής, δασυτριχισμός

## **Βιοχημικές εξετάσεις**

- Μέτρηση επιπέδων LH και FSH στο αίμα (βασικά επίπεδα και μετά διέγερση με GnRH)
- Μέτρηση επιπέδων οιστραδιόλης/τεστοστερόνης

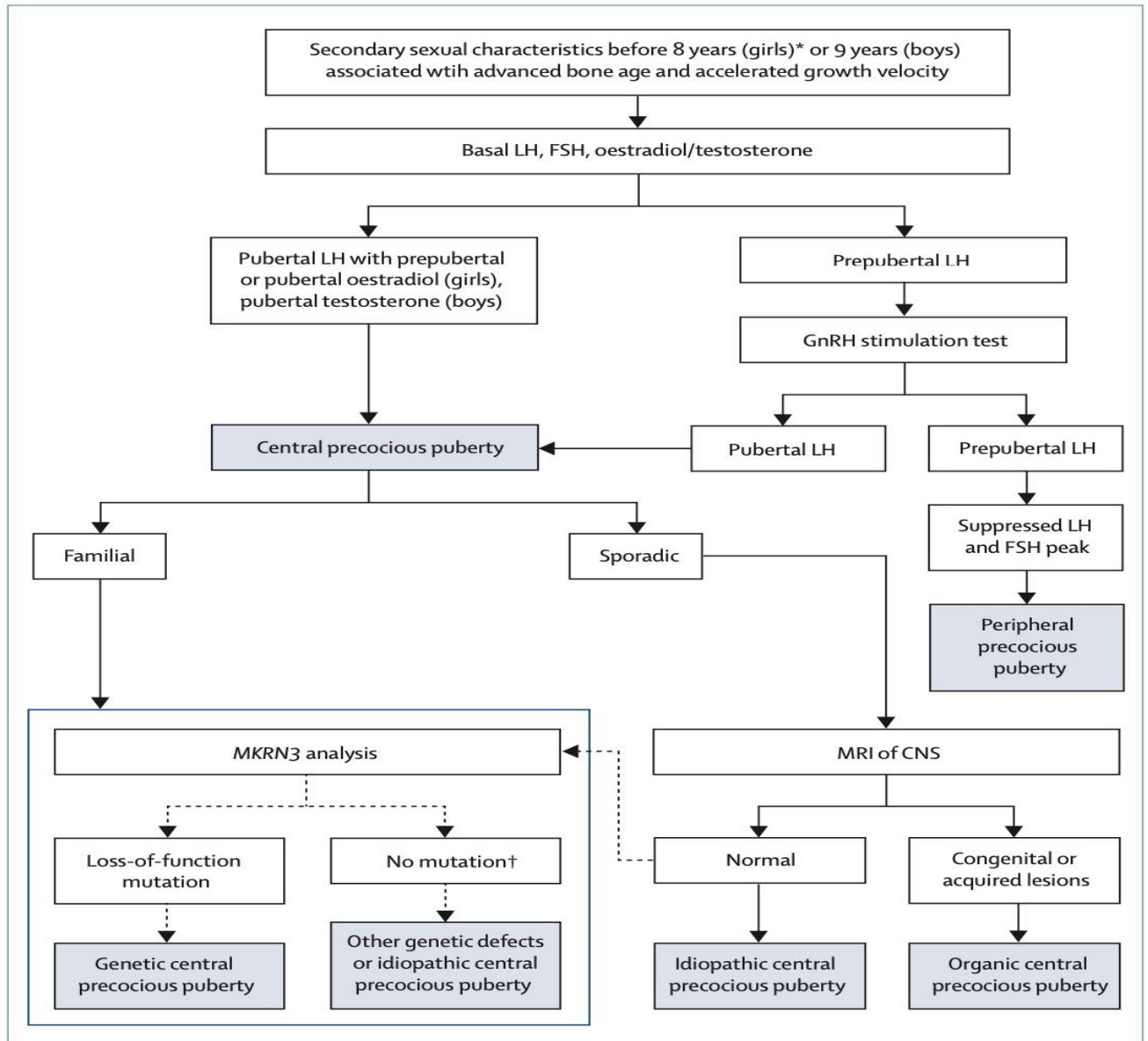
- Σε υποψία συγγενούς υπερπλασίας επινεφριδίων ή όγκου επινεφριδίων μέτρηση στεροειδών των επινεφριδίων (17OH-προγεστερόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη και ανδροστενδιόνη).
- Επίπεδα ελεύθερης θυροξίνης (FT4) και θυρεοτρόπου ορμόνης (TSH)
- β-hCG, αυξημένα επίπεδα ανιχνεύονται σε όγκους του ΚΝΣ ή άλλης εντόπισης που εκκρίνουν hCG.
- Επίπεδα προλακτίνης στο αίμα (μπορεί να υπάρχει αύξηση σε περιπτώσεις χρόνιου υποθυρεοειδισμού, στο σύνδρομο McCune-Albright ή να υποδηλώνει συμπιεστικά φαινόμενα της υπόφυσης).

### Απεικονιστικές εξετάσεις

- Ακτινογραφία αριστερού καρπού και άκρας χειρός για εκτίμηση της οστικής ηλικίας
- Μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (σε κεντρική πρώιμη ήβη)
- Μαγνητική τομογραφία στα επινεφρίδια (σε υποψία όγκου)
- Υπερηχογράφημα έσω γεννητικών οργάνων (μέγεθος, σχήμα μήτρας, πάχος ενδομητρίου και μορφολογία των ωοθηκών)

Αξίζει να σημειωθεί ο διαγνωστικός ρόλος του MKRN3, καθώς απενεργοποιητικές μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου εντοπίζονται πολύ συχνά σε οικογενείς περιπτώσεις κεντρικής πρώιμης ήβης (46). Αυτή η γενετική διαταραχή έχει συσχετιστεί με φυσιολογικές μαγνητικές τομογραφίες της περιοχής υποθαλάμου-υπόφυσης σε όλους τους πάσχοντες ασθενείς και των δύο φύλων, έτσι τα γενετικά αποτελέσματα θα επηρεάσουν την απόφαση σχετικά με τη διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας. Στην πραγματικότητα, ο έλεγχος ρουτίνας με μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου δεν φαίνεται να είναι χρήσιμος σε ασθενείς με σαφές οικογενειακό ιστορικό, όπως π.χ. δύο προσβεβλημένα αδέρφια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι γενετικές μελέτες θα μπορούσαν να προηγηθούν της μαγνητικής τομογραφίας εγκεφάλου, η διενέργεια της οποίας θα μπορούσε να αποτραπεί σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις του MKRN3. Το οικονομικό κόστος της γενετικής ανάλυσης του MKRN3, είναι πολύ χαμηλότερο από το κόστος της μαγνητικής τομογραφίας

εγκεφάλου στα παιδιά. Το αξιόπιστο οικογενειακό ιστορικό αποτελεί βασικό στοιχείο για την καθοδήγηση της ιατρικής απόφασης σχετικά με το αν θα γίνει πρώτα μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου ή η γενετική εξέταση.



Σχήμα 10: Διαγνωστικός αλγόριθμος, όπως προτείνεται από την Latronico et al, για την διερεύνηση της πρόωμης ήβης σε κορίτσια και αγόρια

Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016 Mar;4(3):265-274. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00380-0. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26852255.

## 1.7 Θεραπεία κεντρικής πρόωμης ήβης

Η θεραπεία της κεντρικής πρόωμης ήβης (CPP) συνίσταται στη χορήγηση GnRH αγωνιστή (ανάλογα GnRH). Οι κύριες ενδείξεις αναστολής της ήβης είναι οι ακόλουθες

- 1) Εμμηναρχή σε πολύ μικρή ηλικία. Η θεραπεία με ανάλογα GnRH ενδείκνυται για τη διακοπή της εμμήνου ρύσεως λόγω ψυχολογικής επιβάρυνσης του παιδιού.
- 2) Προβλεπόμενο κοντό τελικό ανάστημα. Θεραπεία με ανάλογα GnRH συνιστάται όταν το προβλεπόμενο τελικό ανάστημα είναι <3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ή 1.5 SD κατώτερο του ύψους στόχου.
- 3) Αρνητικές ψυχολογικές επιδράσεις της πρόωμης εφηβικής ωρίμανσης.

Οι μακράς δράσης αγωνιστές GnRH είναι συνθετικά ανάλογα της GnRH, τα οποία είναι 200 φορές ισχυρότερα από το φυσικό δεκαπεπτίδιο GnRH. Τα ανάλογα GnRH αποτελούν την κύρια μορφή θεραπείας από τα μέσα της δεκαετίας του '80. Ο τρόπος δράσης τους βασίζεται στη συνεχή διέγερση των γοναδοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης με συνέπεια ελάττωση του αριθμού των υποδοχέων της GnRH και επακόλουθη σημαντική ελάττωση της έκκρισης των γοναδοτροπινών (κυρίως της LH και σε μικρότερο βαθμό της FSH) (90). Για να επιτευχθεί η παρατεταμένη δράση, του δεκαπεπτιδίου GnRH η δομή του τροποποιείται με αντικατάσταση στη θέση 6 του αμινοξέος γλυκίνη με ένα υδρόφοβο D-αμινοξύ. Η χρήση των αναλόγων GnRH έχει ως τελικό αποτέλεσμα την μείωση ή σταθεροποίηση των συμπτωμάτων της ήβης, την ελάττωση του ρυθμού της αύξησης στα φυσιολογικά προεφηβικά επίπεδα και μείωση του ρυθμού αύξησης της οστικής ηλικίας (91).

Οι μορφές των χρησιμοποιούμενων GnRH αγωνιστών περιλαμβάνουν την τριπτορελίνη, την λευπρολίδη και την γκοζερελίνη που είναι διαθέσιμα ως μηνιαία ή 3μηνιαία σκευάσματα. Υπάρχει επίσης και το 12μηνιαίο διάστημα εμφύτευμα ιστρελίνης. Βραχείας δράσης σκευάσματα έχει αποδειχτεί πως δεν είναι τόσο αποτελεσματικά.

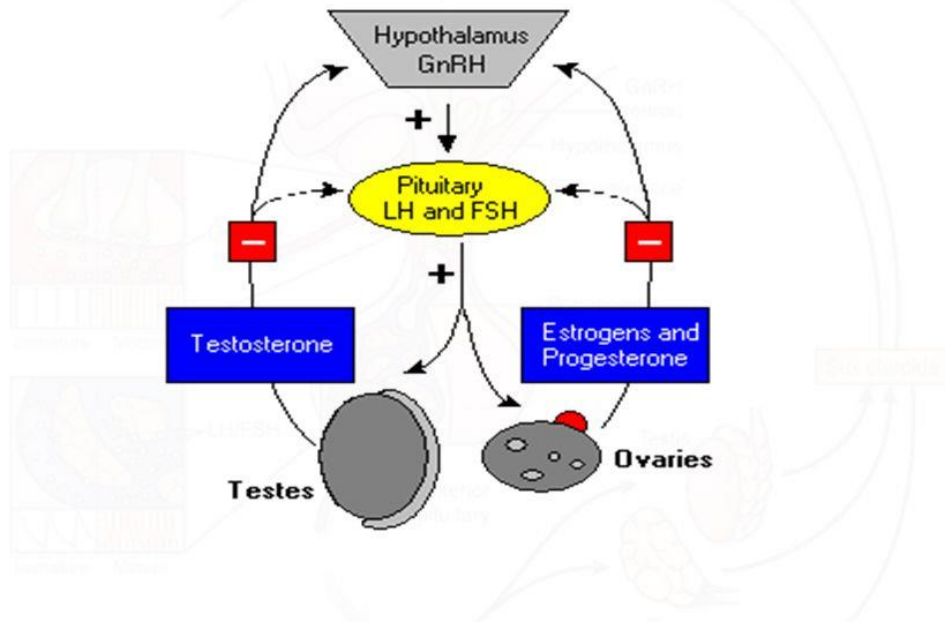
Η μηνιαία χορήγηση λευπρολίδης σε μορφή οξικού άλατος, μπορεί να είναι επώδυνη για το παιδί. Μια ανάλυση μεταξύ παιδιών που λάμβαναν λευπρολίδη για διάστημα 8 ετών έδειξε πως το 74% των παιδιών δεν λάμβανε τη θεραπεία σύμφωνα με τις οδηγίες. Αυτό, οδήγησε πολλές επιστημονικές ομάδες να διερευνήσουν τις μορφές λευπρολίδης μακράς διάρκειας που αναπτύχθηκαν για την θεραπεία του καρκίνου του προστάτη και της ενδομητρίωσης. Η δοσολογία της λευπρολίδης στη θεραπεία της κεντρικής πρόωμης ήβης ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα σε ΗΠΑ, Ευρώπη και Ασία. Στις ΗΠΑ προτείνεται το σχήμα με 7,5-15 mg μηνιαίως σε αντίθεση με το διεθνές πρότυπο των 3,75 mg που εφαρμόζεται σε Ευρώπη και Ασία. Στην Ευρώπη από 20ετίας περίπου έχει ξεκινήσει επίσης η χορήγηση της 3μηνιαίας depot λευπρολίδης (DL) 11.25mg. (92,93). Μελέτη διάρκειας 12 μηνών σχετικά με τις 3 διαφορετικές μορφές χορήγησης της λευπρολίδης κατέληξε πως, τα επίπεδα διεγερμένης LH και FSH ήταν σημαντικά υψηλότερα κατά τη διάρκεια της θεραπείας τόσο με τις

μηνιαίες δόσεις 3,75 mg όσο και με τις δόσεις 3-μηνιαίες δόσεις με 11,25 mg leuprolide, σε σύγκριση με αυτές των 7,5 mg μηνιαίως που εφαρμόζεται στις ΗΠΑ. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα χαμηλής δόσης παρασκευάσματα λευπρολίδης 1 και 3 μηνών σχετίζονται με αυξημένη διέγερση των γονάδων στους περισσότερους ασθενείς με CPP. Ωστόσο από την στιγμή που δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των στεροειδών του φύλου, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να υποστηρίξουν την κατάργηση των 3,75 mg ως τυπική δόση. Όσον αφορά την 3μηνια DL, η κλινική της χρήση αυξάνεται σταδιακά στις Ηνωμένες Πολιτείες. (94) . Αντίστοιχη μελέτη σε 59 παιδιά με CPP έδειξε πως χορήγηση λευπρολίδης 45mg εξάμηνιας διάρκειας κατέστειλε αποτελεσματικά τις εφηβικές ορμόνες και προκάλεσε αναστολή της εφηβικής ωρίμανσης. Το μακράς δράσης σκεύασμα οξικής λευπρολίδης φαίνεται ότι είναι μια νέα αποτελεσματική και καλά ανεκτή θεραπεία για παιδιά με CPP. (95)

Σε μερικά κέντρα κατά την έναρξη της θεραπείας συγχρησιμοποιείται οξική κρυπτοτερόνη για 1-2 μήνες για την αντιμετώπιση της αρχικά αυξημένης έκκρισης γοναδοτροπινών και την πιθανή εμφάνιση εμμήνου ρύσεως λόγω της παροδικής αύξησης των επιπέδων της οιστραδιόλης, πριν την απευαισθητοποίηση των γοναδοτρόπων κυττάρων. Σε περίπτωση μη επαρκούς καταστολής των γοναδοτροπινών η συχνότητα των ενέσεων μπορεί να αυξηθεί ή εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί το σκεύασμα σε υψηλότερη δοσολογία.

Ο βέλτιστος χρόνος για τη διακοπή της θεραπείας με ανάλογο GnRH δεν έχει καθοριστεί επαρκώς. Οι παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απόφαση για διακοπή της θεραπείας περιλαμβάνουν τον συγχρονισμό της ήβης με αυτή των συνομήλικων με στόχο την εμφάνιση έμμηνης ρύσης πλησίον της ηλικίας που εμφανίζεται στα κορίτσια του πληθυσμού. Στα κορίτσια η θεραπεία συνήθως διακόπτεται σε ηλικία 11 ετών. Τα καλύτερα αποτελέσματα για το τελικό ύψος επιτεύχθηκαν με διακοπή της θεραπείας όταν η οστική ηλικία είναι μεταξύ 12 και 12,5 ετών στα κορίτσια και μεταξύ 13 και 13,5 ετών στα αγόρια. Λίγους μήνες μετά την διακοπή της θεραπείας εμφανίζονται τα πρώτα σημεία επαναδραστηριοποίησης της ήβης, με μέσο χρόνο εμφάνισης εμμηνόρροιας τους 16 μήνες για θεραπεία με ανάλογα GnRH, και λιγότερο για εμφυτεύματα ιστρελίνης. (96) Έχει προταθεί η προσθήκη αυξητικής ορμόνης ή οξανδρολόνης (97,98) όταν μειώνεται η ταχύτητα αύξησης (<4 cm/έτος) ή εάν το ύψος στόχος είναι χαμηλό, αλλά τα δεδομένα σχετικά με την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια αυτών των φαρμάκων σε παιδιά με πρώιμη ήβη είναι λίγα και επομένως δεν συνιστώνται.

# GnRH Pathway



Σχήμα 11. Ανάλογα GnRH και ο μηχανισμός λειτουργίας τους.

Μια εναλλακτική προσέγγιση στη θεραπεία της CPP είναι τα εμφυτεύματα ιστρελίνης. Η ιστρελίνη είναι ένα εμφυτεύσιμο GnRH ανάλογο, 150 φορές πιο ισχυρό από την ενδογενή GnRH. Το εμφύτευμα είναι μια εύκαμπτη, μη βιοδιασπώμενη συσκευή που περιέχει ιστρελίνη και εισάγεται υποδόρια με τη χρήση τροκάρ. Τα μικροπορώδη τοιχώματα επιτρέπουν στην ιστρελίνη να διαχέεται με ρυθμό περίπου 65 mcg/ημέρα (99). Πιλοτική μελέτη που διεξήχθη σε 11 κορίτσια, τα οποία λάμβαναν ήδη θεραπεία με GnRHα triptorelin embonate, έδειξε διατήρηση της καταστολής υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων για έως και 1 έτος μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος ιστρελίνης. Σε όλα τα κορίτσια, η ανάπτυξη των μαζικών αδένων υποχωρούσε, η ταχύτητα ανάπτυξης μειωνόταν και η πρόοδος της οστικής ηλικίας επιβραδυνόταν. Έπειτα από παρακολούθηση 15 μηνών μετά την τοποθέτηση του εμφυτεύματος, τα επίπεδα των γοναδοτροπινών πριν και μετά την διέγερση με GnRH, αλλά και τα επίπεδα E2 παρέμειναν κατεσταλμένα. Οι ασθενείς και οι γονείς ανέφεραν λιγότερο πόνο και δυσφορία και βελτίωση στις καθημερινές δραστηριότητες με το εμφύτευμα σε σύγκριση με τις συνήθεις μηνιαίες ενέσεις. (99) Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από άλλη μελέτη 36 παιδιών με CPP (20 δεν λάμβαναν θεραπεία και 16 λάμβαναν θεραπεία με GnRHα για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης). Τα αποτελέσματα και αυτής της μελέτης

έδειξαν πως το υποδερμικό εμφύτευμα ιστρελίνης επιτυγχάνει αλλά και διατηρεί την καταστολή της αιχμής της LH και των επιπέδων των στεροειδών του φύλου για 1 έτος μετά την εμφύτευση του. Η θεραπεία με το εμφύτευμα ιστρελίνης μείωσε επίσης σημαντικά τον ρυθμό της σκελετικής ωρίμανσης κατά τη διάρκεια του έτους της θεραπείας. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή στο προβλεπόμενο τελικό ύψος. Η μη αύξηση του προβλεπόμενου τελικού ύψους δεν είναι απροσδόκητη, δεδομένης της σχετικά σύντομης διάρκειας της μελέτης. (100) Ένα υποσύνολο 31 ασθενών παρακολούθηθηκε για 2 επιπλέον χρόνια. Ένα καινούριο εμφύτευμα ιστρελίνης τοποθετήθηκε μετά από ένα χρόνο επιτυχούς θεραπείας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αιχμή της LH μειώθηκε από  $0,92 \pm 0,58$  mIU/mL στους 12 μήνες σε  $0,51 \pm 0,33$  mIU/mL στους 24 μήνες ( $P < 0,0001$ ) στην ομάδα που δεν είχε λάβει προηγουμένως άλλη θεραπεία και από  $0,74 \pm 0,50$  mIU/mL στους 12 μήνες σε  $0,45 \pm 0,35$  mIU/mL στους 24 μήνες ( $P = 0,0081$ ) στα άτομα που είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία. Η μέγιστη τιμή FSH στους 24 μήνες δεν διέφερε από εκείνη στους 12 μήνες και παρέμεινε κατεσταλμένη σε  $2,45 \pm 1,12$  mIU/mL (χωρίς θεραπεία) και  $2,40 \pm 1,11$  mIU/mL (προηγουμένως θεραπευθέντες). Τα επίπεδα οιστραδιόλης παρέμειναν κατεσταλμένα καθ' όλη τη διάρκεια του δεύτερου έτους της μελέτης. Τα επίπεδα τεστοστερόνης στα δύο αγόρια που συμμετείχαν στη μελέτη, στους 24 μήνες ήταν 6,8 ng/dL και 13 ng/dL, αντίστοιχα. Τα επίπεδα ιστρελίνης ήταν ανιχνεύσιμα καθ' όλη τη διάρκεια του δεύτερου έτους της θεραπείας. (98). Κατά τη διάρκεια της μελέτης το προβλεπόμενο τελικό ύψος με βάση τη μέθοδο που χρησιμοποιεί τους πίνακες Bayley-Pinneau αυξήθηκε κατά 5.1cm συγκρινόμενο με τις προβλέψεις πριν τη θεραπεία.

Οι παρενέργειες των εμφυτευμάτων ιστρελίνης ήταν ελάχιστες και αφορούσαν κυρίως πόνο και μελάνιασμα στο σημείο εισόδου του εμφυτεύματος (παρατηρήθηκαν στο 61% των συμμετεχόντων). Μετά από 1 χρόνο τα εμφυτεύματα έγιναν σχετικά εύθραυστα και κατά την αφαίρεσή τους, συνήθως έσπαγαν (συνέβη στο 16-22% των περιπτώσεων τον πρώτο και δεύτερο χρόνο αντίστοιχα). Σε ένα 5-10% των περιπτώσεων χρειάστηκε η χρήση υπερηχογραφήματος για να εντοπιστούν τα θραύσματα του εμφυτεύματος (98).

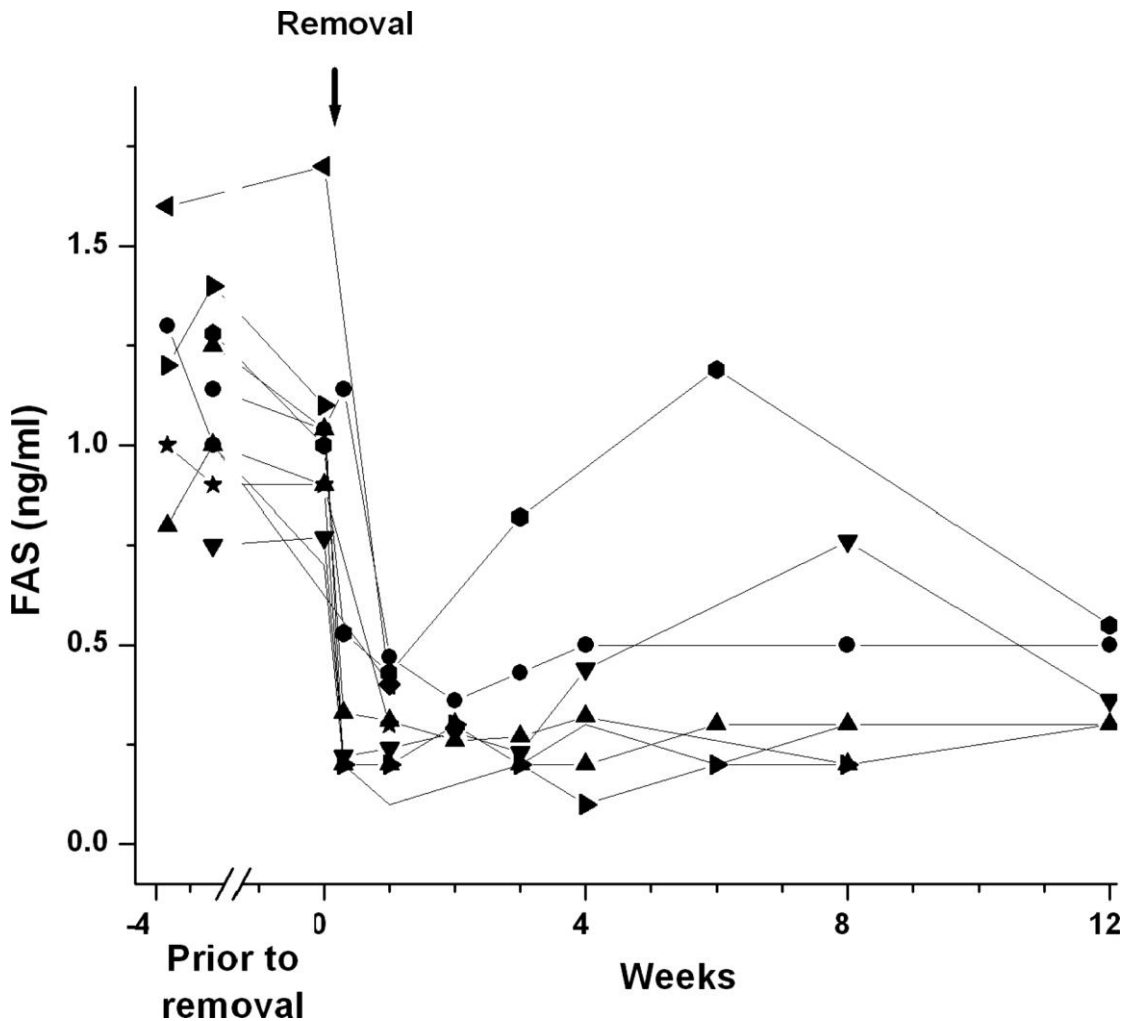
Μετά την τοποθέτηση ενός νέου εμφυτεύματος στους 12 μήνες, η καταστολή του άξονα HPG διατηρήθηκε σε όλους τους ασθενείς κατά την διάρκεια και του δεύτερου έτους θεραπείας. Επιπλέον, ο ρυθμός σκελετικής ωρίμανσης επιβραδύνθηκε σημαντικά και το προβλεπόμενο τελικό ύψος βελτιώθηκε μετά από 24 μήνες σε σύγκριση με την αρχική εκτίμηση. Μια μελέτη ανάμεσε σε 33 παιδιά με CPP απέδειξε πως ένα μόνο εμφύτευμα ιστρελίνης που χρησιμοποιείται στην παρούσα φάση περιέχει αρκετή δραστική ουσία για να διαρκέσει 2 περίπου χρόνια. Τα αποτελέσματα έδειξαν καταστολή του άξονα υποθάλαμος-υπόφυσης-γονάδες καθ' όλη την διάρκεια των 2 ετών αλλά και άριστη κλινική ανταπόκριση. Αυτή η προοπτική θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά το κόστος αλλά

και τον αριθμό των επεμβάσεων για την αφαίρεση και τοποθέτηση του εμφυτεύματος. Οι δυσκολίες με την αφαίρεση του εμφυτεύματος (39% στην παρούσα μελέτη), περιλάμβαναν την ανάγκη για μια μικρή κάθετη τομή ή θραύση του εμφυτεύματος και αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα. (101)

Μια ακόμα εργαστηριακή παράμετρος που αξίζει να αναφερθεί είναι η χρήση της FAS (free  $\alpha$ -subunit) ως του πιο ευαίσθητου δείκτη για την αποκατάσταση του επιπέδου των γοναδοτροπινών μετά την αφαίρεση του εμφυτεύματος ιστρελίνης. Οι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες LH, FSH και TSH αποτελούνται από δύο διαφορετικές μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες. Οι  $\alpha$ -υπομονάδες είναι κοινές για την LH, την FSH και την TSH, ενώ η  $\beta$ -υπομονάδα είναι μοναδική για κάθε ορμόνη. Η παραγωγή της  $\beta$ -υπομονάδας είναι και το καθοριστικό βήμα για τη σύνθεση της ορμόνης καθώς αυτή η υπομονάδα καθορίζει τις μοναδικές βιολογικές και ανοσολογικές ιδιότητες της γλυκοπρωτεϊνικής ορμόνης (102).

Προηγούμενες μελέτες σε παιδιά με CPP έδειξαν ότι η καταστολή της LH και της FSH από depot παρασκευάσματα της GnRH $\alpha$  συνοδεύτηκε από αυξημένη ελεύθερη  $\alpha$ -υπομονάδα (FAS). Τα δεδομένα μετά από μελέτη 10 κοριτσιών με CPP δείχνουν ότι τα επίπεδα FAS αυξάνονται ταχέως μετά την τοποθέτηση εμφυτεύματος ιστρελίνης, παραμένουν αυξημένα για έως και 5 έτη θεραπείας και μειώνονται σταθερά και ταχέως στα επίπεδα πριν από τη θεραπεία εντός 2-7 ημερών μετά την αφαίρεση του εμφυτεύματος. Μια μόνο μέτρηση αυξημένης FAS κατά τη διάρκεια της θεραπείας αποτελεί ακριβή δείκτη καταστολής των γοναδοτροπινών, ενώ μια φυσιολογική τιμή FAS που λαμβάνεται μεταξύ 5 και 7 ημερών μετά την αφαίρεση του εμφυτεύματος αποτελεί τον πιο ευαίσθητο και ακριβή δείκτη ανάκτησης των επιπέδων των γοναδοτροπινών. (103)



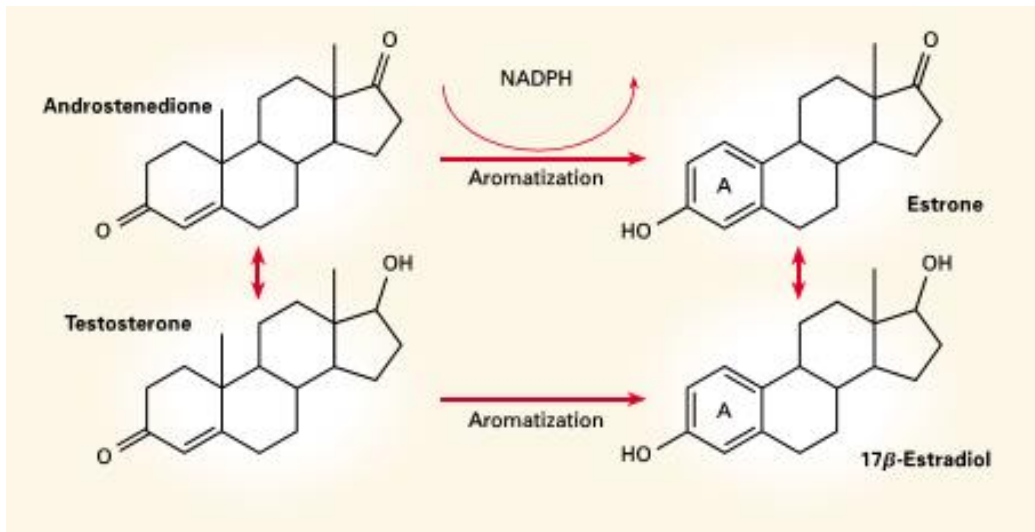


Σχήμα 12. Επίπεδα FAS σε εννέα κορίτσια με CPP που έλαβαν θεραπεία με το εμφύτευμα ιστρελίνης, πριν και μετά την αφαίρεση του εμφυτεύματος. Το φυσιολογικό εύρος της FAS σε κορίτσια προεφηβικής ηλικίας είναι μικρότερο από 0,6 ng/ml.

## 1.8 Το γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα

Τα οιστρογόνα τα οποία συντίθενται φυσιολογικά στον οργανισμό του ανθρώπου, είναι στεροειδείς χημικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται από τη χοληστερόλη. Η χοληστερόλη προσδένεται στους λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς των στεροειδογόνων κυττάρων και αφού εισέλθει σε αυτά μεταφέρεται σε σημεία στεροειδικής σύνθεσης. Η ενδοκυτταρική σύνθεση διευκολύνεται από τον κυτταροσκελετό και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη μεταφοράς στερόλης 2. Το βήμα το οποίο ρυθμίζει την παραγωγή των οιστρογόνων είναι η μεταφορά της χοληστερόλης από το κυτταρόπλασμα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, όπου τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 καταλύουν την διάσπαση της πλάγιας αλυσίδας της χοληστερόλης. Η στεροειδογενετική πρωτεΐνη StAR (steroidogenic acute regulatory protein) είναι άμεσα συνδεδεμένη και παίζει

σημαντικό ρόλο στη συγκεκριμένη διαδικασία μεταφοράς. Μεταλλάξεις στη πρωτεΐνη StAR έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής όχι μόνο των οιστρογόνων αλλά και γενικότερα στεροειδών των γονάδων και των επινεφριδίων, γι' αυτό εάν δεν διαγνωσθούν έγκαιρα επέρχεται θάνατος από οξεία επινεφριδική ανεπάρκεια (104).



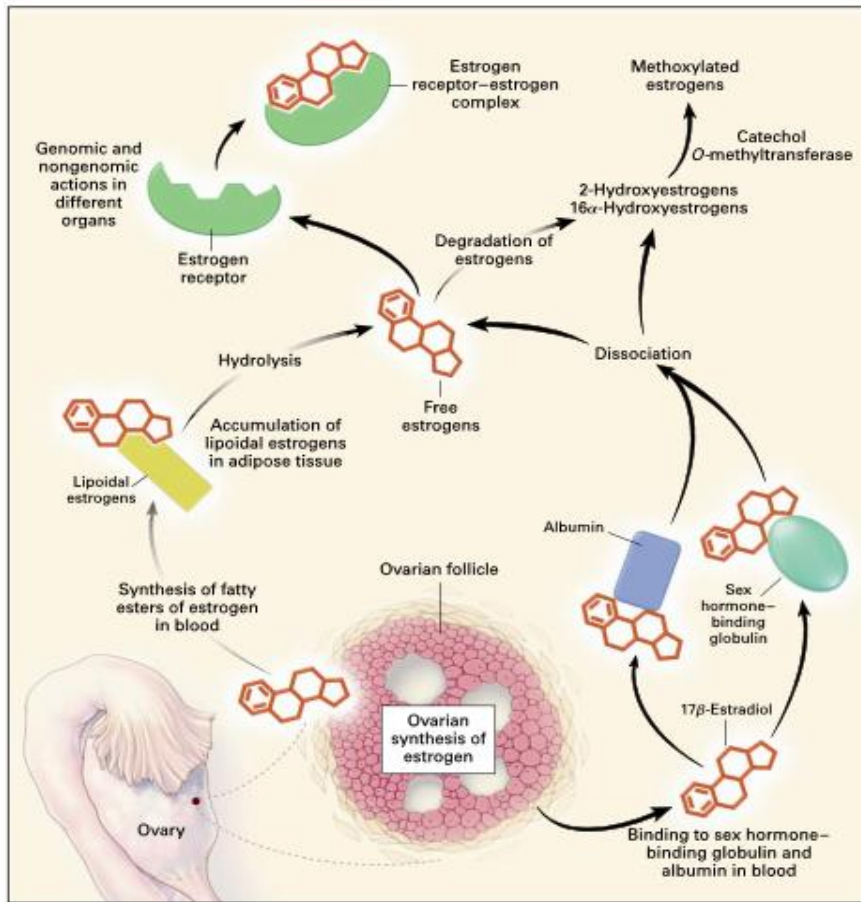
Σχήμα 13. Η μοριακή δομή και η παραγωγή των ενδογενών οιστρογόνων.

Στον ορό, τα οιστρογόνα συνδέονται με τη δεσμευτική σφαιρίνη των ορμονών του φύλου (SHBG, Sex Hormone Binding Globulin) και με λευκοματίνη, έτσι μόνο το 2 – 3% των οιστρογόνων ευρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στην κυκλοφορία του αίματος. Τα οιστρογόνα μεταβολίζονται από προσθήκη ομάδας θείου και τα κατάλοιπά τους απεκκρίνονται από τους νεφρούς ή τη χολή. Η υδρόλυση των κατάλοιπων αυτών από την εντερική χλωρίδα και η ταυτόχρονη επαναπορρόφησή τους έχουν ως αποτέλεσμα την εντεροηπατική τους κυκλοφορία. Τα οιστρογόνα μεταβολίζονται επίσης και με υδροξυλίωση και ταυτόχρονη μεθυλίωση και σχηματίζουν κατεχόλες και μεθυλιωμένα οιστρογόνα. Τα παράγωγα των αντιδράσεων αυτών είναι μεθοξυλιωμένοι οιστρογονικοί μεταβολίτες. Η διαδικασία αυτή παράγει ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προσδένονται στο DNA και έχει προταθεί ότι έχουν τοξική δράση σε ορισμένα γονίδια (105). Στο Σχήμα 14 φαίνεται η σύνθεση των οιστρογόνων στις ωοθήκες, η μεταφορά και ο μεταβολισμός τους.

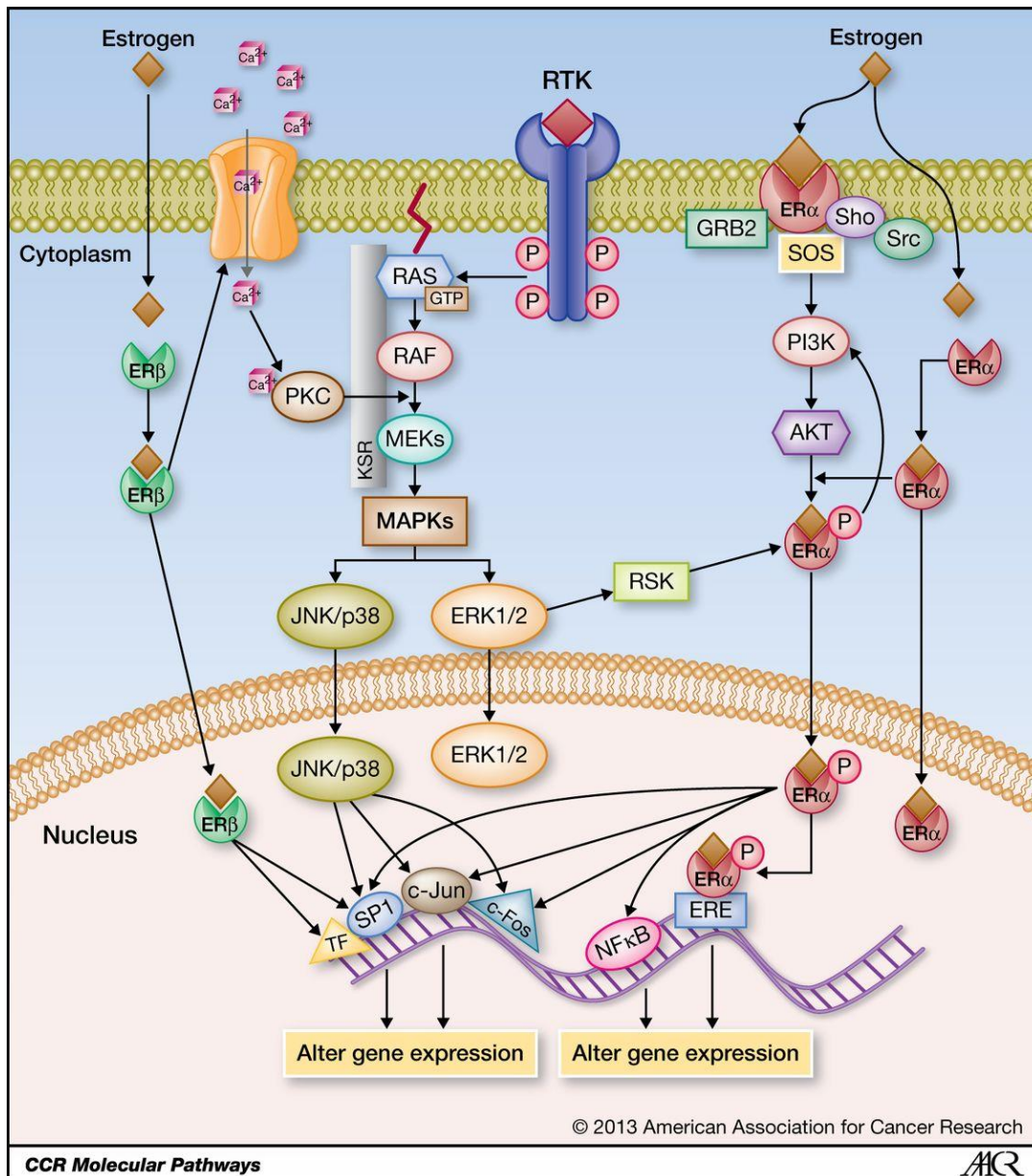
Ως στεροειδείς ορμόνες, τα οιστρογόνα μπορούν να εισέλθουν στην πλασματική μεμβράνη και να αλληλεπιδράσουν με τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς ERα και ERβ για να ασκήσουν άμεσες επιδράσεις μέσω της πρόσδεσης σε αλληλουχίες DNA. Εναλλακτικά, τα οιστρογόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν ενδοκυττάριους καταρράκτες σηματοδότησης μέσω αλληλεπίδρασης με τον GPER1 (G-protein coupled estrogen receptor 1) και/ή τα ERα και ERβ. Τα μεσολαβούμενα από τα οιστρογόνα

σηματοδοτικά συμβάντα μπορούν να διαχωριστούν σε γονιδιωματικά (genomics) και μη γονιδιωματικά (non-genomics). Τα γονιδιωματικά συμβάντα περιλαμβάνουν τη μετανάστευση των συμπλόκων οιστρογόνων-υποδοχέων στον κυτταρικό πυρήνα και την άμεση αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA γνωστές ως estrogen response elements (EREs). Ενώ τα EREs έχουν εντοπιστεί σε αρκετούς υποκινητές γονιδίων και ρυθμιστικές περιοχές, έχει αναφερθεί ότι πάνω από το ένα τρίτο των ανθρώπινων γονιδίων που ρυθμίζονται από τους υποδοχείς οιστρογόνων δεν περιέχουν στοιχεία αλληλουχίας ERE. Από την άλλη πλευρά, οι μη-γονιδιωματικές επιδράσεις περιλαμβάνουν έμμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μιας ποικιλίας ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών γεγονότων. (106) Η μοριακή δράση των οιστρογόνων φαίνεται αναλυτικότερα στο Σχήμα 15.

Οι ειδικές δράσεις των οιστρογόνων καθορίζονται από τη δομή της ορμόνης, το ισομερές του οιστρογονικού υποδοχέα, τα χαρακτηριστικά του υποκινητού για το γονίδιο-στόχο και την ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιητών και των καταστολέων του γονιδίου. Οι παράγοντες αυτοί, ρυθμίζουν το τελικό μεταγραφικό προϊόν στο σύμπλοκο του οιστρογόνου και του οιστρογονικού υποδοχέα. Ο οιστρογονικός υποδοχέας, όταν δεν είναι προσδεμένος με οιστρογόνα, είναι χαλαρά προσδεμένος με πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα ή εντός του πυρήνα, που τον σταθεροποιούν σε μη ενεργή κατάσταση είτε καλύπτουν την περιοχή δέσμησης του DNA του υποδοχέα (receptor associated proteins-RAPs) (107).



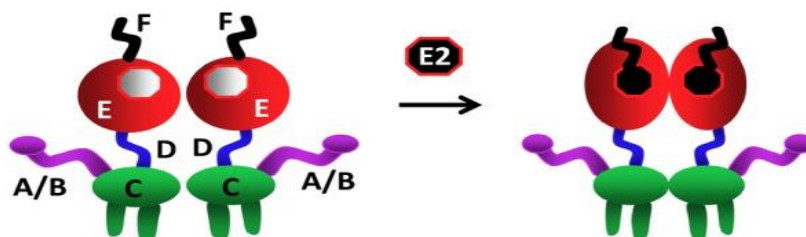
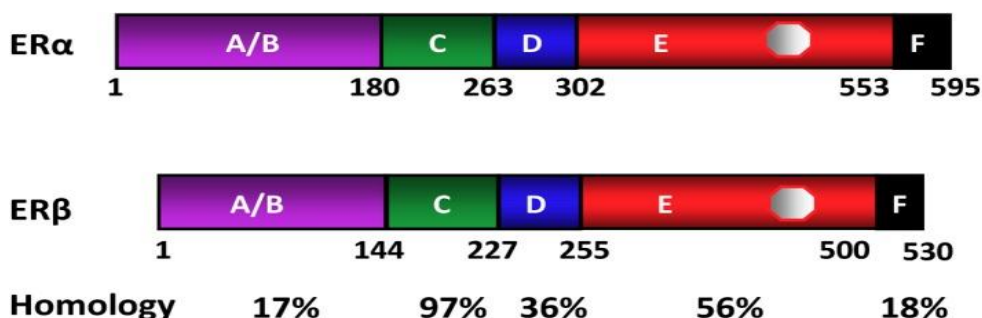
Σχήμα 14. Σύνθεση, μεταφορά και μεταβολισμός οιστρογόνων. Μετά τη σύνθεσή της, κυρίως στην ωοθήκη, η 17β-οιστραδιόλη εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου συνδέεται με τη SHBG και τη λευκοματίνη. Τα ελεύθερα οιστρογόνα διαχέονται στους ιστούς. Τα λιποειδή οιστρογόνα συντίθενται στο αίμα και πιθανώς σε άλλους ιστούς, αλλά συσσωρεύονται κυρίως στο λίπος. Ο ενζυμικός καταβολισμός των οιστρογόνων αποδίδει τα υδροξυοιστρογόνα και τα μεθοξυοιστρογόνα.



Σχήμα 15. Δράση των οιστρογόνων σε μοριακό επίπεδο. Η γονιδιακή έκφραση των οιστρογόνων υπόκειται σε τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης. (1) κλασική σηματοδότηση με σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα, (2) ενεργοποίηση με καταρράκτη υποδοχέα τυροσινικών κινασών (RTKs) και υποδοχέα του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (IGFR). (3) Φωσφορυλίωση από κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Σηματοδότηση με μη γονιδιακούς μηχανισμούς. Το σύμπλοκο το οποίο σχηματίζεται με την ορμόνη, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στη συγκέντρωση λειτουργικών συμπλόκων, η οποία τελικά ενεργοποιεί καταρράκτες ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς είναι μέλη μιας υπερικογένειας πυρηνικών ορμονικών ενδοκυττάρων υποδοχέων (NHRs), που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι NHRs κατανέμονται σε όλο το σώμα και διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στις κυτταρικές διεργασίες. Οι NHRs περιλαμβάνουν τον υποδοχέα ανδρογόνων, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), τον υποδοχέα προγεστερόνης, τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών, τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER) $\alpha$  και τον ER $\beta$ .

(108,109). Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ) έχουν ορισμένα κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Οι υποδοχείς οιστρογόνων, όπως και άλλα μέλη των NHRs, υποδιαιρούνται σε έξι λειτουργικά διακριτές περιοχές. Οι δομικά διακριτές αμινοτελικές περιοχές A/B εμφανίζουν 17% ομολογία αμινοξέων μεταξύ των ERs. Η σχεδόν πανομοιότυπη κεντρική περιοχή C (97%) είναι η περιοχή δέσμησης DNA (DBD). Η εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης ή D (36%) περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και συνδέει την περιοχή C με την πολυλειτουργική καρβοξυτελική περιοχή (E), η οποία ονομάζεται επίσης "ligand binding domain" (LBD). Η περιοχή E παρουσιάζει 56% ομολογία αμινοξέων μεταξύ των ER. Η LBD είναι μια σφαιρική περιοχή που φιλοξενεί μια θέση πρόσδεσης ορμονών, μια δομή διμερισμού, και μια λειτουργία αλληλεπίδρασης συν-ρυθμιστή που εξαρτάται από τον συνδέτη (λειτουργία ενεργοποίησης). Η περιοχή F, η οποία εμφανίζει 18% ομολογία αμινοξέων, βρίσκεται στο ακραίο καρβοξυτελικό άκρο των υποδοχέων (110).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών των οιστρογονικών υποδοχέων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπάρχουν δύο υπότυποι οιστρογονικών υποδοχέων ο κλασικός υποδοχέας οιστρογόνων α (ERα), ο οποίος κλωνοποιήθηκε το 1986, και ο οιστρογονικός υποδοχέας β (ERβ), που ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα. Οι δύο υπότυποι υποδοχέων διαφέρουν ως προς τη δομή, ενώ τα γονίδια τα οποία τους κωδικοποιούν, τα *ESR1* και *ESR2*, για τον υποδοχέα α και β, αντίστοιχα, βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *ESR1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 6q25, ενώ το γονίδιο *ESR2* εδράζεται στο χρωμόσωμα 14q22-24. Το

γονίδιο *ESR1* έχει συνολικό μήκος 140 kb, περιέχει 8 εξώνια, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 595 αμινοξέα και εντοπίζεται στην περιοχή του κυτταρικού πυρήνα (110). Το γονίδιο *ESR2* περιέχει επίσης 8 εξώνια. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής του DNA και αλληλοεπιδρούν με ειδικούς συν-ρυθμιστές, η στρατολόγηση των οποίων γίνεται από τα οιστρογόνα, που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής.

Αν και οι περιοχές πρόσδεσης του DNA των οιστρογονικών υποδοχέων  $\alpha$  και  $\beta$  είναι παρόμοιες, ο συνολικός βαθμός ομολογίας των υποδοχέων μεταξύ τους είναι σχετικά μικρός. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των μορίων. Στην περιοχή αυτή μόλις το 55% της αλληλουχίας των αμινοξέων είναι κοινό, έτσι τα μόρια προσδένονται στους υποδοχείς με διαφορετικό ποσοστό πρόσδεσης (Πίνακας 1). Για παράδειγμα, η 17 $\alpha$  οιστραδιόλη ταχείας δράσης και η βιολογικά ασθενής οιστρόνη έχουν μεγαλύτερη συνάφεια κατά την πρόσδεση με τον οιστρογονικό υποδοχέα τύπου  $\alpha$ . Από την άλλη πλευρά, τουλάχιστον δύο φυτοοιστρογόνα, η γενιστίνη και η κουμετρόλη, προσδένονται με περισσότερη συνάφεια στον οιστρογονικό υποδοχέα τύπου  $\beta$ . Ο εκλεκτικός ρυθμιστής των οιστρογονικών υποδοχέων ραλοξιφαίνη προσδέεται με μεγαλύτερη συνάφεια στον υποδοχέα  $\alpha$  ενώ μερικοί παράγοντες περιβαλλοντικής μόλυνσης (π.χ. αλκυλοφενόλες) δένονται με μεγαλύτερη συνάφεια στον υποδοχέα οιστρογόνων τύπου  $\beta$  (111).

Πίνακας 1. Σχετική συνάφεια πρόσδεσης μορίων με τους υποδοχείς οιστρογόνου  $\alpha$  και  $\beta$ .

LIGAND	ESTROGEN RECEPTOR $\alpha$	ESTROGEN RECEPTOR $\beta$
17 $\beta$ -Estradiol†	100	100
17 $\alpha$ -Estradiol†	58	11
Estriol†	14	21
Estrone†	60	37
4-Hydroxyestradiol†	13	7
2-Hydroxyestrone‡	2	0.2
Tamoxifen‡	4	3
Raloxifene‡	69	16
Genistein‡	4	87
Coumestrol‡	20	140
Daidzein‡	0.1	0.5
4-Octylphenol‡	0.02	0.07
Nonylphenol‡	0.05	0.09

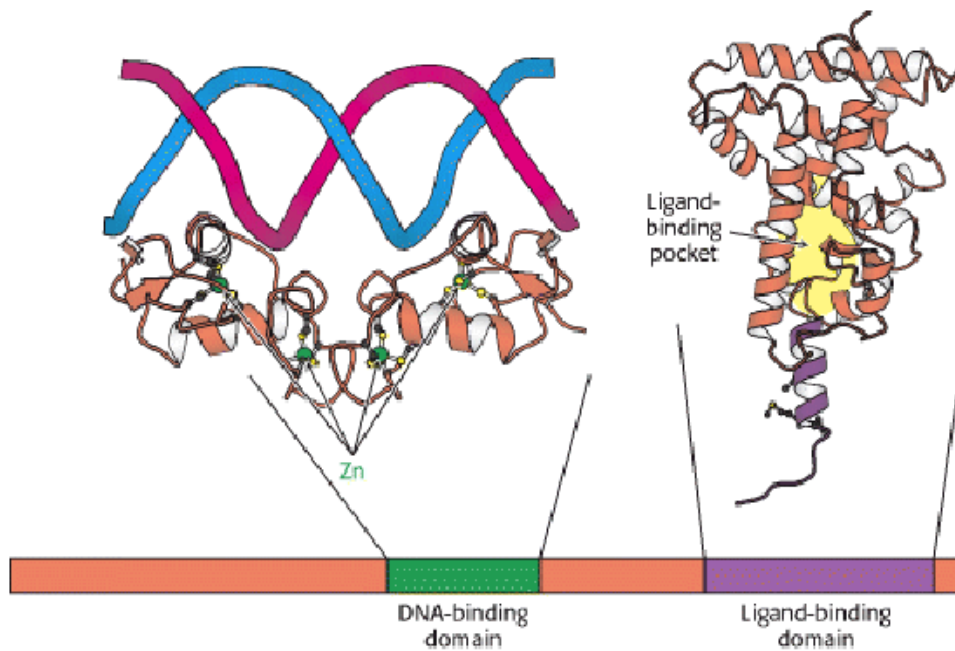
\*οι τιμές κυμαίνονται από 0 μέχρι 100, με τις μεγαλύτερες τιμές να υποδηλώνουν μεγαλύτερη συνάφεια.

Η κατανομή των οιστρογονικών υποδοχέων στους ιστούς διαφέρει, αν και σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει αλληλοεπικάλυψη. Τα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων και οι αναπτυσσόμενες σπερματίδες στους όρχεις, περιέχουν κυρίως τον οιστρογονικό υποδοχέα β. Ο υπότυπος αυτός βρίσκεται και σε πολλούς ιστούς-στόχους, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του πνευμονικού παρεγχύματος, του μυελού των οστών, των ενδοθηλιακών κυττάρων και του αδένου του προστάτη. Αντίθετα, ο οιστρογονικός υποδοχέας α εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο ενδομήτριο και την υπόφυση και σε μικρότερο βαθμό στον υποθάλαμο, στα οστά, το ήπαρ, τα καρκινικά κύτταρα στο μαστό και τα κύτταρα των ωοθηκών (111).

Σε ποντίκια, βλάβη στο γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα συνεπάγεται προβλήματα γονιμότητας και μειωμένη οστική πυκνότητα (περισσότερο στα θηλυκά). Θηλυκά ποντίκια με αδρανοποιημένο το γονίδιο *ESR1* ήταν στείρα και ανωορρηκτικά, παρουσίαζαν ωοθήκες με πολλές μικρές κύστες, υποπλαστική μήτρα και δεν ανέπτυσαν μαζικούς αδένες. Επίσης, θηλυκά ποντίκια με αδρανοποιημένο το γονίδιο *ESR2* είχαν πολύ μειωμένη γονιμότητα ενώ τα αρσενικά ποντίκια είχαν υπερπλασία του προστάτη και μειωμένο κοιλιακό λίπος (112). Η έλλειψη λειτουργικών οιστρογονικών υποδοχέων, λόγω μεταλλάξεων του *ESR1*, είναι εξαιρετικά σπάνια στον άνθρωπο. Έχουν περιγραφεί μόνο 5 περιπτώσεις συνολικά και των 2 φύλων (2 άρρενες, 3 θήλεα) με κλινική εικόνα που χαρακτηρίζεται από καθυστέρηση της ενήβωσης, ψηλό ανάστημα, χαμηλή οστική πυκνότητα. (113)

Πέρα από τους οιστρογονικούς υποδοχείς, πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε οιστρογονικός υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνη G [G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER1)], ο οποίος μεσολαβεί σε μη γονιδιωματική σηματοδότηση που σχετίζεται με οιστρογόνα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεμβρανικό υποδοχέα GPER1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 (τόπος 7p22.3). (114) Δομικά ο GPER1 δεν παρουσιάζει ομοιότητες με τον ERα ή τον ERβ και έχει χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (17β-οιστραδιόλη) σε σύγκριση με άλλους υποδοχείς οιστρογόνων (Prossnitz & Barton, 2014). Ωστόσο έχει πλέον αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός μεσολαβητής των ταχέων κυτταρικών επιδράσεων των οιστρογόνων σε όλο το σώμα. (115)





Σχήμα 16 Δομή των δύο δεσμευτικών περιοχών του πυρηνικού ορμονικού υποδοχέα (DNA-binding protein/ Ligand – binding protein). Οι ορμονικοί υποδοχείς περιέχουν δύο βασικές περιοχές: μία περιοχή η οποία αλληλεπιδρά με το DNA και βρίσκεται στο κέντρο περίπου της ακολουθίας και μια περιοχή στην οποία προσδέεται η ορμόνη (προς το άκρο με την καβοξυλιωμένη ομάδα).

Το επίπεδο έκφρασης αλλά και το επίπεδο λειτουργικότητας των οιστρογονικών υποδοχέων καθορίζεται, από πολυμορφισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι οι διαφορές σε φυλετικό επίπεδο αντιστοιχούν και σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων. Στις γυναίκες που ανήκουν στην αφροαμερικάνικη ή στην κίτρινη φυλή φαίνεται ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς εκφράζονται με μεγαλύτερη συχνότητα. Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την έκφραση των συγκεκριμένων υποδοχέων είναι η ηλικία, και συγκεκριμένα, αύξηση της ηλικίας αντιστοιχεί στις περισσότερες περιπτώσεις με αύξηση της έκφρασης. Τέλος, ρυθμιστικό παράγοντα αποτελούν και ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Οι μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια δράσης της ογκοκατασταλτικής τους δράσης (down regulation). Η μείωση της ογκοκατασταλτικής δράσης τείνει να μετασχηματίζει τα υγιή κύτταρα σε καρκινικά (116).

### 1.8.1 Πολυμορφισμοί οιστρογονικών υποδοχέων

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί είναι οι πολλαπλές μορφές ενός γενετικού τύπου που εμφανίζονται με συχνότητα  $F \geq 0,01$  στο γενικό πληθυσμό και εντοπίζονται οπουδήποτε μέσα στο γονιδίωμα. Ανάλογα με το είδος και τη θέση τους μπορεί να συμμετέχουν στη διαμόρφωση της δομής, της έκφρασης ή της λειτουργίας των μεταγραφικών προϊόντων, πρωτεϊνών, ενζύμων, υποδοχέων,

μεταφορέων κ.α. χωρίς όμως να αποτελούν την κύρια αιτία εμφάνισης ενός παθολογικού φαινότυπου. Για τη μελέτη των διαφόρων ειδών πολυμορφισμών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές, όπως περιοριστικά ένζυμα (RFLPs), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), υβριδισμοί σε επίπεδο DNA ή RNA (southern και northern blotting), μικροσυστοιχίες DNA και αλληλούχιση νουκλεϊκών οξέων (117).

Οι πολυμορφισμοί, οι οποίοι συναντώνται μπορούν να αφορούν:

- Αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με κάποιο άλλο ή σημειακός πολυμορφισμός (Single Nucleotide Polymorphism-SNP)
- Επαναλαμβανόμενες διαδοχικές αλληλουχίες μικρού μεγέθους (Short Tandem Repeat, STR).
- Διαδοχικές αλληλουχίες ποικίλου μεγέθους (Variable Number of Tandem Repeats)
- Ενθέσεις/απαλοιφές
- Μεταθετά στοιχεία (transposable elements TE) ή επαναλήψεις Alu
- Δομικές παραλλαγές
- Copy number Variations (CNV)

Οι σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs) είναι εκείνοι με τη μεγαλύτερη συχνότητα του στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 1 κάθε 350 βάσεις, δηλαδή σε κάθε άτομο κατά μέσο όρο συναντάμε περίπου 10 εκατομμύρια SNPs. Οι SNPs είναι εκείνοι οι οποίοι διαμορφώνουν την ποικιλία του ανθρώπινου γονιδιώματος σε μεγάλο βαθμό (90-95%) (118) και χρησιμεύουν ως εξαιρετικοί γενετικοί δείκτες. Ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος είναι περισσότερο πολυμορφικές από άλλες. Οι SNPs μπορεί να εμφανιστούν εντός γονιδιακών αλληλουχιών ή σε διαγονιδιακές αλληλουχίες, και ως επί το πλείστον δεν έχουν άμεσο γνωστό αντίκτυπο στον φαινότυπο ενός ατόμου, αλλά ο ρόλος τους μέχρι σήμερα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Τα SNPs χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες:

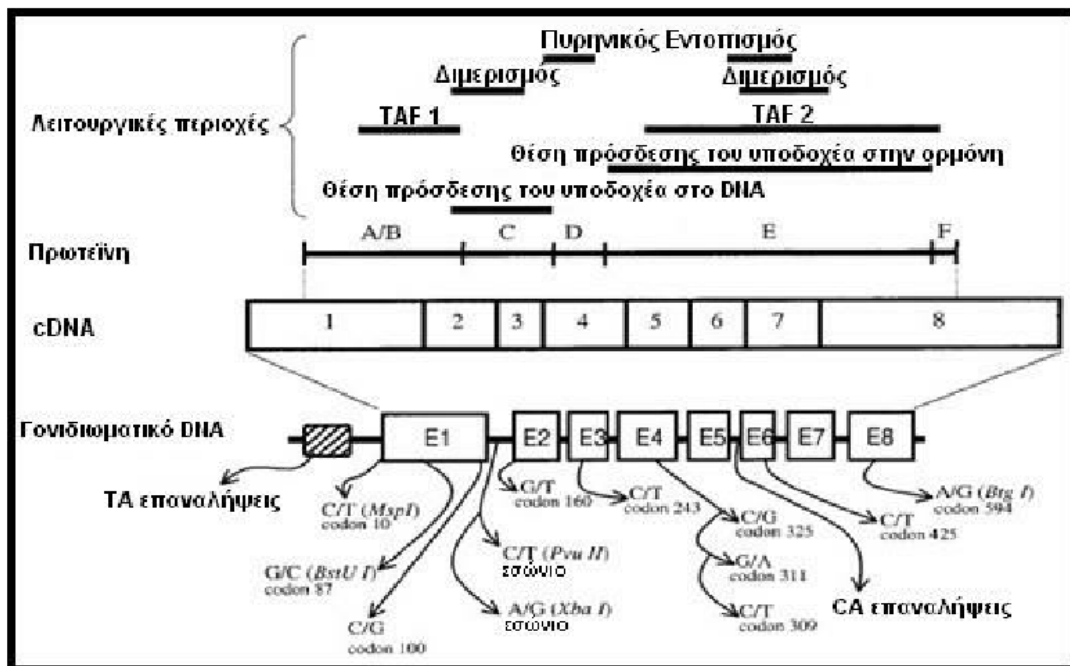
Οι συνδεδεμένοι πολυμορφισμοί (linked ή indicative SNPs) δεν βρίσκονται εντός των γονιδίων και δεν επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, ενδέχεται να συμβάλλουν στην ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή και στον κίνδυνο εμφάνισης μια ασθένειας.

Οι αιτιολογικοί πολυμορφισμοί (causative SNPs) επηρεάζουν τον τρόπο λειτουργίας μιας πρωτεΐνης ή επηρεάζουν την ανταπόκριση ενός ατόμου σε φάρμακα. Τα αιτιολογικά SNPs εμφανίζονται σε δύο μορφές:

- Τα κωδικά SNPs, που βρίσκονται στην κωδικοποιούμενη περιοχή ενός γονιδίου, αλλάζοντας την αλληλουχία αμινοξέων
- Τα μη κωδικά SNPs, που βρίσκονται εντός των ρυθμιστικών αλληλουχιών του γονιδίου, αλλάζουν το χρόνο, τη θέση ή το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης.

Ορισμένα SNPs που δεν είναι αιτιολογικά SNPs βρίσκονται σε στενή συσχέτιση με μια αλληλουχία που προκαλεί ασθένεια. Η παρουσία ενός SNP συσχετίζεται με την παρουσία, την προδιάθεση ή τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μιας νόσου, επομένως είναι επίσης χρήσιμα στη διάγνωση ή στον έλεγχο προδιάθεσης για ασθένειες. (119).

Η μελέτη του ERa έχει αποκαλύψει πολυάριθμους πολυμορφισμούς. Καθώς το γονίδιο ER και τα εναλλακτικά εξώνια του εκτείνονται σε 300 kb, είναι πιθανό να υπάρχουν συχνά εμφανιζόμενοι πολυμορφισμοί σε περιοχές που δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί επαρκώς, αλλά είναι σημαντικές για τον καθορισμό της έκφρασης του υποδοχέα (120). (Σχήμα 17). Μεταξύ των πολυάριθμων πολυμορφισμών των γονιδίων ER, οι πιο ευρέως μελετημένοι, είναι οι πολυμορφισμοί PvuII (397T4C, rs2234693) και XbaI (351G4A, rs9340799) για τον ERa και οι πολυμορφισμοί RsaI (1082G4A, rs1256049) και AluI (1730G4A, rs4986938) για τον ERb, αντίστοιχα. (120,121)



Σχήμα 17. Η αλληλουχία του γονιδίου ERa και οι γνωστότεροι πολυμορφισμοί του.

Οι πολυμορφισμοί PvuII (γνωστή και ως c454-397T>C rs2234693) και XbaI (γνωστή και ως c454-351A>G rs9340799) βρίσκονται στο εσώνιο 1, 397 και 351 bp πριν το εξώνιο 2, αντίστοιχα (122,123). και βρίσκονται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Στην ανισορροπία

σύνδεσης, ορισμένοι συνδυασμοί αλληλόμορφων εμφανίζονται συχνότερα σε έναν πληθυσμό από ό,τι θα αναμενόταν από την τυχαία διαλογή. Επομένως, επειδή οι PvuII και XbaI βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, μπορεί κανείς να προβλέψει το αλληλόμορφο στον ένα από τους 2 SNP γνωρίζοντας το αλληλόμορφο του SNP με μεγάλη ακρίβεια. Τα αλληλόμορφα T και C του PvuII αναφέρονται συνήθως ως αλληλόμορφα p και P, αντίστοιχα. Τα αλληλόμορφα A και G του XbaI αναφέρονται συνήθως ως αλληλόμορφα x και X, αντίστοιχα. Τα X και P είναι τα αλληλία που στερούνται την αντίστοιχη θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού XbaI και PvuII. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη λειτουργικότητα αυτών των SNPs ή τα βιολογικά μονοπάτια που επηρεάζουν. Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι αυτά τα SNPs επηρεάζουν τη δραστηριότητα των οιστρογόνων επηρεάζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου ESR1 μέσω μεταβολής του σημείου πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων.

Είναι αποδεδειγμένο ότι οι πολυμορφισμοί στο εσώνιο 1 είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό TA-repeat που συνιστά επαναλήψεις νουκλεοτιδίων θυμινης-αδενοσινης στην περιοχή του εκκινήτη του γονιδίου Era (124). Ο πολυμορφισμός TA-repeat εντοπίζεται 1174 ζεύγη βάσεων (bp) upstream του πρώτου εξωνίου. Αυτός ο πολυμορφισμός έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με οικογενή πρόωρη ωθητική ανεπάρκεια, αυξημένο κίνδυνο οστεοπορωτικών καταγμάτων και μείωση της οστικής μάζας (70). Ο πολυμορφισμός TA-repeat βρίσκεται σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης με τους PvuII (rs9340799) και XbaI (rs223493). Είναι πιθανό οι XbaI, PvuII και TA-repeat να μην επηρεάζουν άμεσα τη σηματοδότηση των οιστρογόνων, αλλά να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλο λειτουργικό τομέα στο γονίδιο ESR1. (125)

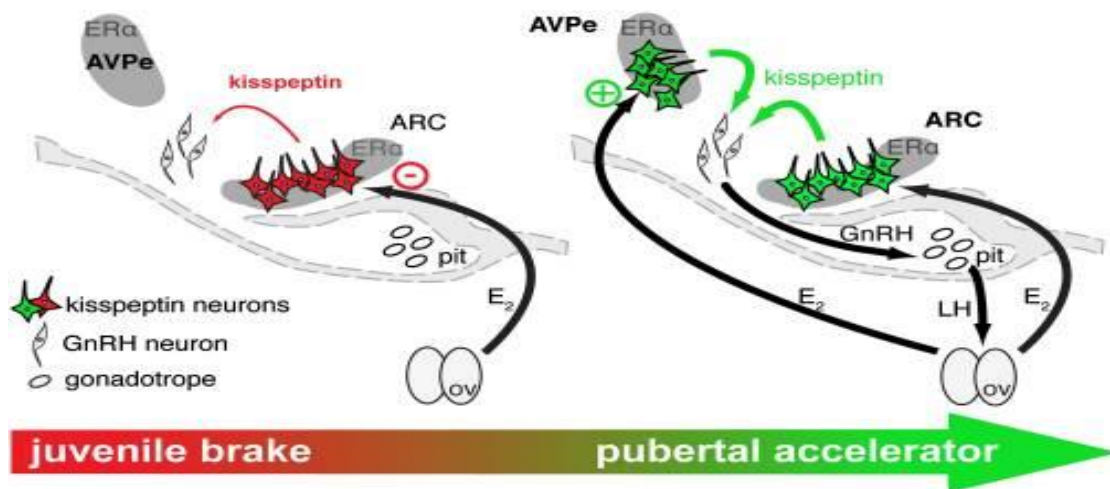
Συνολικά, η τρέχουσα βιβλιογραφία υποδηλώνει ότι η μεταγραφική δραστηριότητα και/ή η γονιδιακή ρύθμιση του ESR1 επηρεάζεται από τους πολυμορφισμούς του ESR1, αλλά ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός μένει να προσδιοριστεί.

## 1.8.2 Πολυμορφισμοί ERα και έναρξη ήβης

Η έναρξη της ήβης ρυθμίζεται από μια ποικιλία περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Οι γενετικοί παράγοντες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για την έναρξη της εφηβείας. Το γονίδιο του ERα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και λειτουργία της φυσιολογίας της αναπαραγωγής. Μελέτες της συσχέτισης του γονιδίου του ERα με την πρόωμη ήβη σε ανθρώπους και θηλαστικά, είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αντίστοιχα η συσχέτιση των πολυμορφισμών ERα με την έναρξη της εφηβείας δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ενώ τα αποτελέσματα των ήδη υπαρχουσών

μελετών είναι επίσης αντικρουόμενα. Κάποιες μελέτες συνδέουν τους πολυμορφισμούς του ERα με την πρόωμη ήβη (126,127), ενώ άλλες μελέτες δεν τους συσχετίζουν με την πρόωμη εφηβική έναρξη (128). Επιπλέον τα στοιχεία αφορούν στην πλειονότητα πληθυσμούς ασιατικής καταγωγής.

Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν πως η ήβη στα θήλα ελέγχεται από δύο μηχανισμούς που εξαρτώνται από τους ERα. Ο ένας μηχανισμός αναστέλλει και ο άλλος ενεργοποιεί την ήβη δρώντας σε διαφορετικούς πληθυσμούς νευρώνων Kiss1 κατά την διάρκεια της εφηβικής ωρίμανσης των θηλέων ποντικών. Το προϊόν της έκκρισης των νευρώνων Kiss1, η κισπεπτίνη, διεγείρει την έκκριση GnRH από τους νευρώνες GnRH. Φαίνεται πως η ενεργοποίηση του ERα στον νευρώνα κισπεπτίνης στον υποθαλαμικό τοξοειδή πυρήνα [arcuate nucleus (ARC)] δρα ανασταλτικά στην έκκριση της GnRH ενώ η ενεργοποίηση του ERα στον νευρώνα κισπεπτίνης στον προσθιοκοιλιακό περικοιλιακό πυρήνα-περικοιλιακό πυρήνα [anteroventral periventricular nucleus-periventricular nucleus (AVPe)] διεγείρει την έκκριση GnRH. (129)



Σχήμα 17: Σχηματική απεικόνιση του υποθετικού μηχανισμού έναρξης και εξέλιξης της ήβης έπειτα από σηματοδότηση του ERα και δράσης του στους Kisspeptin νευρώνες

Η συγκεκριμένη υπόθεση αποδείχτηκε στα ποντίκια, όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης εάν ισχύει και σε άλλα θηλαστικά. Μελέτες σε πρόβατα και πιθήκους έδειξαν πως στην προεφηβική περίοδο, ο περιορισμός έκκρισης GnRH είναι ανεξάρτητος από τα στεροειδή του φύλου, επομένως πριν από την έναρξη της ήβης φαίνεται ότι οι ERα στους νευρώνες κισπεπτίνης στον ARC δεν παίζουν σημαντικό ρόλο. Θεωρείται, ωστόσο, πιθανό ότι η ενεργοποίηση του ERα στους νευρώνες κισπεπτίνης είναι αναπόσπαστο μέρος της εφηβικής ωρίμανσης και σε άλλα είδη. Η έκφραση της κισπεπτίνης αυξάνεται καθ' όλη την εφηβεία σε ποντίκια, αρουραίους, πρόβατα και πιθήκους και

πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από τα οιστρογόνα (43,130-132)

Η θεραπεία με οιστρογόνα έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να ξεκινήσει η σεξουαλική ωρίμανση σε κορίτσια με ιδιοσυστασιακή καθυστέρηση της ήβης (133), υποδηλώνοντας εξαρτώμενους από ER νευροτροπικούς μηχανισμούς που διέπουν την ωρίμανση των κεντρικών νευρωνικών κυκλωμάτων που ελέγχουν την απελευθέρωση GnRH. Τα ευρήματά αυτά εμπλέκουν τους ERα που εντοπίζονται στους νευρώνες της κισπεπτίνης ως στόχους και μεσολαβητές αυτών των επιδράσεων των οιστρογόνων. Η πρόοδος και η ολοκλήρωση της εφηβείας φαίνεται επομένως να διέπεται από έναν βρόχο θετικής ανατροφοδότησης, στον οποίο τα αυξανόμενα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στα πρώιμα στάδια της ήβης διεγείρουν την έκφραση της κισπεπτίνης, η οποία αυξάνει περαιτέρω την απελευθέρωση GnRH και ως εκ τούτου, προκαλεί επιπλέον παραγωγή γοναδοτροπίνης και στεροειδών του φύλου. Αυτός ο κύκλος διεγερτικών σημάτων αυξάνει τελικά τους ρυθμούς απελευθέρωσης της κισπεπτίνης και της GnRH στο εύρος που απαιτείται για την υποστήριξη της κυκλικότητας της ωορρηξίας, και ως εκ τούτου ολοκληρώνει τη διαδικασία της εφηβείας.

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο ER έχει μελετηθεί ευρέως προκειμένου να βρεθεί εάν και πως σχετίζεται με την πρώιμη ήβη. Ωστόσο, πολύ λίγες μελέτες υπάρχουν που ερευνούν την σχέση των πολυμορφισμών του γονιδίου ERα και της πρώιμης ήβης. Ανάμεσα στην πληθώρα πολυμορφισμών\_στο ERα, οι σημαντικότεροι και αυτοί που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι ο PvuII (397T4C, rs2234693) και ο XbaI (351G4A, rs9340799) για τον ERα, και RsaI (1082G4A, rs1256049) και AluI (1730G4A, rs4986938) για τον ERb.

Οι μελέτες της συσχέτισης των πολυμορφισμών του ERα και της πρώιμης ήβης είναι λίγες και τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, ο Ke et al (132) έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI και της πρώιμης ήβης, ενώ ο Lee et al (126) κατέληξε σε ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Σε άλλη μελέτη υπήρχε μικρή συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την ηλικία εμμηναρχής αλλά καμμία συσχέτιση με την ηλικία έναρξης της ήβης (128).

Σε μετανάλυση δημοσιεύσεων, πριν τον Μάρτιο του 2014, για την συσχέτιση των πολυμορφισμών του ERα και την έναρξη της ήβης, μελετήθηκαν συνολικά 103 άρθρα από όλες τις βάσεις δεδομένων. Μόνο τέσσερα πληρούσαν τα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στη μετανάλυση. Σύμφωνα με τη μετανάλυση, άτομα με ετερόζυγο γονότυπο για τον πολυμορφισμό ESR1 XbaI και φυσιολογικό αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό ESR1 PvuII, σχετίζονται με εμφάνιση πρώιμης ήβης. Όσον αφορά στον πολυμορφισμό ESR2 RsaI και AluI, η σχέση μεταξύ του ESR2 και της πρώιμης ήβης πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. (124)

Επιπρόσθετες καλά σχεδιασμένες μελέτες με μεγάλο μέγεθος δείγματος μεταξύ διαφορετικών πολυμορφισμών και εθνοτήτων είναι απαραίτητες για συγκέντρωση αξιόπιστων δεδομένων για ολοκληρωμένο και οριστικό συμπέρασμα αν πολυμορφισμοί του ER επηρεάζουν ουσιαστικά την έναρξη της ήβης.

## **1.9 Πολυμορφισμοί οιστρογονικών υποδοχέων και καρκίνος του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας είναι η συχνότερη μορφή κακοήθειας αλλά και ένας από του κυριότερους παράγοντες θνητότητας μεταξύ των γυναικών (134). Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου όπως και στις περισσότερες μορφές κακοήθειας ,είναι το γενετικό υπόβαθρο, οικογενειακό ιστορικό αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες (αντισυλληπτικά χάπια με οιστρογόνα, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, θηλασμός).(135) Περίπου 80 διαφορετικοί γενετικοί τόποι έχουν εντοπιστεί, οι μεταλλάξεις των οποίων πιθανώς να ευθύνονται για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού, με κυριότερες αυτές του BRCA1 και BRCA2. Ωστόσο και οι γενετικοί πολυμορφισμοί σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (136). Μεταξύ όλων αυτών των παραγόντων κινδύνου μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στα οιστρογόνα ως παράγοντες καρκινογένεσης καθώς επιδρούν τόσο σε επίπεδο χρωμοσώματος όσο και διεγείροντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων του μαστού. Μία από τις πρώτες ενδείξεις ότι τα οιστρογόνα παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του μαστού προήλθε από την παρατήρηση ότι τα ποντίκια με ωθηκεκτομή αποτυγχάνουν να αναπτύξουν μαστικούς αδένες. Ωστόσο, εάν μια πηγή οιστρογόνων εισαχθεί χειρουργικά στο λιπώδες στρώμα των ωθηκεκτομημένων ποντικών, οι μαστικοί αδένες συνεχίζουν την ανάπτυξή τους. Βέβαια η σημασία των οιστρογόνων στην ανάπτυξη των μαστικών αδένων είναι αυτονόητη.

Οι επιδράσεις των οιστρογόνων στον μαστό μεσολαβούνται κυρίως μέσα από τους ενδοκυττάριους υποδοχείς οιστρογόνων (ER). Οι ER-α και ER-β, είναι σημαντικοί ρυθμιστές για τις δράσεις των οιστρογόνων. Το γονίδιο ER-α μπορεί να κωδικοποιήσει έναν παράγοντα μεταγραφής με μια περιοχή δέσμευσης του DNA του στοιχείου απόκρισης οιστρογόνων (ERE) όπως μια περιοχή δέσμευσης οιστρογόνων. (137) Η μετάλλαξη του γονιδίου ERα μπορεί να επιταχύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να επηρεάσει την απόπτωση των κυττάρων επηρεάζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών, και με αυτό τον τρόπο να συμμετέχει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. (138) Επιπλέον πολλοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) στον ER-α, έχουν μελετηθεί σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες και φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν περιγραφεί, με τους οποίους η δραστηριότητα των οιστρογονικών υποδοχέων διαφοροποιείται, συμβάλλοντας στην καρκινογένεση. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι:

(1) Ενίσχυση του διεγέρτη των ER. Η υπερέκφραση του διεγέρτη των οιστρογονικών υποδοχέων, αποτελεί έναν ισχυρό μηχανισμό για την προώθηση της εξαρτώμενης από τον ER ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων (gene amplification) είναι ένας από τους πιο συχνούς μηχανισμούς αυξημένης γονιδιακής έκφρασης στον καρκίνο του μαστού. Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου AIB1 που ανιχνεύθηκε στο αμπλικόνιο (amplicon) του χρωμοσώματος 20q είναι μέχρι στιγμής, ο μόνος συνενεργοποιητής του ER που έχει συνδεθεί με τον καρκίνο του μαστού. Το AIB1 συνδέεται άμεσα με τον ER και δρα ως συνενεργοποιητής του ER, ενισχύοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του ER. Αυτό δείχνει ότι το AIB1 είναι πιθανώς ένα ογκογονίδιο, αλλά το κατά πόσον η δράση του AIB1 εξαρτάται από τη δέσμευση των οιστρογόνων στον ER παραμένει ακόμη να μελετηθεί. (139)

(2) Αναστολή της έκφρασης του αναστολέα των ER. Ο αναστολέας της δραστηριότητας του οιστρογονικού υποδοχέα (repressor of estrogen receptor activity, REA) συνδέεται με τον ER και ενισχύει την δράση των αντιοιστρογονικών φαρμάκων. Η έκφραση του REA συνδέεται άμεσα με τα επίπεδα των ER, ενώ η χαμηλή έκφραση τους σχετίζεται με κακή πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. Σε μελέτη σε ποντίκια αποδείχτηκε πως η αναστολή της έκφρασης του REA οδηγεί σε υπερτροφία του μαστικού αδένου (140). Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι οι REA είναι απαραίτητοι για περιορισμό της δράσης των ER.

(3) Υπερέκφραση πρωτεϊνών που αποκτούν την ικανότητα να συνδέονται με τον ER όταν τα επίπεδά τους είναι αυξημένα. Αν και οι πρωτεΐνες αυτές έχουν συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία σε φυσιολογικούς ιστούς, αλληλεπιδρούν ανώμαλα με τον ER όταν υπερεκφράζονται. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτού του μηχανισμού είναι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1, μιας πρωτεΐνης που φυσιολογικά δρα ως ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλίνη D1 συνδέεται τόσο με τον ER όσο και με τους συνενεργοποιητές του. Μέσω αυτού του μηχανισμού λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος για την προσέλκυση συνενεργοποιητών ER, ακόμη και με απουσία οιστρογόνων. Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 συνδέεται στενά με όγκους του μαστού θετικούς για ER. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι οι όγκοι που υπερεκφράζουν την κυκλίνη D1 εμφανίζουν και αυξημένη δραστηριότητα των ER ακόμη και με απουσία οιστρογόνων. Επομένως, η



κυκλίνη D1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης εντοπισμού του υποσυνόλου των ασθενών που δεν πρόκειται να ωφεληθούν από τη θεραπεία με ταμοξιφαίνη. (141)

(4) Μεταλλάξεις στον ίδιο τον ER, οι οποίες επιτρέπουν την ενεργοποίησή του σε χαμηλότερη συγκέντρωση οιστρογόνων.

(5) Εντοπισμός των ER στην πλασματική μεμβράνη και ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης. Ο ER είναι περισσότερο γνωστός ως μεταγραφικός παράγοντας στον πυρήνα, αλλά η μη γονιδιωματική δράση του ER στην πλασματική μεμβράνη και ενδεχομένως στα μιτοχόνδρια κερδίζει γρήγορα το ενδιαφέρον, επειδή η μεταβολή αυτών των μηχανισμών είναι πιθανό να είναι εξίσου σημαντική στην καρκινογένεση. Η σύνδεση του ER με τους υποδοχείς, όπως ο EGFR, ο neu-2 και ο IGFR-1 αυξάνεται κατά την εξελικτική πορεία του καρκίνου του μαστού. Η σύνδεση αυτή συμβάλλει στην εμφάνιση όγκων ανεξάρτητων από οιστρογόνα, καθώς επιτρέπεται η ενεργοποίηση των ER ακόμα και με ελάχιστες συγκεντρώσεις οιστρογόνων. Επειδή το βιολογικό αποτέλεσμα αυτών των συνδέσεων είναι η ενεργοποίηση καταρρακτών σηματοδότησης, όπως οι MAP κινάσες και ERK, η συνολική ρύθμιση αυτών των μονοπατιών επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας έναν σημαντικό μηχανισμό καρκινογένεσης. (142)

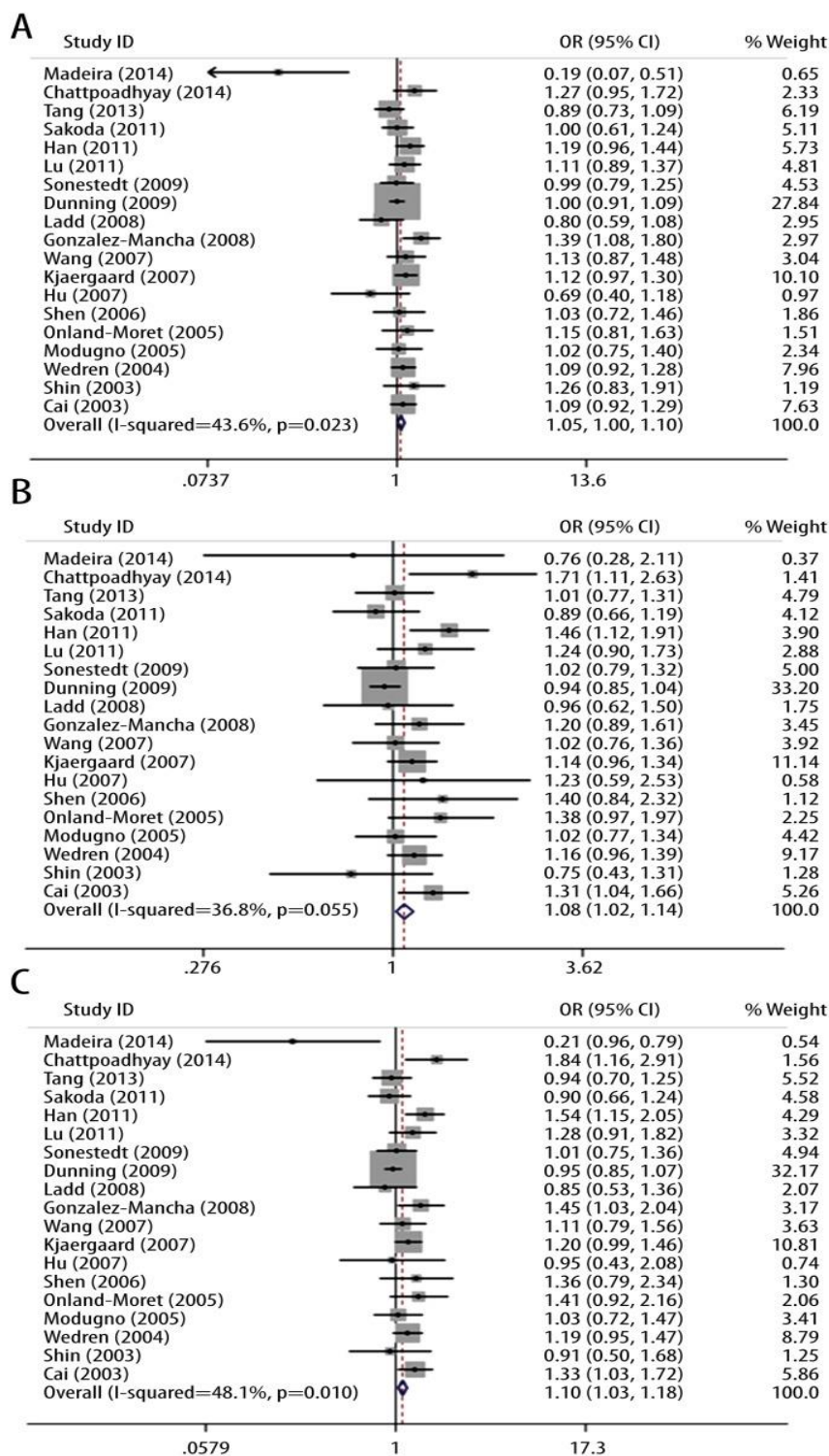
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του ER μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να προκαλέσουν αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης επηρεάζοντας την έκφραση των πρωτεϊνών, συμμετέχοντας κατά αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση αλλά και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. (138). Πολλαπλοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίζονται στον ιντρόνιο 1 του ER-a, έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Είναι ήδη γνωστό πως οι πολυμορφισμοί PvuII και XbaI είναι στενά συνδεδεμένοι με τον καρκίνο του μαστού (143). Οι πολυμορφισμοί PvuII έχουν μελετηθεί εκτενώς χωρίς όμως οι ερευνητές να έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα. Σε μελέτη του Atoum et al μεταξύ γυναικών στην Ιορδανία δεν βρέθηκε κάποιος συσχετισμός μεταξύ του πολυμορφισμού PvuII και καρκίνου του μαστού. Αντίθετα σε μελέτη γυναικών στη Βραζιλία αλλά και τις βόρειες Ινδίες προέκυψε σημαντική συσχέτιση, με τις γυναίκες που φέρουν το p αλληλίο να εμφανίζουν και μικρότερη θνητότητα. Αντίστοιχη μελέτη του Cai και συνεργατών σε πληθυσμό ασιατικής καταγωγής έδειξε πως η παρουσία του p αλληλίου (Pp,pp) μπορεί να σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου καρκίνου του μαστού.(144). Σε μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα σε 26 διαφορετικές μελέτες, οι οποίες περιλάμβαναν 15.360 ασθενείς και

26.423 άτομα ελέγχου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου ERα PvuII βρισκόταν σε σημαντική συσχέτιση με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε 3 γενετικά μοντέλα. Στην υποομάδα με βάση την εθνικότητα, τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι ο πολυμορφισμός PvuII ήταν σε σημαντική συσχέτιση με τη μείωση του κινδύνου καρκίνου του μαστού στους Ασιάτες και όχι στους Καυκάσιους. Η διαφορά στην επιλογή των ασθενών ελέγχων (control group) μπορεί να οδηγήσει σε ετερογένεια μεταξύ των αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου, η μελέτη αυτή διεξήγαγε ανάλυση υποομάδων με βάση την προέλευση των ομάδων ελέγχου και τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι στην υποομάδα που βασίζεται στον γενικό πληθυσμό και όχι στην υποομάδα που βασίζεται σε νοσηλεύμενους ασθενείς (hospital based population), υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού του γονιδίου ERα PvuII και της μείωσης του κινδύνου καρκίνου του μαστού (145). Ωστόσο, σε μελέτη του Li και συνεργατών δεν αποδείχτηκε πως η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού PvuII και του κινδύνου καρκίνου του μαστού επηρεάζεται από την προέλευση των ομάδων ελέγχου (146).

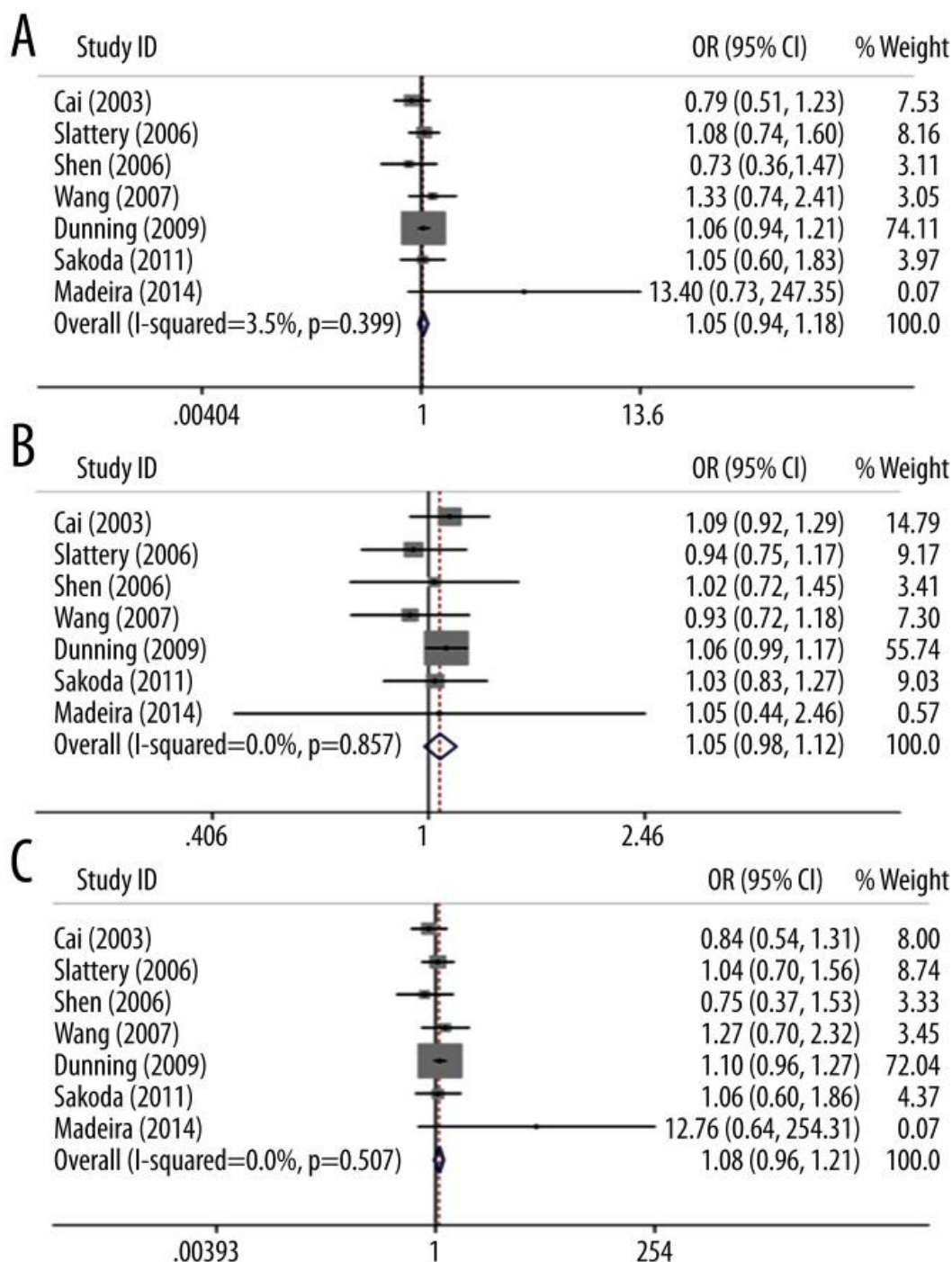
Αντίστοιχες μελέτες έχουν γίνει και για τον πολυμορφισμό XbaI. Σε μεταανάλυση που δημοσιεύτηκε το 2015 από τους Zhang et al δεν βρέθηκε συσχέτιση του XbaI με τον καρκίνο του μαστού. (147). Όπως συμβαίνει με τον πολυμορφισμό PvuII έτσι και με τον πολυμορφισμό XbaI οι διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, ενώ οι Wang et al. ανέφεραν ότι ο γονότυπος xx του πολυμορφισμού XbaI δεν συσχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού, οι Sierra-Martínez et al. κατέληξαν στο ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα για τον ίδιο γονότυπο (148,149). Σε μελέτη από τους Sakoda et al. δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εμφάνισης καρκίνου μαστού (150). Σε μετα-ανάλυση 23 μελετών, βάσει πέντε διαφορετικών γενετικών μοντέλων, δηλαδή του ομοζυγωτικού, του ετεροζυγωτικού, του επικρατούντος, του υπολειπόμενου και του αλληλόμορφου μοντέλου, δεν ανιχνεύθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI και της ευαισθησίας στον καρκίνο του μαστού. Στο πλαίσιο κάθε γενετικού μοντέλου, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση με βάση τις ακόλουθες υποομάδες: (i) εθνικότητα (Ασιάτες έναντι Καυκάσιων), (ii) κατάσταση εμμηνόπαυσης (προεμμηνόπαυση έναντι μετεμμηνόπαυσης) και (iii) ποιότητα μελέτης (υψηλή ποιότητα έναντι χαμηλής ποιότητας). Και πάλι, καμία από αυτές τις υποομάδες δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά των Zhang et al (151). Όλες οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα πως ο ESR1 κρύβει πολλούς πολυμορφισμούς που αναμένουν λεπτομερή διερεύνηση, προκειμένου να ανακαλυφθεί η συσχέτιση τους με την καρκινογένεση.

Παρακάτω αξίζει να σημειωθεί και ο ρόλος του οιστρογονικού υποδοχέα β στον καρκίνο του μαστού. Ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου β, στο μαστό έχει ως λειτουργία την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, και για το λόγο αυτό συσχετίζεται ορισμένες φορές με την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου. Η ανάλυση του οιστρογονικού υποδοχέα β με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών έχει δείξει ότι η υπερέκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα μειώνει σημαντικά την αντιγραφή του DNA και την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Σε μελέτες που έχουν γίνει στα ποντίκια, βρέθηκε ότι ο οιστρογονικός υποδοχέας τύπου β μειώνει τον πολλαπλασιασμό καταστέλλοντας την μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης A και αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων p21 και p 27, οδηγώντας σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (152).

Πολλές είναι οι μελέτες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τη συσχέτιση του οιστρογονικού υποδοχέα β ή την πρωτεϊνική έκφραση των γονιδίων του με τις κλινικές παραμέτρους του καρκίνου του μαστού. Αν και ακόμα δεν υπάρχει πλήρης συμφωνία ανάμεσα στις μελέτες, φαίνεται ότι η αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα οδηγεί σε καλή πρόγνωση της ασθένειας, ενώ η έκφραση αυτή μειώνεται κατά την εξέλιξη της νόσου.



Σχήμα 18Α. Συσχέτιση μεταξύ πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου του στήθους και των πολυμορφισμών PvuII σε όλο τον πληθυσμό σε σχέση με τα (Α) αλληλόμορφα (TT vs TC+CC), (Β) τα αλληλόμορφα (TT+TC vs CC) και (C) τους ομοζυγώτες (TT vs CC) (Zhang et al., 2015).

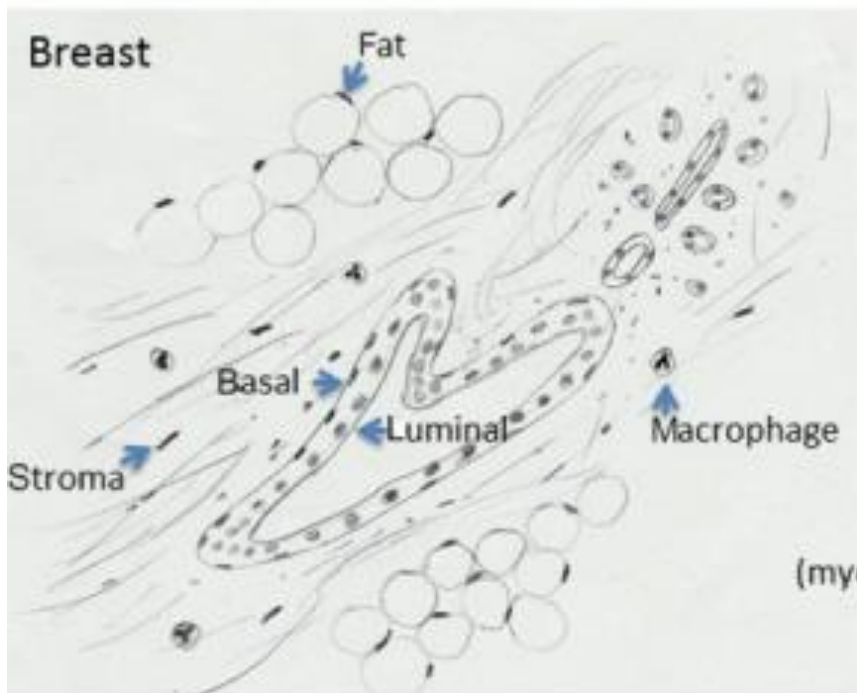


Σχήμα 18 Β. Η συσχέτιση μεταξύ του καρκίνου του στήθους και του XbaI πολυμορφισμού σε όλον τον πληθυσμό σε σχέση με (Α) τα αλληλόμορφα (GG vs GA+AA), (Β) τα αλληλόμορφα (GG+GA vs AA) και (C) τους ομοζυγώτες (GG vs AA). (Zhang et al., 2015).

Μία ανάλυση 442 περιπτώσεων επιθετικού καρκίνου του στήθους, έδειξε ότι η έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου β είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας πρόβλεψης σε σχέση με την

εξέλιξη της νόσου. Σε αρκετές μελέτες, επίσης φαίνεται ότι η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου οιστρογονικού υποδοχέα συσχετίζεται με καλή απόκριση σε ορμονική θεραπεία(153).

Σε σχέση με τα κλινικά ευρήματα, έχει βρεθεί ότι η πρωτεϊνική έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου β είναι ένας καλός παράγοντας πρόγνωσης για ενδοκρινική θεραπεία. Αντίστοιχα, το mRNA του οιστρογονικού υποδοχέα β φαίνεται να είναι ανεξάρτητος παράγοντας πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου σε σχέση με την θεραπεία με tamoxifen, ειδικά σε καρκίνους με χαμηλό βαθμό Allred. Συνοψίζοντας, μπορούμε να αναφέρουμε ότι η αύξηση στην έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου β, μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία σε φάρμακα και ορμόνες τα οποία προσδένονται απευθείας πάνω στους οιστρογονικούς υποδοχείς (154).



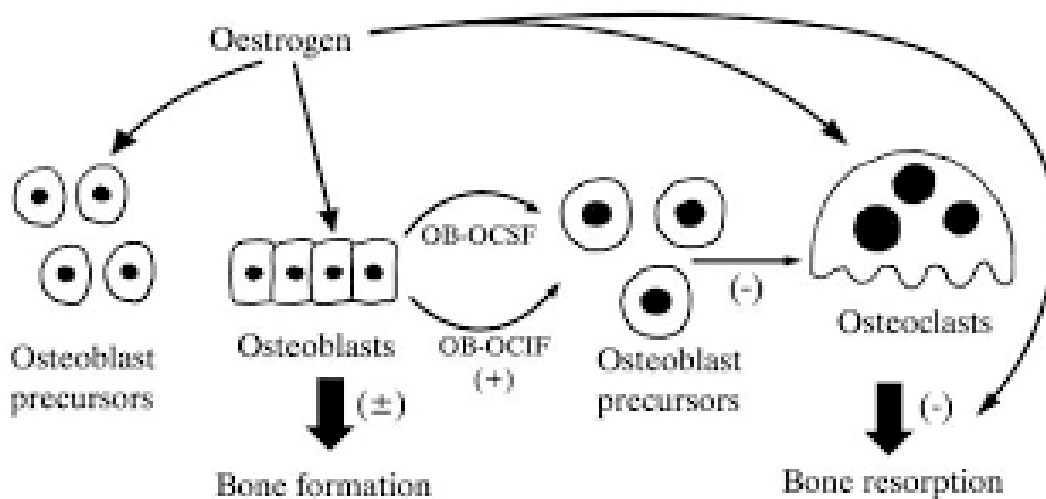
ERα and AR	Epithelial cell (luminal)
ERβ	Epithelial cell (luminal & basal)
	Stroma
	Fat cell
	Endothelial cell
	Macrophage

Σχήμα 19. Η κατανομή του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου β στον μαστό.

## 1.10 Πολυμορφισμοί του ERα και οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση είναι μία συστημική σκελετική νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική πυκνότητα και διάσπαση της μικρο-αρχιτεκτονικής του οστού. Οι δύο αυτές ανωμαλίες, οδηγούν σε εύθραυστα οστά και συνεπώς σε αυξημένες πιθανότητες καταγμάτων. Η παθοφυσιολογία της οστεοπόρωσης συνοψίζεται στην αρνητική ισορροπία μεταξύ του οστικού μεταβολισμού και της αναδόμησης, με την οστική απώλεια να έχει μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με την οστική δημιουργία. Το γεγονός αυτό δείχνει επίσης ότι η νόσος επηρεάζεται από τη βιταμίνη D και την παραθορμόνη καθώς και επιπλέον παράγοντες οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και δημιουργία των οστικών κυττάρων. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζουν και γενετικοί παράγοντες, όπως οι γενετικοί πολυμορφισμοί.

Η πρόσδεση διαφορετικών κυτοκινών στους υποδοχείς τους που βρίσκονται στους οστεοβλάστες, πιστεύεται ότι έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων που δρουν απ' ευθείας στους οστεοκλάστες και ρυθμίζουν την δραστηριότητά τους. Φυσιολογικά, τα οιστρογόνα, πιθανότατα μειώνουν ή και εξαλείφουν την απελευθέρωση των παραγόντων ενίσχυσης της δράσης των οστεοκλαστών ή εναλλακτικά αυξάνουν την απελευθέρωση των ανασταλτικών παραγόντων (Σχήμα 20).

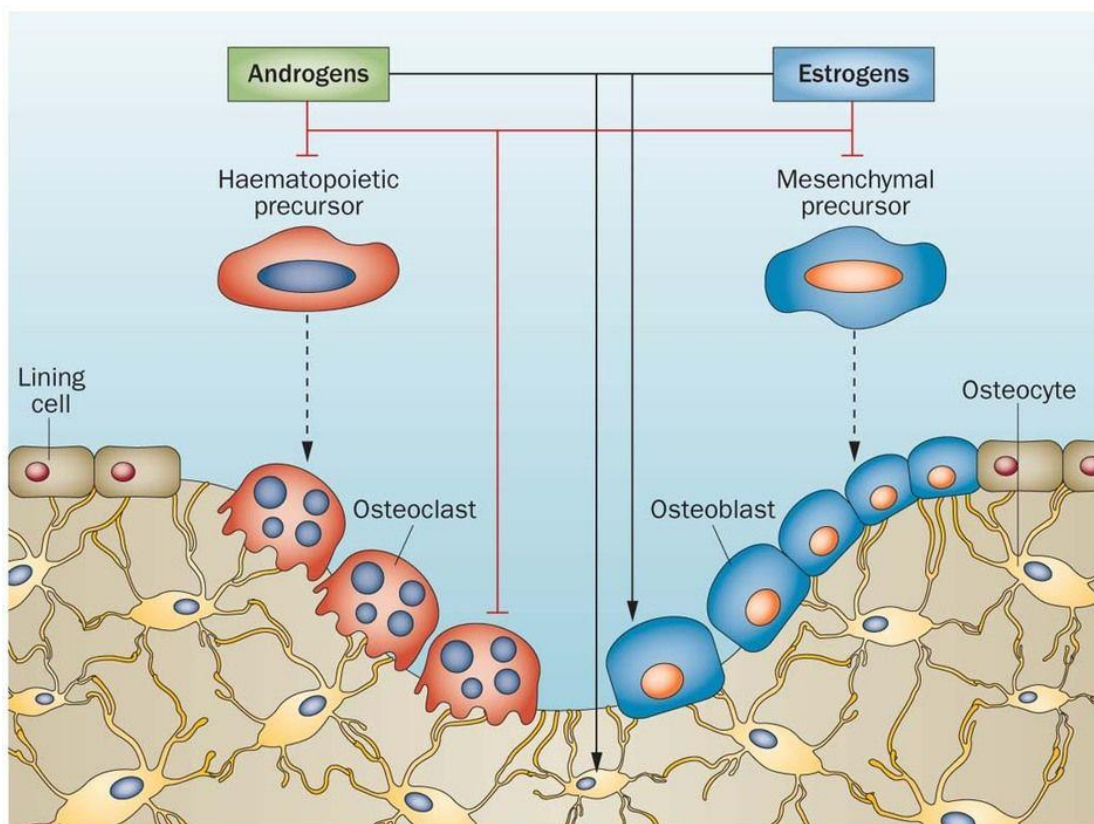


Σχήμα 20. Η οιστρογονική δράση στα οστικά κύτταρα.

Τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι συμβάλουν στην διατήρηση της οστικής πυκνότητας στις γυναίκες. Η μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων από τις ωθήκες κατά την εμμηνόπαυση είναι η αιτία για την αρχική φάση απώλειας οστικού ιστού και τελικά οστεοπόρωσης στις γυναίκες (155). Είναι επίσης γνωστό ότι τα οιστρογόνα είναι σημαντικοί ρυθμιστές του οστικού μεταβολισμού και η μείωση των οιστρογόνων συνδέεται με τη μείωση της οστικής πυκνότητας και

την ανάπτυξη οστεοπόρωσης (156). Η δράση των οιστρογόνων ρυθμίζονται πρωταρχικά από τους οιστρογονικούς υποδοχείς (συμπεριλαμβανομένων των ER α και ER β) οι οποίοι προσδένονται σε διάφορα μόρια και προκαλούν ποικίλες βιολογικές αντιδράσεις, επομένως ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην σχέση των οιστρογονικών υποδοχέων με την ρύθμιση της οστικής πυκνότητας ιδιαίτερα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, με τα αποτελέσματα των μελετών να είναι αμφιλεγόμενα.

Οιστρογονικοί υποδοχείς α έχουν ανιχνευτεί τόσο στους οστεοκλάστες όσο και στους οστεοβλάστες (157,158). Η ενεργοποίηση του ERα στους οστεοβλάστες διεγείρει την παραγωγή OPG (οστεοπροτεγερίνη) και IL-6 και αυξάνει την οστική πυκνότητα στο μηριαίο οστό (158). Η απαλοιφή του γονιδίου ERα στους οστεοκλάστες έχει ως αποτέλεσμα απώλεια οστικής μάζας, αύξηση του αριθμού των οστεοκλαστών και μείωση της απόπτωσης των ώριμων οστεοκλαστών (159). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί ότι αρσενικά και θηλυκά ποντίκια με ανεπάρκεια του ERα (ERKOα) παρουσιάζουν μείωση των οστικών παραμέτρων στα μακρά οστά (160).



Σχήμα 21. Ο ρόλος των οιστρογόνων και των ανδρογόνων στην οστική πυκνότητα

Το οστό αναδιαμορφώνεται περιοδικά από βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (BMUs). Η παλιά ή κατεστραμμένη οστική μήτρα απομακρύνεται από τους οστεοκλάστες και αντικαθίσταται από νέο οστό που παράγεται από τους οστεοβλάστες. Η διάρκεια ζωής των μεμονωμένων οστεοκλαστών και οστεοβλαστών είναι πολύ μικρότερη (2 εβδομάδες και 3 μήνες, αντίστοιχα, στον άνθρωπο) από τη διάρκεια ζωής της BMU (6-9 μήνες). Συνεπώς, η συνεχής παροχή νέων οστεοκλαστών



και οστεοβλαστών είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της BMU. Τα οστεοκύτταρα αντιλαμβάνονται την ανάγκη για οστική αναγέννηση και κατευθύνουν τη διαδικασία αυτή ελέγχοντας παράγοντες που είναι κρίσιμοι για τη δημιουργία τόσο των οστεοκλαστών όσο και των οστεοβλαστών. Η ανεπάρκεια οιστρογόνων ή ανδρογόνων αυξάνει τον ρυθμό αναδιαμόρφωσης των οστών, την οστεοκλαστογένεση, την οστεοβλαστογένεση, τον αριθμό των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, καθώς και την οστική απορρόφηση και τον οστικό σχηματισμό - αν και με μη ισορροπημένο τρόπο, με την απορρόφηση να υπερβαίνει τον σχηματισμό. Αντίθετα, τα οιστρογόνα ή τα ανδρογόνα συγκρατούν τον ρυθμό της αναδιαμόρφωσης και διατηρούν μια εστιακή ισορροπία μεταξύ οστικού σχηματισμού και απορρόφησης. Στο σχήμα απεικονίζονται οι θετικές (μαύρα βέλη) και οι αρνητικές (κόκκινες ράβδοι) επιδράσεις στα κύτταρα καθώς και η διαφοροποίηση των κυττάρων (διακεκομμένα βέλη).

Manolagas, S., O'Brien, C. & Almeida, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 699–712 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.179>

Οι πολυμορφισμοί στους οιστρογονικούς υποδοχείς και ιδιαίτερα στον οιστρογονικό υποδοχέα α έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχει αποδειχτεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην οστική μάζα και στον μεταβολισμό των οστών. Οι Wang και συνεργάτες απέδειξαν πως ο πολυμορφισμός XbaI σχετίζεται με μεταβολές της οστικής πυκνότητας σε διάφορες σκελετικές θέσεις, ενώ ο πολυμορφισμός PvuII και συγκεκριμένα ο γονότυπος PP παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία της οσφυϊκής μοίρας αν και στον αντίποδα φαίνεται πως είναι παράγοντας κινδύνου για κατάγματα του αυχένα του μηριαίου οστού. (161). Σε αντίστοιχη μελέτη μεταξύ 170 γυναικών μεξικανικής καταγωγής αποδείχτηκε πως ο πολυμορφισμός PvuII σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης (162). Σε μετα-ανάλυση 28 μελετών δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII με τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης μετεμμηνοπαυσιακά τόσο σε γυναίκες καυκάσιας όσο και ασιατικής καταγωγής. Ωστόσο βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII με διαφορετικά επίπεδα οστικής πυκνότητας (BMD) στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης αλλά και στον αυχένα του μηριαίου οστού, σε γυναίκες κατά την εμμηνόπαυση (158).

Ο ESR1 περιέχει πολυάριθμους πολυμορφισμούς (XbaI και PvuII), οι οποίοι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οστεοπόρωση.(163) Μια μετανάλυση 1838 περιπτώσεων καταγμάτων ισχίου και 14.972 υγιών ατόμων ελέγχου διαπίστωσε ότι το αλληλόμορφο PvuII σχετίζεται σημαντικά με αυξημένη ευαισθησία σε κατάγματα ισχίου τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες.(164) Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι απλότυποι των γονιδίων PvuII και XbaI συσχετίζονται με μειωμένες τιμές T-score του αυχένα του μηριαίου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν προγνωστικοί παραγοντες της οστεοπόρωσης σε γυναίκες ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.(165) Ομοίως, σε ευρωπαϊκή μελέτη που εξέτασε τον συσχετισμό του ESR1 και της

οστεοπόρωσης διαπίστωσε ότι η απουσία της θέσης αναγνώρισης XbaI μείωσε τα συνολικά κατάγματα κατά 19% και τα κατάγματα σπονδυλικής στήλης κατά 35%. (163) Αυτές οι επιδράσεις ήταν ανεξάρτητες από τη οστική πυκνότητα. Μελέτες καταλήγουν πως το ESR1 είναι ένα γονίδιο ευαισθησίας για κατάγματα και έχουν δώσει κίνητρο για περαιτέρω μελέτες που θα εξετάσουν την επίδραση αυτών των κοινών γενετικών παραλλαγών στην οστεοπόρωση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι πολυμορφισμοί του ESR1 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως κλινικοί δείκτες στην αξιολόγηση του κινδύνου οστεοπορωτικού κατάγματος. (166)

### **1.11 Πολυμορφισμοί ER και στεφανιαία νόσος**

Η στεφανιαία νόσος (CAD) είναι η πιο συχνή χρόνια ασθένεια στους ανθρώπους, έχει εξαιρετικά πολύπλοκη αιτιολογία και θεωρείται από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου μεταξύ ατόμων με καρδιαγγειακά νοσήματα (167). Επιδημιολογικές μελέτες, έχουν δείξει ότι η καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα αυξάνονται απότομα μετά την έναρξη της εμμηνόπαυσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ενδογενή οιστρογόνα δρουν προστατεύοντας τις γυναίκες από την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου (168). Ωστόσο τα αποτελέσματα από κλινικές μελέτες που έχουν διενεργηθεί σχετικά με τα οφέλη της μετεμμηνοπαυσιακής ορμονικής θεραπείας με οιστρογόνα σε γυναίκες με στεφανιαία νόσο είναι αντικρουόμενα. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα των καρδιαγγειακών επιδράσεων των οιστρογόνων και υποστηρίζουν την ανάγκη καλύτερης κατανόησης του ρόλου τους στην καρδιαγγειακή βιολογία. (169,170)

Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Ο πιθανός καρδιοπροστατευτικός μηχανισμός των οιστρογόνων μπορεί να σχετίζεται με την επίδρασή τους στην αγγειογένεση, την ίνωση, την αγγειακή λειτουργία αλλά και τις διαδικασίες οξειδωτικού στρες. (171). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε *in vitro* παρασκευάσματα και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τόσο τα φυσικά όσο και τα συνθετικά οιστρογόνα έχουν αντιφλεγμονώδη και αγγειοπροστατευτική δράση. Περαιτέρω, το φυσικό ενδογενές οιστρογόνο 17β-οιστραδιόλη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ταχεία ανεξάρτητη από το ενδοθήλιο διαστολή των στεφανιαίων αρτηριών ανδρών και γυναικών, ότι αυξάνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο χαλάρωση των ανθρώπινων στεφανιαίων αρτηριών *ex vivo* και ότι βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου (172).

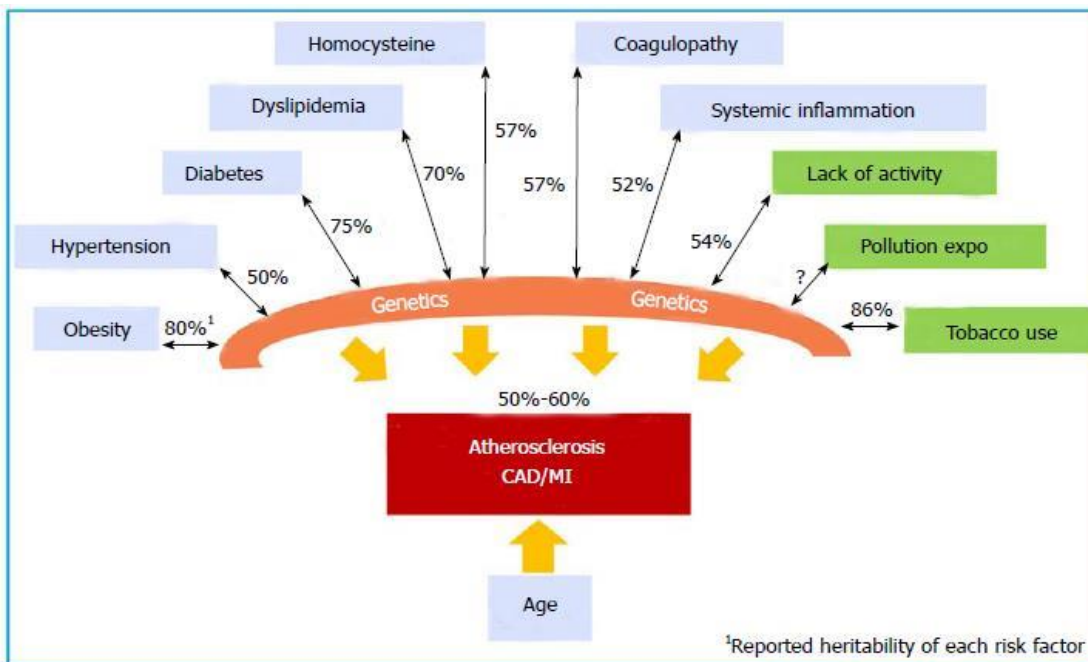
Ωστόσο όπως έχει ήδη αναφερθεί η δράση των οιστρογόνων μεσολαβείται κυρίως μέσω των ERα και ERβ. Οι ER είναι γνωστό ότι εντοπίζονται σε διάφορα καρδιακά κύτταρα, όπως καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και καρδιακούς ινοβλάστες και των δύο φύλων (173,174). Μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους ERα

και ERβ σχετίζονται με διαφορές στη μορφολογία της καρδιάς, όπως το αυξημένο μέγεθος αλλά και το πάχος του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας. Επιπλέον, η απουσία του ERα στα ανθρώπινα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (175) ή η μειωμένη έκφραση του ERα, λόγω μεθυλίωσης του υποδοχέα με την αύξηση της ηλικίας, σχετίζεται με την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης στο καρδιαγγειακό σύστημα (176).

Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) τόσο στον ERα όσο και στον ERβ που όπως έχει αποδειχτεί σχετίζονται με την ευαισθησία για καρδιαγγειακά νοσήματα. (177,178). Πράγματι, ο πολυμορφισμός του ERα PvuII έχει αποδειχτεί πως συνδέεται με εμφάνιση στεφανιαίας νόσου μεταξύ ανδρών Φινλανδικής καταγωγής (179), ενώ μια μελέτη κοορτής σε ολλανδικό πληθυσμό έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί PvuII και XbaI, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI) και ισχαιμικής καρδιακής νόσου (IHD) σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά όχι σε άνδρες (180). Αντίθετα, σε μια προοπτική μελέτη σε άνδρες και γυναίκες από την πληθυσμιακή κοορτή απογόνων της Framingham Heart Study έδειξε ότι τα άτομα και των δύο φύλων που φέρουν τον πολυμορφισμό PvuII έχουν σημαντική αύξηση του κινδύνου για έμφραγμα μυοκαρδίου (181). Τα ευρήματά αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε μια τελευταία μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 7.000 άνδρες σε πέντε κοορτές από τέσσερις χώρες (182). Αντίθετα, άλλες μελέτες δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο SNP ή των απλότυπων τους και του MI ή του κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου ούτε στις γυναίκες ούτε στους άνδρες.

Σε μετα-αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε πληθυσμούς ασιατικής καταγωγής φαίνεται ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού PvuII αυξάνει τον κίνδυνο για την εμφάνιση CAD κάτι που όμως δεν φαίνεται να ισχύει στους Δυτικούς πληθυσμούς (183). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με διάφορους τρόπους. Αρχικά, οι φυλετικές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς της Ανατολής και της Δύσης μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική ευαισθησία για την CAD, ως αποτέλεσμα διαφορετικής γενετικής έκφρασης και επιγενετικών φαινομένων (Σχήμα 25). Δευτερευόντως, είναι γνωστό ότι η CAD είναι μια πολύπλοκη νόσος, η οποία δημιουργείται από πολλαπλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος, όπως είναι οι διαφορές του τρόπου ζωής, των γεωγραφικών συνθηκών και του κλίματος (183). Τέλος, φαίνεται ότι οι μελέτες οι οποίες έγιναν σε Δυτικούς πληθυσμούς περιλάμβαναν σχετικά μικρά δείγματα, και επομένως, η έλλειψη συσχέτισης του PvuII πολυμορφισμού και του CAD στους Δυτικούς πληθυσμούς μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη στατιστικής ισχύος.

Η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού PvuII στο γονίδιο ESR1 και της καρδιαγγειακής νόσου δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη. Συνολικά, φαίνεται ότι οι αποδείξεις που υπάρχουν σήμερα σε σχέση με τη σύνδεση του πολυμορφισμού ESR1 PvuII και το ρίσκο για εμφάνιση CAD είναι ασαφείς.



Σχήμα 22. Γενετικοί και περιβαλλοντολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την στεφανιαία νόσο.

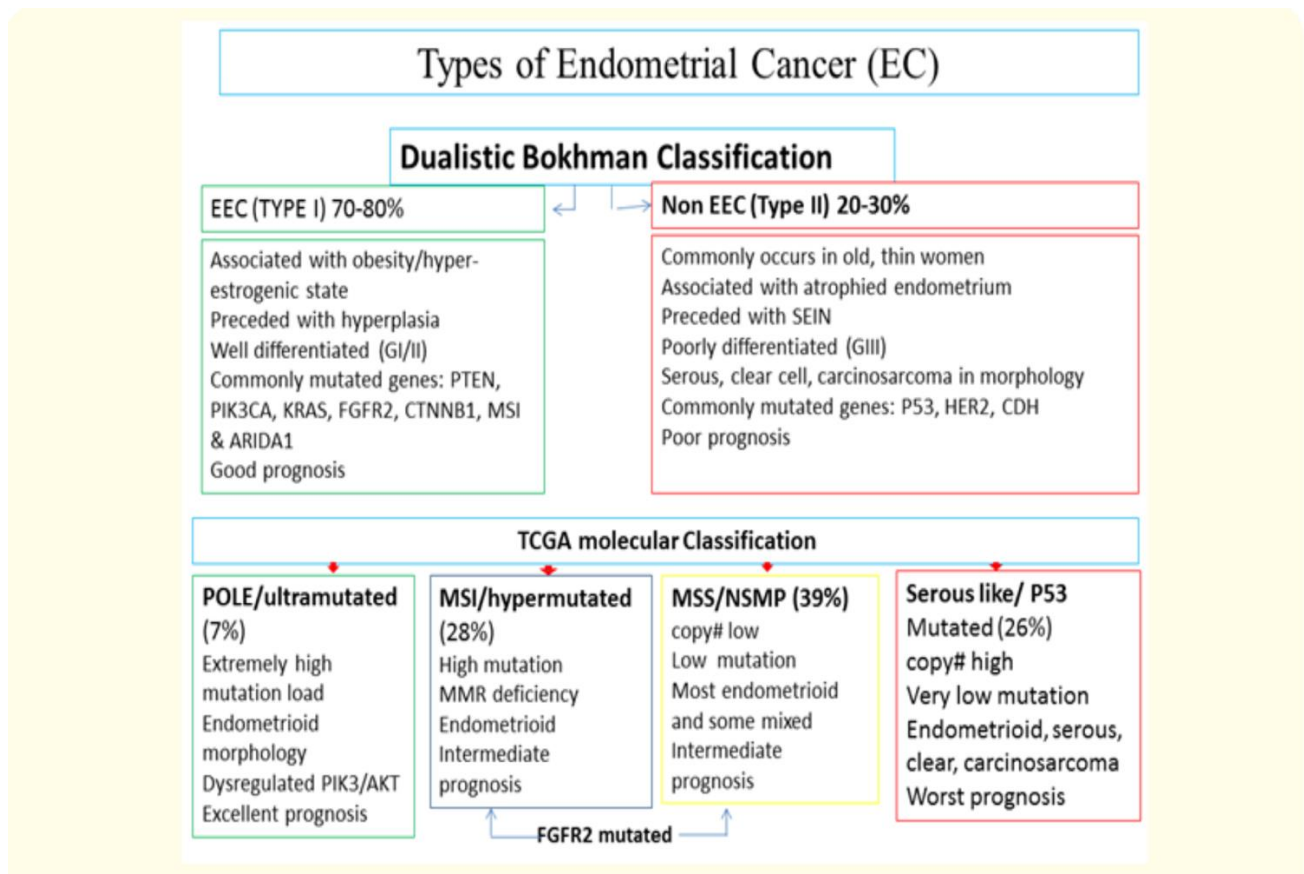
Αν και οι περισσότερες μελέτες αφορούν τον ESR1 και τους πολυμορφισμούς του, αξίζει να σημειωθεί και η συσχέτιση των πολυμορφισμών του ESR2 με την στεφανιαία νόσο. Σε μελέτη 148 ασθενών με διαγνωσμένη στεφανιαία νόσο (110 άνδρες και 38 γυναίκες) αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού AluI μεταξύ των ανδρών, ενώ καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ του πολυμορφισμού RsaI και της CAD. (184)

## 1.12 Πολυμορφισμοί ER και καρκίνος του ενδομητρίου

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι έβδομη πιο συχνή μορφή κακοήθειας μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (185) και η δεύτερη πιο διαδεδομένη στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του μαστού με μέση ηλικία διάγνωσης τα 63 έτη (186) Εκτιμάται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες ζουν 891.560 γυναίκες με

διαγνωσμένο καρκίνου του ενδομητρίου ενώ ακόμα 65.950 περιπτώσεις υπολογίζεται πως πρόκειται να διαγνωστούν εντός του 2022 σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία που δημοσιεύτηκαν από την American Cancer Society (187). Ο καρκίνος του στελέχους της μήτρας αναφέρεται συχνά ως καρκίνος του ενδομητρίου επειδή >90% των περιπτώσεων προκύπτουν στο ενδομήτριο.(188). Ο καρκίνος του σώματος της μήτρας είναι ένας από τους λίγους καρκίνους για τους οποίους η επιβίωση δεν έχει βελτιωθεί ουσιαστικά από τα μέσα της δεκαετίας του 1970, γεγονός που αντανακλά τις ελάχιστες προόδους στη θεραπεία. Ωστόσο, περισσότερα από τα δύο τρίτα των ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου διαγιγνώσκονται στο στάδιο I (συνήθως λόγω μετεμμηνοπαυσιακής αιμορραγίας), για το οποίο το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης είναι 95% (189). Στις γυναίκες μαύρου δέρματος παρατηρείται η συχνότερη εμφάνιση πιο επιθετικών μορφών καρκίνου ενδομητρίου και ως εκ τούτου η πιθανότητες να διαγνωστούν σε στάδιο I είναι σημαντικά χαμηλότερες.(59% έναντι 73%) (190). Ωστόσο, η επιβίωση σε αυτές τις γυναίκες είναι χαμηλότερη ανεξάρτητα από την ιστολογική μορφή ή το στάδιο διάγνωσης (190) υποδεικνύοντας τις ανισότητες στην πρόσβαση σε θεραπεία.

Η κλινική εικόνα του καρκίνου του ενδομητρίου είναι ετερογενής και για το λόγο αυτό ταξινομείται σε 2 τύπους: Τύπος I και Τύπος II. Ο τύπος I είναι συνήθως χαμηλού βαθμού κακοήθειας με άριστη πενταετή πρόγνωση, εμφανίζεται σε νεαρές ηλικίες και είναι οιστρογονοεξαρτώμενος. Αντίθετα ο τύπος II αφορά περισσότερο επιθετικές μορφές μη ενδομητριοειδών όγκων όπως καρκινοσάρκωμα και συνήθως δεν έχει καλή πρόγνωση καθώς η διάγνωση του γίνεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Σύγχρονες μελέτες προσπαθούν προτείνουν την μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου σε 4 κατηγορίες με πιο ξεκάθαρο προγνωστικό προφίλ.



Σχήμα 23: Νεώτερη Ταξινόμηση του καρκίνου του ενδομητρίου και τα γονίδια που υπόκεινται σε μετάλλαξη σε κάθε κατηγορία.

Asmerom Tesfamariam Sengal. "Updates in Classification and Pathogenesis of Endometrial Cancer". *EC Gynaecology* 5.4 (2017): 115-117.

Τις περισσότερες φορές η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του ενδομητρίου μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη ανάρρωση σε 80-90% των περιπτώσεων. Το γεγονός αυτό έχει ωθήσει την έρευνα στην αναζήτηση συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου για τις γυναίκες οι οποίοι μπορούν αν ανιχνεύονται πριν από την εμφάνιση της νόσου. Πιθανοί παράγοντες κινδύνου για τη νόσο περιλαμβάνουν την παχυσαρκία, την υψηλή αρτηριακή πίεση, τον διαβήτη και την ατοκία. Καθένας από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να συμβάλει σημαντικά, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ενδομητρίου 5-10 φορές. Ο κίνδυνος καρκίνου του ενδομητρίου αυξάνεται επίσης σε γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του παχέος εντέρου ή του μαστού, σύνδρομο ανεπάρκειας ωοθηκών και υπερβολική έκθεση σε ενδογενή ή εξωγενή οιστρογόνα. (191)

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου ενδομητρίου σχετίζεται τόσο με οικογενείς, γενετικούς παράγοντες αλλά και παράγοντες του τρόπου ζωής, όπως για παράδειγμα η παχυσαρκία. Υπάρχουν ωστόσο δύο σύνδρομα που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου ενδομητρίου. Το σύνδρομο του Lynch, που είναι γνωστό και ως κληρονομικός μη-πολυποειδής καρκίνος του παχέος

εντέρου αλλά και το ακόμα πιο σπάνιο σύνδρομο Cowden αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου. Τα δύο αυτά σύνδρομα αποτελούν μόνο το 3-5% των περιπτώσεων (192)

Αν και η μοριακή βάση του καρκίνου του ενδομητρίου είναι κατά κύριο λόγο άγνωστη, φαίνεται πως υπάρχει μια αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου, έπειτα από παρατεταμένη είτε υπερβολική έκθεση σε οιστρογόνα, όταν η δράση αυτών δεν αντισταθμίζεται από την δράση της προγεστερόνης. (193) Το ESR1 γονίδιο που κωδικοποιεί τον ERα έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα ως ογκογόνο στη περίπτωση του καρκίνου του ενδομητρίου (194). Γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο ESR1 μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν σε υποδοχείς οιστρογόνων με τροποποιημένη κινητική δέσμευσης που επηρεάζει αρνητικά τον κυτταρικό μεταβολισμό. Δεδομένου ότι η τροποποιημένη λειτουργία του ER θα μπορούσε να έχει αντίκτυπο στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου, το ESR1 είναι ένα υποψήφιο ογκογονίδιο του καρκίνου του ενδομητρίου, το οποίο έχει διερευνηθεί σε ορισμένες μελέτες.

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι πολυμορφισμοί του οιστρογονικού υποδοχέα μπορεί να σχετίζονται με εμφάνιση της συγκεκριμένης μορφής κακοήθειας. Οι πολυμορφισμοί στο -NH2 αμινοτελικό άκρο του ERα μεταβάλλουν την απάντηση σε οιστρογονικά ερεθίσματα και επομένως μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του ενδομητρίου. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα καθώς υπάρχουν μελέτες που σχετίζουν τους πιο συχνές μεταλλάξεις του ESR1 με τον καρκίνο του ενδομητρίου μέσω διαταραχής του μεταβολισμού των οιστρογόνων και άλλες που δεν εμφανίζουν καμμία συσχέτιση. Σε πρόσφατη μετανάλυση των Wang et al όπου εκτιμήθηκε η σχέση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII με τον καρκίνο του ενδομητρίου δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση στον συνολικό πληθυσμό, ωστόσο ιδιαίτερα ενδιαφέρον αποτελεί ότι τα όμοιοι γονότυποι Pp όσο και ο γονότυπος PP αύξησαν σημαντικά τον κίνδυνο καρκίνου του ενδομητρίου κατά περίπου 50% σε έναν ασιατικό και αυστραλιανό πληθυσμό, ενώ ο γονότυπος CC μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στις γενετικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης σαφών πληροφοριών για την εθνικότητα σε κάθε μελέτη και του σχετικά μικρού μεγέθους του δείγματος του ασιατικού και του αυστραλιανού πληθυσμού, τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Στην παραπάνω μελέτη δεν βρέθηκε καμμία συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού XbaI και καρκίνου ενδομητρίου (195). Ωστόσο σε μελέτη 702 περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου του ενδομητρίου βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον πολυμορφισμό XbaI, με τον γονότυπο XX να εμφανίζει σχεδόν 50% μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ενδομητρίου σε σχέση με τον γονότυπο χχ. (196).

Σε αντίστοιχη ανάλυση που περιελάμβανε 191 ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου και 291 υγιείς μάρτυρες και κατά την οποία λήφθηκαν υπόψη μια σειρά περιβαλλοντικών και αναπαραγωγικών παραγόντων κινδύνου τόσο για τους ασθενείς όσο και για την ομάδα ελέγχου (ηλικία, BMI, αρτηριακή υπέρταση, διαβήτης, ορμονική θεραπεία, οικογενειακό ιστορικό, κάπνισμα, αλκοόλ) αποδείχτηκε πως τόσο οι πολυμορφισμοί PvuII και XbaI αλλά και οι πολυμορφισμοί του ESR2 (rs1255998 και rs944050) συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου πριν αλλά και μετά από την προσαρμογή για τους παράγοντες κινδύνου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα εν λόγω SNP σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου. (197) Τέλος σε μετα-ανάλυση που περιλάμβανε δεκατρείς μελέτες, με συνολικά 7.649 περιπτώσεις καρκίνου του ενδομητρίου και 16.855 υγιείς μάρτυρες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός PvuII σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ενδομητρίου, ιδίως στους καυκάσιους πληθυσμούς. Στην συγκεκριμένη μετα-ανάλυση δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού XbaI. (198)

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ένα λειτουργικό προφίλ του γονιδίου ESR1 και βοηθούν στην κατανόηση των βιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του ενδομητρίου. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως διαγνωστικό εργαλείο, καθώς και ως ακριβής προσδιορισμός των ενδοκρινών θεραπευτικών στρατηγικών. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να επικυρωθεί η συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών στο ESR1 και καρκίνου του ενδομητρίου.

### **1.13. Πολυμορφισμοί ER και καρκίνος των ωοθηκών**

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η πέμπτη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών αλλά και η μορφή εκείνη με την μεγαλύτερη θνητότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες μορφές καρκίνου του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Το 90% των περιπτώσεων είναι επιθηλιακοί καρκίνοι των ωοθηκών. Το 2022, εκτιμάται ότι 19.880 νέες περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών θα διαγνωστούν στις ΗΠΑ και 12.810 γυναίκες θα καταλήξουν από τη νόσο. Περίπου το 90% των περιπτώσεων είναι επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών, η πλειονότητα των οποίων είναι ορώδεις όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας, οι οποίοι έχουν τους λιγότερους αποδεδειγμένους παράγοντες κινδύνου και τη χειρότερη πρόγνωση. (199). Αν και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να βελτιωθούν οι χειρουργικές τεχνικές και έχουν σχεδιαστεί προσεκτικά καινούρια πρωτόκολλα χημειοθεραπείας, τα ποσοστά θνησιμότητας σε ορίζοντα πενταετίας παραμένουν ιδιαίτερα υψηλά (200). Τα υψηλά αυτά ποσοστά οφείλονται κυρίως στην αργή διάγνωση αλλά και στην γρήγορη



εξέλιξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Για αυτούς τους λόγους, η εύρεση αξιόπιστων διαγνωστικών βιοδεικτών για την πρόγνωση καθώς και η ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών μεθόδων θεωρείται επιτακτική ανάγκη.

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών, εκτός από την ηλικία, είναι το ισχυρό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών. Γυναίκες που έχουν ορισμένες κληρονομικές μεταλλάξεις (π.χ. BRCA1 ή BRCA2 ή εκείνες που σχετίζονται με το σύνδρομο Lynch) διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο.(199) Σε σύγκριση με τον καρκίνο του ενδομητρίου, η χρήση ορμονών μετά την εμμηνόπαυση είναι ασθενέστερος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ενδογενή οιστρογόνα μπορεί να διαδραματίζουν μικρότερο ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου των ωοθηκών. Ωστόσο σε προοπτική μελέτη, η οποία περιελάμβανε 31 ασθενείς και 62 ελέγχους, αποδείχτηκε πως οι γυναίκες με τα υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούσας οιστραδιόλης είχαν τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών (OR = 3,0, 95% CI: 0,6-14,9) σε σύγκριση με τις γυναίκες με τα χαμηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης. Είναι σαφές ότι πρέπει να διεξαχθούν πρόσθετες έρευνες σχετικά με τις ορμονική αιτιολογία του καρκίνου των ωοθηκών (201).

Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται να δοθεί στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Είναι γνωστό πως οι επιθηλιακοί όγκοι ωοθηκών διακρίνονται σε 5 υπότυπους :1. High grade και 2. Low grade ορώδεις όγκοι, 3. βλεννώδεις, 4. ενδομετριοειδείς, 5. εκ διαυγών κυττάρων. Η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων είναι διαφορετική σε κάθε υπότυπο. Σε μελέτη από το Ovarian Tumor Tissue Analysis μεταξύ 2933 γυναικών διαπιστώθηκε πως η συχνότητα έκφρασης ER στον High Grade ορώδες, Low Grade ορώδες και ενδομετριοειδή τύπο είναι 81, 88 και 77% αντίστοιχα. Επιπλέον αυτοί οι τύποι παρουσίασαν μεγαλύτερη ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία. Αντίθετα η συχνότητα έκφρασης των ERa ήταν μόνο 20% στον βλεννώδη και 21% στον εκ διαυγών κυττάρων αντίστοιχα (202).

Λαμβάνοντας υπόψιν το σημαντικό ρόλο τους στην καρκινογένεση των ωοθηκών, έχουν γίνει πολλαπλές μελέτες πάνω στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων και τα κλινικά αποτελέσματα του καρκίνου των ωοθηκών με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η έρευνα από τους Yang et al., απέδειξε ότι η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων προβλέπει την θετική έκβαση του καρκίνου των ωοθηκών. Αντίθετα, η έρευνα των Liew et al., απέδειξε ότι η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στα κλινικά συμπτώματα των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Οι Khandakar et al., απέδειξαν ότι υπάρχει αρνητική σχέση ανάμεσα στην έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων και τη συνολική πρόβλεψη για επιβίωση ασθενή με επιθηλιακό καρκίνο(203,204,205)των ωοθηκών.

Σε μετα-ανάλυση του 2017 μελετήθηκε κατά πόσο μπορούν οι οιστρογονικοί υποδοχείς να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικό εργαλείο στην πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών. Απεδείχθη πως η έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων και κυρίως του ERα μπορεί να είναι θετικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση ασθενών στον επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται βέβαια σε αντίθεση με την μοναδική μετα-ανάλυση πάνω στον προγνωστικό ρόλο των οιστρογονικών υποδοχέων απ' τους Zhao et al το 2013, όπου δεν είχε βρεθεί καμία συσχέτιση. (206,207). Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν τον ρόλο του ERα ως προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο των ωοθηκών αλλά χρειάζεται σαφώς περαιτέρω ανάλυση.

Ωστόσο σε μελέτη που έγινε πάνω στον high grade ορώδες όγκο ωοθηκών, που αποτελεί και έναν από τους πιο επιθετικούς και θανατηφόρους τύπους, με λιγιστές θεραπευτικές επιλογές, απέδειχθη πως οι ERα ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την επιβίωση αλλά και την έκφραση γονιδίων σε υπότυπο του High Grade ορώδες όγκου. Αυτό έχει μεγάλη σημασία θεραπευτικά καθώς η στόχευση των ERα μπορεί να είναι κλινικά αποτελεσματική. Αναστολή των ERα μέσω ενδοκρινικής θεραπείας είχε σαν αποτέλεσμα ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων MYC, PGR και IGFBP3. Η έκφραση αυτών των γονιδίων με την σειρά της καθορίζει και την ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία. Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς μέσω των ERα μπορούμε να επιτρέψουμε την επιλογή ασθενών με High Grade ορώδεις όγκους που πρόκειται να ωφεληθούν από την ενδοκρινική θεραπεία. Η συγκεκριμένη μελέτη στόχευσε στο High grade ορώδες αλλά αντίστοιχη εφαρμογή μπορεί να υπάρχει και στους ενδομητριοειδείς όγκους καθώς και αυτοί είναι συχνά ERα θετικοί. Ωστόσο μια τέτοια υπόθεση μένει να μελετηθεί. (208)

Σχετικά με τους πολυμορφισμούς που μελετάμε, έχει αποδειχτεί πως η παρουσία του πολυμορφισμού PvuII στον ERα μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου ωοθηκών. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει στον μηχανισμό ενίσχυσης σήματος με αποτέλεσμα μια αυξημένη απόκριση οιστρογόνων σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Η συγκεκριμένη μελέτη αποκάλυψε μια σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού PvuII και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού. Ωστόσο λόγω του μικρού δείγματος απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση (209).

Στην ανθρώπινη ωοθήκη είναι γνωστό πως κυρίαρχος οιστρογονικός υποδοχέας είναι ο υποδοχέας β, ενώ ο υποδοχέας α βρίσκεται κυρίως στην μήτρα, ήπαρ, λιπώδη και μυικό ιστό, οστά και σε κάποιες κεντρικές περιοχές του εγκεφάλου. Αντίθετα και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται εξίσου στον μαστό, ουρογεννητική οδό, οστά και καρδιαγγειακό σύστημα. Η έκφραση του ERβ στην ωοθήκη φαίνεται να έχει κυρίως ανασταλτικό χαρακτήρα στους επιθηλιοειδείς όγκους, μειώνοντας το μέγεθος του όγκου και αποτρέποντας τις μεταστάσεις, και αυτές οι ενέργειες βασίζονται στο γεγονός ότι το

ERβ αναστέλλει την έκφραση και τη δράση του ERα και έτσι μειώνει τον πολλαπλασιασμό που προκαλείται από την οιστραδιόλη. Απώλεια έκφρασης του ESR2 φαίνεται να είναι ενδεικτική της κυτταρικής διαφοροποίησης και αποτελεί το κρίσιμο σημείο για την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, η πλήρης απώλεια έκφρασης ERβ έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μεταστάσεων στους επιθηλιακούς όγκους. (210,211). Η δυναμική σχέση μεταξύ των δύο υποδοχέων στον καρκίνο ωοθηκών φαίνεται στο γεγονός πως ο λόγος ERα/ERβ ήταν δυο φορές υψηλότερες σε πρωτοπαθή καρκινικά κύτταρα ωοθήκης σε αντίθεση με φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα ωοθήκης (212). Συνεπώς η απώλεια έκφρασης του ERβ μπορεί να συνιστά ένα κρίσιμο σημείο στην πορεία της καρκινογένεσης. Κατά τον ίδιο τρόπο μπορούμε να υποθέσουμε ότι και οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του υποδοχέα β θα μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου ωοθήκης μέσω διεργασιών κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης.

Στο γονίδιο του οιστρογονικού υποδοχέα β έχουν αναγνωριστεί αρκετοί πολυμορφισμοί αλλά δεν είναι γνωστή ακόμα η ακριβή βιολογική δράση και ο συσχετισμός τους με οιστρογονοεξαρτώμενες ή μη ασθένειες. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως ο πολυμορφισμός rs1256030 σχετίζεται με τον καρκίνο των ωοθηκών στους καυκάσιους πληθυσμούς, (213) ενώ ο rs1256031 με την εμφάνιση καρκίνου ωοθηκών σε γυναίκες από την Ιαπωνία. (214). Ο πολυμορφισμός rs1256049 έχει συσχετιστεί γενικά με αυξημένο ποσοστό εμφάνισης κακοήθειας σε καυκάσιο πληθυσμό, αλλά όχι συγκεκριμένα με καρκίνο των ωοθηκών (215). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται διάφοροι πολυμορφισμοί του οιστρογονικού υποδοχέα β και ποιοι από αυτούς έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τον καρκίνο των ωοθηκών

Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί	
rs3020449	Σημαντικά συχνότερη εμφάνιση σε καρκίνο ωοθηκών σταδίου FIGO III-IV
rs2987983	Δεν σχετίζεται με καρκίνο ωοθηκών
rs3020450	
rs8008187	Αλλαγή της θέσης σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα
rs3829768	
rs34114304	
rs34404086	
rs35036378	Μειώνει την δράση του TATA box*
rs1271572	Αυξημένος κίνδυνος καρκίνου ωοθηκών ειδικά σε νεότερες γυναίκες και σε γυναίκες που δεν είχαν

	χρησιμοποιήσει ποτέ αντισυλληπτικά στεροειδή. Αυξημένη θνησιμότητα στις γυναίκες που λαμβάνουν HRT
rs1887994	
rs1256049	Δεν συνδέεται με καρκίνο ωοθηκών. Ωστόσο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας στον καυκάσιο πληθυσμό, ενώ κωδικοποιεί το περιοριστικό ένζυμο RsaI που προκαλεί διαταραχές της ωοθηκικής λειτουργίας
rs4986938	Δεν συνδέεται με καρκίνο ωοθηκών. Ωστόσο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας στον καυκάσιο πληθυσμό, ενώ κωδικοποιεί το περιοριστικό ένζυμο A1uI που προκαλεί διαταραχές της ωοθηκικής λειτουργίας
rs944046	
rs1256031	Αντικρουόμενα ευρήματα. Φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με τον καρκίνο ωοθηκών σε γυναίκες με καταγωγή από Ιαπωνία
rs1256030	Αύξηση κινδύνου καρκίνου ωοθηκών σε καυκάσιο πληθυσμό

National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine (2015). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. Accessed 7 Nov 2015

\*TATA box: Πρόκειται για αλληλουχία DNA και πήρε το συγκεκριμένο όνομα γιατί χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα ζεύγη βάσεων T και A. Μεταλλάξεις στο TATA Box έχουν σχετιστεί με την εμφάνιση διάφορων νοσημάτων, μεταξύ αυτών ο γαστρικός καρκίνος, β-θαλασσαιμία, ανοσοκαταστολή και HIV-1

Αναμφίβολα, το ERβ φαίνεται πως παίζει βασικό ρόλο όχι μόνο στην παθογένεση του καρκίνου των ωοθηκών αλλά και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Απώλεια έκφρασης του ERβ σχετίζεται με μειωμένη απόκριση του όγκου στην χημειοθεραπεία με σισπλατίνη, ενώ σε ασθενείς με αυξημένη παρουσία του οιστρογονικού υποδοχέα β υπήρχε μεγαλύτερη ευαισθησία στο χημειοθεραπευτικά σχήματα με καρβοπλατίνη και paclitaxel. Οι ακριβείς ρόλοι του ERβ και οι γενετικές του παραλλαγές που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα είτε την τοξικότητα των θεραπευτικών σχημάτων στον καρκίνο ωοθήκης παραμένουν άγνωστοι. Ωστόσο τα αποτελέσματα πολλών ερευνών υποδηλώνουν έναν σημαντικό ρόλο των πολυμορφισμών ESR2 στον έγκαιρο προσδιορισμό των υποψηφίων για εναλλακτικές θεραπευτικές παρεμβάσεις. Απαιτείται πολύ περισσότερη έρευνα για τον καθορισμό των πολυμορφισμών του ERβ και πως μπορούν να είναι σε θέση να προβλέψουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συμπεριφορά του όγκου. Μια καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης ERβ στον καρκίνο των ωοθηκών αλλά και σε φυσιολογικό ιστό

των ωοθηκών θα μπορούσε να βοηθήσει στην επιλογή πιθανών σημείων παρέμβασης. Η κλινική χρησιμότητα του ERβ θα μπορούσε να εκφραστεί και ως συνάρτηση με τον ERα, ίσως με τη μορφή αναλογίας ERα/ERβ, έχοντας υπόψη ότι το ERβ αναστέλλει περίπου το 70 % των γονιδίων που ρυθμίζονται από το ERα, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό και μεταβολισμό.

### **1.14 Πολυμορφισμοί ER και αναπαραγωγικά γεγονότα**

Η υπογονιμότητα είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα που επηρεάζει τουλάχιστον το 15% των ζευγαριών παγκοσμίως (216). Η ανθρώπινη γονιμότητα είναι μια ιδιαίτερα σύνθετη διεργασία, η οποία καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Μελέτες παρείχαν ενδείξεις ότι οι γενετικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν σημαντική συνιστώσα της ανθρώπινης γονιμότητας, ασκώντας επίδραση σε πρόδρομους παράγοντες της γονιμότητας, όπως η έναρξη της ήβης, η σεξουαλική συμπεριφορά και η επιθυμία για τεκνοποίηση (217).

Τα οιστρογόνα μεσολαβούν διάφορες δράσεις στο σώμα τόσο των γυναικών όσο και των ανδρών, ρυθμίζοντας φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες στο αναπαραγωγικό, καρδιαγγειακό, σκελετικό, ενδοκρινικό, νευρικό και ανοσιακό σύστημα. Ως εκ τούτου, εμπλέκονται με δεκάδες διαταραχές ή νοσήματα, όπως η υπογονιμότητα, η ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα οιστρογόνα στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και η ανάπτυξη των δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών αναγνωρίζονται κυρίως ως η σημαντικότερη λειτουργία τους. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς είναι κρίσιμοι διαμεσολαβητές των λειτουργιών των οιστρογόνων. Ο ERα εντοπίζεται σε όλους τους αναπαραγωγικούς ιστούς του ανθρώπου. Η σημαντική επίδρασή του στην αναπαραγωγή έχει διευκρινιστεί ύστερα από μελέτες σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια με ERKO (alpha-ER knockout) που παρουσίασαν πλήρη στειρότητα (218). Τα θηλυκά ποντίκια ήταν υπογόνιμα επειδή ήταν ανοοθυλακιωρηκτικά, είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις γοναδοτροπινών στην υπόφυση και διαταραγμένη απόκριση της μήτρας στα οιστρογόνα (219), ενώ η απουσία του ERα στα αρσενικά ποντίκια alpha-ERKO είχε ως αποτέλεσμα σοβαρά διαταραγμένη σπερματογένεση και παραγωγή σπέρματος (220).

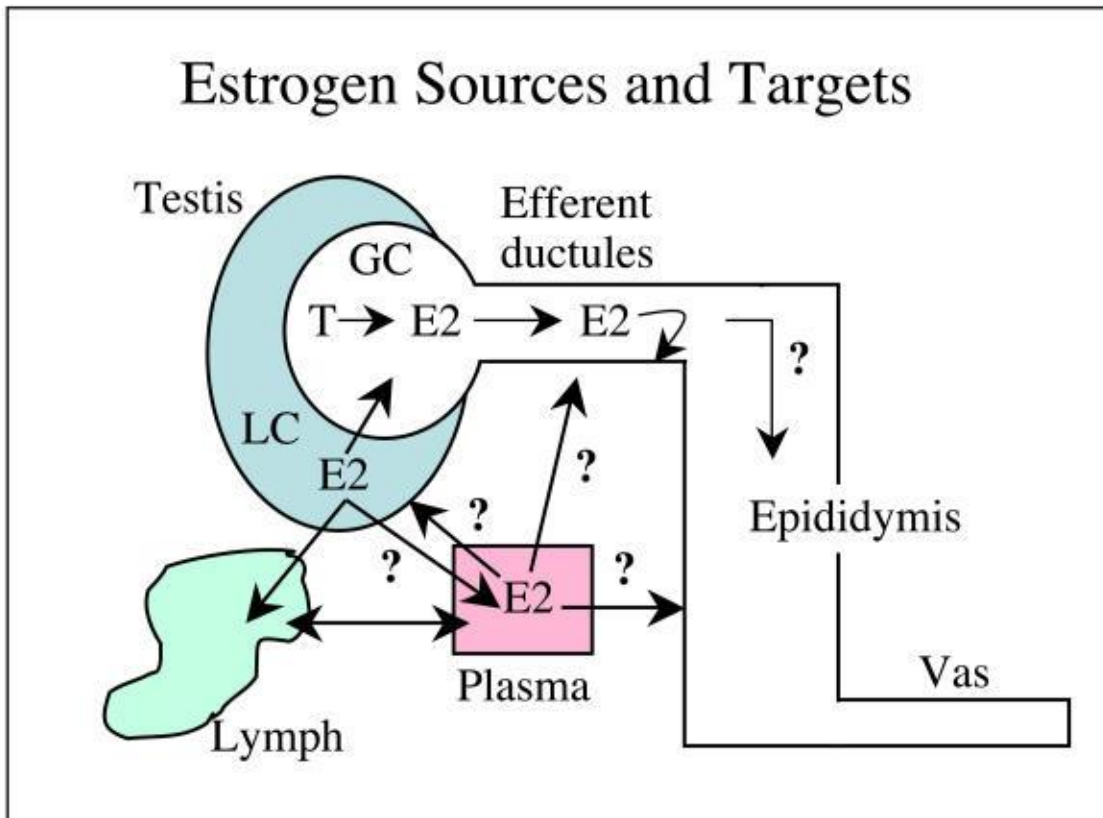
Οι μελέτες σχετικά με τους πολυμορφισμούς του ERα και την υπογονιμότητα είναι ελάχιστες. Σε μελέτη των πολυμορφισμών XbaI και PvuII σε δύο πληθυσμούς με διαφορετικά αναπαραγωγικά πρότυπα όπως σε ένα δείγμα υγιών Ιταλών ανδρών και γυναικών (n=178) και σε ένα δείγμα υγιών γυναικών με καταγωγή από την Αφρική και τον Ισημερινό (n=57) βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των γονοτύπων και των δύο πολυμορφισμών και της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς. Οι Ιταλοί άνδρες με γονότυπο xx του XbaI αλλά και με τον συνδυασμό xxrr είχαν περισσότερα παιδιά

σε σχέση με τον μέσο όρο, ενώ και οι Ιταλίδες με γονότυπο pp του PvuII εμφάνιζαν μικρότερο ποσοστό αποβολών. Αντίστοιχα στην ομάδα των γυναικών με καταγωγή από Αφρική και Εκουαδόρ ο γονότυπος pp και ppxx σχετίζονταν με μεγαλύτερη γονιμότητα. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες παρατηρήσεις που υποδεικνύουν τον ρόλο των γονότυπων ESR1 στην ανθρώπινη υπογονιμότητα και δίνουν εικόνα για τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονότυπων και της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς στους ανθρώπινους πληθυσμούς. (221)

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στον ρόλο των οιστρογονικών υποδοχέων και των πολυμορφισμών τους στην ανδρική αναπαραγωγική ικανότητα, καθώς οι ανδρικοί παράγοντες πιστεύεται ότι συμβάλλουν στο 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας.(222) Οι αναγνωρισμένες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνουν ιατρικές καταστάσεις, φάρμακα και γενετικούς παράγοντες, αν και περίπου το 30% των περιπτώσεων σχετίζονται με ιδιοπαθείς ανωμαλίες του σπέρματος (223).

Η σπερματογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει μια σειρά κυτταρικών δραστηριοτήτων όπως ο πολλαπλασιασμός, η μείωση και η διαφοροποίηση. Η διαδικασία της σπερματογένεσης ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, με τις αλλαγές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο κυττάρου να διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο. Η αρωματάση του κυτοχρώματος P450 συνθέτει οιστρογόνα από τεστοστερόνη στους όρχεις. Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και τη λειτουργία του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος, ασκούν αρνητική ανατροφοδοτική δράση στις γοναδοτροπίνες και επηρεάζουν τις λειτουργίες της αναπαραγωγής μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα ασκούν διάφορες επιδράσεις στην ανάπτυξη και την ομοιόσταση των όρχεων, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων, της ενεργοποίησης του σπέρματος και της σπερματογένεσης, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των υποδοχέων τους. (224,225) Η οιστραδιόλη επηρεάζει τα κύτταρα των όρχεων, τα γεννητικά κύτταρα και τα ώριμα σπερματοζώαρια συνδεδεμένα με τους κλασικούς ενδοκυτταρικούς υποδοχείς οιστρογόνων ή τους μεμβρανικούς υποδοχείς οιστρογόνων για την ενεργοποίηση γονιδιωματικών και μη γονιδιωματικών οδών μεταγωγής σήματος (226). Η συγκέντρωση των οιστρογόνων στο περιφερικό αίμα είναι τυπικά χαμηλή στους άντρες και κυμαίνεται από 2-180 pg/ml. Τα οιστρογόνα παρατηρείται ότι έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ορχική φλέβα και στη λέμφο σε σχέση με τη γενική κυκλοφορία. Επίσης, στην αναπαραγωγική οδό τα οιστρογόνα μπορούν να παρουσιάσουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Οι πιθανές πηγές των οιστρογόνων στους άντρες φαίνονται στην Σχήμα 25. Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος, είναι

πιθανόν ότι τα κύτταρα Leydig έχουν περιορισμένη ενδοκρινική δραστηριότητα στην αναπαραγωγική οδό (227).



Σχήμα 24. Οιστρογονικές πηγές και στόχοι στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.

Σε μελέτες σχετικά με την επίδραση των πολυμορφισμών των οιστρογονικών υποδοχέων και της ανδρικής υπογονιμότητας βρέθηκε πως τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό και ενδεχομένως τα αυξημένα επίπεδα ERα μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα του σπέρματος και κατ' επέκταση στη γονιμότητα, ενώ οι πολυμορφισμοί PvuII του γονιδίου ERα είχαν μικρή ή καθόλου επίδραση. (228). Σε αντίστοιχη μετα-ανάλυση βρέθηκε πως το αλληλίο P του PvuII εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με μείωση του κινδύνου εμφάνισης ανδρικής υπογονιμότητας, ενώ ο γονότυπος XX του XbaI συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης. (229). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την σημασία των πολυμορφισμών για την ποιότητα του σπέρματος.

Το γονίδιο του υποδοχέα β των οιστρογόνων (ERβ) διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιμότητας τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ο πολυμορφισμός RsaI στον ERβ σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα σε καυκάσιους ασθενείς. Ο πολυμορφισμός RsaI στον ERβ εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη σπερματογένεση. Φαίνεται να υπάρχει

σταθερή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού RsaI και της υπογονιμότητας στους άνδρες ιδιαίτερα μεταξύ των καπνιστών.(230)

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Σκοπός της μελέτης**

Λόγω της σπανιότητας των μελετών που συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς του οιστρογονικού υποδοχέα  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) με την πρόωμη ήβη, την αντιφατικότητα των αποτελεσμάτων των ελάχιστων σχετικών μελετών και την έλλειψη ανάλογων δεδομένων σε κορίτσια της καυκάσιας φυλής, διενεργήσαμε αυτή τη μελέτη με σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών XbaI και RvuII του ER $\alpha$  σε ένα αμιγώς καυκάσιο πληθυσμό, δηλαδή σε κορίτσια ελληνικής καταγωγής, με πρόωμη ή νωρίς ήβη.

### **2.1 Ασθενείς και Μέθοδοι**

#### **Συμμετέχοντες και σχεδιασμός μελέτης**

Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη ελέγχου 107 κοριτσιών ελληνικής καταγωγής με πρόωμη/νωρίς ήβη που αξιολογήθηκαν στη Μονάδα Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών», από το 2015 έως το 2018. Για να θεωρηθεί ένα κορίτσι ότι παρουσιάζει πρόωμη ήβη η ανάπτυξη των μαζικών αδένων έπρεπε να είναι παρούσα πριν από την ηλικία των 8 ετών, όπως αναφερόταν από τους γονείς του, και για να θεωρηθεί ότι παρουσιάζει νωρίς ήβη έπρεπε να έχει ανάπτυξη μαζικών αδένων πριν από την ηλικία των 9 αλλά μετά την ηλικία των 8 ετών. Η ανάπτυξη μαστών επιβεβαιώθηκε με ψηλάφηση από τουλάχιστον έναν γιατρό της ομάδας μας.

Κατά την παρουσίαση στο παιδοενδοκρινολογικό ιατρείο, το ύψος κάθε ασθενούς μετρήθηκε στο πλησιέστερο χιλιοστόμετρο, το βάρος μετρήθηκε σε γραμμάρια και το στάδιο της ήβης εκτιμήθηκε σύμφωνα με τον Tanner. Εκτιμήσαμε τη μέση τιμή και τις τυπικές αποκλίσεις (SD) για την ηλικία, το ύψος, το βάρος, τον ΔΜΣ (δείκτης μάζας σώματος-BMI), την τυπική απόκλιση ύψους (HSDS) και την τυπική απόκλιση του BMI (βαθμολογία BMI z-score). Το HSDS υπολογίστηκε με τη χρήση του Auxology Calculator (Pharmacia, Sweden). Το BMI z-score για την ηλικία υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα προγράμματα που παρέχονται από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) (231). Το υπερβάλλον βάρος και η παχυσαρκία εκτιμήθηκαν



σύμφωνα με τον ορισμό του CDC. Υπολογίσαμε επίσης την τυπική απόκλιση ύψους-στόχου (THSDS) κάθε ασθενούς, όπως υπολογίστηκε από τα ύψη των γονέων. Για να προσδιοριστεί εάν ένα κορίτσι παρουσίασε το μοτίβο ανάπτυξης που χαρακτηρίζει την ιδιοσυστασιακή επιτάχυνση της αύξησης (constitutional advancement of growth-CAG) καταγράφηκε το μήκος γέννησης και κάθε μέτρηση ύψους μέχρι τη διάγνωση που υπήρχε στο προσωπικό βιβλιάριο υγείας του ασθενή. Για να θεωρηθεί ένα κορίτσι ότι παρουσιάζει το μοτίβο ανάπτυξης της CAG, έπρεπε να εμφανίζει επιτάχυνση της αύξησης από τους πρώτους μήνες της ζωής και η διαφορά μεταξύ HSDS και THSDS έπρεπε να είναι μεγαλύτερη από 1,5 (232).

Οι μάρτυρες αποτελούνταν από 81 υγιείς νεαρές γυναίκες (κυρίως νοσηλεύτριες και ειδικευόμενες στην παιδιατρική) με φυσιολογική εφηβική ανάπτυξη, όπως καθορίζεται από την αναφερόμενη εμμηναρχή μετά την ηλικία των 11 ετών. Λεπτομερές, ατομικό καθώς και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό ελήφθη από κάθε συμμετέχουσα στην ομάδα ελέγχου. Το ύψος των γυναικών της ομάδας ελέγχου μετρήθηκε από γιατρό της ομάδας μας και το ύψους-στόχος υπολογίστηκε με βάση τα αναφερθέντα πατρικά και μητρικά ύψη.

Διερευνήσαμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του ERa και πρώιμης/νωρίς ήβης και, στην ομάδα ελέγχου, τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του ERa και της ηλικίας κατά την εμμηναρχή. Επιπλέον, στην ομάδα μελέτης προσδιορίστηκαν συσχετισμοί μεταξύ πολυμορφισμών ERa και αυξολογικών παραμέτρων, όπως HSDS, BMI z-score και CAG.

### **Εργαστηριακός έλεγχος**

Στα κορίτσια με πρώιμη ήβη η διάγνωση τεκμηριώθηκε με εργαστηριακό έλεγχο που περιλάμβανε μέτρηση των επιπέδων LH, FSH, οιστραδιόλης στον ορό και διέγερση με GnRH (όταν απαιτείτο). Βασικές τιμές LH ορού  $> 0,3$  mIU / ml και μέγιστες τιμές LH πάνω από 5 mIU / ml κατά τη διάρκεια της διέγερσης με GnRH θεωρήθηκαν συμβατές με τη διάγνωση της πρώιμης ήβης (233). Η δοκιμασία διέγερσης με GnRH πραγματοποιήθηκε όταν η βασική LH δεν ήταν σαφώς αυξημένη, δηλαδή  $> 0,8$  mIU / ml.

Υπερηχογράφημα της πυέλου και ακτινογραφία του αριστερού καρπού και άκρου χεριού για εκτίμηση της οστικής ηλικίας (bone age-BA) πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα κορίτσια. Στο υπερηχογράφημα πυέλου, το μήκος μήτρας  $\geq 35$  mm θεωρήθηκε συμβατό με ήβη (234).

Για να αποκλειστεί η παρουσία ενδοκράνιας εξεργασίας, μαγνητική τομογραφία (MRI) εγκεφάλου πραγματοποιήθηκε σε όλα τα κορίτσια με έναρξη ήβης πριν από την ηλικία των 8 ετών,

εκτός από εκείνα με έναρξη ήβης μεταξύ 7 και 8 ετών με αργή εφηβική πρόοδο. Είμαστε βέβαιοι ότι κανένα από τα κορίτσια που δεν διενεργήθηκε μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου δεν είχε ενδοκρανιακή παθολογία επειδή παρακολουθούνται τακτικά. Αποκλείστηκαν από τη μελέτη κορίτσια με νευρογενή κεντρική πρόωμη ήβη ή άλλες ενδοκρινολογικές ανωμαλίες και κορίτσια που γεννήθηκαν πρόωρα, μικρά για ηλικία κύησης ή ήταν υιοθετημένα.

Η οστική ηλικία των ασθενών υπολογίστηκε με τη χρήση του Άτλαντα των Greulich και Pyle.

## 2.2 Προσδιορισμός Γονοτύπου

### Απομόνωση DNA

DNA απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Blood kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). Η μέθοδος στηρίζεται στην λύση των κυττάρων παρουσία χαιοτροπικών παραγόντων και πρωτεΐνης K. Το DNA κατακρυμνίζεται με την βοήθεια μεταλλικών ιόντων παρουσία αιθανόλης. Με διαδοχικές εκπλύσεις απομακρύνονται RNA και πρωτεΐνες.

- Σε ένα σωληνάριο των 1.5ml που περιέχει 200μl διαλύματος λύσης και πρωτεΐνη K (που έχει ήδη επωαστεί σε υδατόλουτρο στους 70°C)
- Προσθέτουμε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος B3 και αναμιγνύουμε σύντομα στο vortex (για 10-20sec)
- Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10-15 λεπτά
- Προστίθενται σε κάθε δείγμα 210μl αιθανόλη 100% και ακολουθεί ανάδευση vortex
- Μεταφέρουμε τα δείγματα στις ειδικές στήλες και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα. Απορρίπτουμε τα σωληνάρια μαζί με εκπλύσεις και κρατάμε τις στήλες
- Τοποθετούμε τις στήλες σε νέα σωληνάρια των 2 ml και προσθέτουμε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος BW. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε πλήρη ταχύτητα και απορρίπτουμε τα σωληνάρια μαζί με τις εκπλύσεις
- Τοποθετούμε τις στήλες πίσω στα σωληνάρια και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε πλήρη ταχύτητα

- Μεταφέρουμε τις στήλες σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρου των 1.5 ml και προσθέτουμε 100μl διαλύματος BE (προθερμασμένο ήδη στους 70°C). Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και στην συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρωση για ένα λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα. Το διάλυμα που συλλέγεται στο σωληνάριο είναι το DNA, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω για ανάλυση

### Έλεγχος ποιότητας του εξαγόμενου DNA

Ο έλεγχος της ποιότητας του εξαγόμενου DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης. Η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει μωβ χρώμα στα σημεία όπου υπάρχει DNA, όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε έχουμε ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος

### Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με την χρήση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, είναι η DNA πολυμεράση, μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων, ένα ζευγάρι εκκινητών που θα καθορίζουν και το μέγεθος των αντιγράφων DNA καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και την δράση του ενζύμου.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, μηχανήματα που μπορούν να μεταβάλλουν τάχιιστα την θερμοκρασία επώασης των δειγμάτων και να την διατηρούν σταθερή για τα απαραίτητα χρονικά διαστήματα που απαιτούνται για την ολοκλήρωση κάθε διαδικασίας. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA, που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Ωστόσο ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας της συμβατικής τεχνικής PCR περιλαμβάνει

- Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation)
- Υβριδισμό (annealing)
- Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation)

Επαναλαμβάνονται 25-40 κύκλοι των σταδίων 2-4 ανάλογα την περίπτωση. Τέλος, ακολουθεί επώαση στους 72°C για περίπου 10 λεπτά, ώστε να υπάρχει ο χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ο πιο κλασσικός τρόπος είναι η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης του δείγματος, παράλληλα με γνωστή ποσότητα DNA δείκτη μοριακού βάρους (MW DNA Marker), ώστε να μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος των μορίων του προϊόντος. Η χρώση του gel με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει μωβ χρώμα στα σημεία όπου υπάρχει DNA, όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε έχουμε ποιοτικό προσδιορισμό του προϊόντος

#### Συνθήκες PCR για τους υπό εξέταση πολυμορφισμούς

Οι αντίστοιχοι όγκοι των αντιδραστηρίων τοποθετούνται με την βοήθεια πιπετών σε μικροσωληνάρια των 200μl ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 50μl. Τα σωληνάρια στην συνέχεια τοποθετούνται στον αυτόματο θερμοκύκλο για την έναρξη της αντίδρασης. Το μείγμα 50μl αποτελείται από 45ng DNA, 200μM από dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,4μM primers, 1 \* PCR buffer , 1.5mM MgCl<sub>2</sub> και 2U Taq Polymerase (Qiagen, Γερμανία).

Η αλληλουχία των εκκινητών για αυτή την αντίδραση είναι :

Πρόσθιος (Forward) : 5' – CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC – 3'

Αντίστροφος (Reverse): 5' - TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA – 3'

Το προϊόν που παράγεται από αυτή την αντίδραση έχει μέγεθος 1.3 kb

#### Πέψη με χρήση περιοριστικών ενζύμων

Τα ένζυμα περιορισμού ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και κόβουν την διπλή έλικα είτε ανάμεσα, είτε σε γειτονικές θέσεις των ακολουθιών αναγνώρισης. Υπάρχουν δυο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλινα άκρα (sticky ends) και η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλινα άκρα (blunt ends). Η πέψη είναι το αποτέλεσμα υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών νουκλεοτιδίων. Η πέψη από περιοριστικά ένζυμα οδηγεί στη δημιουργία 5'- φωσφορικών και 3'- υδροξυλικών άκρων.

## Προγράμματα πέψης για κάθε πολυμορφισμό

### Πέψη με ένζυμο XbaI

Ακολουθία αναγνώρισης (Recognition sequence)

XbaI:

*ctgagtgtag T<sup>^</sup>CTAG\_A gttgggatga*

Συνθήκες αντιδρασης

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>όγκος (μl)</i>
10X NEBuffer2	2
PCR product	10
Ένζυμο XbaI	0,5
BSA	0,2
Απεσταγμένο νερό (dH <sub>2</sub> O)	7,3

Σύσταση NEBuffer 2 : 50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,9

Ορισμός μονάδας ενεργότητας (Unit-U) 1U ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1μg λ βακτηριοφάγου DNA για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37° C σε συνολικό όγκο αντίδρασης 50μl (ενεργότητα ενζύμου = 10,000 IU/ml)

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37° C για 24h για να ολοκληρωθεί η πέψη

Αποτελέσματα:

XX: absence of restriction site; size: ~1.3kb

xx: presence of restriction site; homozygous; size: 981+393 kb

Xx: heterozygous; size: 981+393+1,3

### Πέψη με ένζυμο PvuII

Ακολουθία αναγνώρισης (Recognition sequence)

PvuII

*ccaaatgtcc CAG/CTG tttatgctt*

Συνθήκες αντιδρασης

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>όγκος (μl)</i>
10X NEBuffer2	2
PCR product	10
Ένζυμο PvuII	0,
Απεσταγμένο νερό (dH <sub>2</sub> O)	7,5

Σύσταση NEBuffer 2 : 50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,9

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37° C για 24h για να ολοκληρωθεί η πέψη

Αποτελέσματα:

PP: absence of restriction site; size: ~1.3kb

pp: presence of restriction site; homozygous; size: 936+438 kb

Pp: heterozygous; size: 936+438+1,3

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η κύρια μέθοδος για τον διαχωρισμό, και την αναγνώριση των τμημάτων DNA. Η τεχνική είναι απλή και γρήγορη. Επιπλέον η θέση του DNA στο gel μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα, αφού οι ζώνες βάφονται με την φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο που παρεμβάλλεται ανάμεσά τους.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε gel συγκέντρωσης 2%. Το μέγεθος των τμημάτων των προς ανάλυση δειγμάτων DNA μπορεί να προσδιοριστεί με την χρήση DNA-δείκτη μοριακών βαρών (DNA-markers), συγκρίνοντας την απόσταση που έχει καλύψει στο gel το άγνωστο τμήμα σε σχέση με την απόσταση που καλύπτει ο δείκτης

## 2.3 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα για τις ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$ SD ενώ για τις ποιοτικές μεταβλητές ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες στην εκατοστιαία κλίμακα. Η σύγκριση των ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων έγινε με Mann–Whitney test ή Kruskal-Wallis test. Η σύγκριση των ποιοτικών μεταβλητών μεταξύ των 2 ομάδων έγινε με Pearson's  $\chi^2$ . Εκτιμήθηκαν αποκλίσεις από το ισοζύγιο Hardy-Weinberg τόσο για τον πολυμορφισμό XbaI όσο και για τον PVuI. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε στο 0,05 για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το IBM SPSS, version 25.0 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

## 2.4 Αποτελέσματα

### Χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης και των μαρτύρων

Μελετήθηκαν συνολικά 107 κορίτσια με πρόωμη/νωρίς ήβη. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των μαρτύρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η μέση ηλικία ( $\pm$ SD) των κοριτσιών με πρόωμη/νωρίς ήβη, όταν προσκομίσθηκαν στο ιατρείο, ήταν 7,8 (1,0) χρόνια, η μέση ηλικία έναρξης της ήβης ήταν 7,5 (0,8) χρόνια και η μέση οστική ηλικία ήταν 9,6 (1,4) χρόνια.

Πρώιμη ήβη είχαν 65 (60,7%) κορίτσια και νωρίς ήβη 42 (39,3%) κορίτσια. Το αυξολογικό πρότυπο της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης της αύξησης υπήρχε σε 63 (64.9%) κορίτσια της ομάδας μελέτης. Η μέση ηλικία κατά την αξιολόγηση των γυναικών της ομάδας ελέγχου ήταν 32,4 (11) έτη και η μέση ηλικία κατά την εμμηναρχή ήταν 12,6 (1,1) έτη.

**Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και μαρτύρων**

Group	N	Mean	Median	SD	Min	Max
<b>Ασθενείς</b>						
Age at onset of puberty, yrs	107	7.49	7.68	0.85	4.00	9.49
Age at presentation, yrs	107	7.80	8.00	0,97	4,44	10,00
Height at presentation, cm	107	134.08	134,30	8,96	108,30	158,20
Weight at presentation, kg	102	34.68	33,35	7,05	21,50	55,80
BMI Z score	102	1.07	1,14	0,84	-2,58	2,82
Bone age, yrs	95	9,61	10,00	1,43	5,00	12,50
<b>Μάρτυρες</b>						
Age at evaluation, Yrs	83	32,4	32	11,2	17	65
Age at menarche, yrs	83	12.63	12.50	1.12	10.00	15.00
Final height, cm	81	164.90	165.00	6.64	145.00	183.00

CAG	63/97	(64.9%)
-----	-------	---------

### Συσχέτιση πολυμορφισμών XbaI και PvuII με πρώιμη/νωρίς ήβη

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική απόκλιση από το ισοζύγιο Hardy-Weinberg τόσο για τους πολυμορφισμούς XbaI όσο και για PvuII (τιμές  $p > 0,05$ ). Ο γονότυπος των πολυμορφισμών XbaI και PvuII και οι συχνότητες αλληλόμορφων φυσιολογικού (wild-type) γονότυπου και μεταλλαγμένων σε ασθενείς και μάρτυρες φαίνονται στον πίνακα 2α. Ο γονότυπος Xx του XbaI και ο γονότυπος Pp του πολυμορφισμού PvuII ήταν συχνότεροι τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους μάρτυρες. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη συνολική κατανομή των γονότυπων XbaI και PvuII ή στις συχνότητες αλληλόμορφων φυσικού τύπου και μεταλλαγμένων μεταξύ της μελέτης και των ομάδων

ελέγχου. Δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του συνδυασμού των διαφόρων γονότυπων των δύο πολυμορφισμών και της πρώιμης ήβης (πίνακας2β).

**Πίνακας 2α:** XbaI and PvuI πολυμορφισμοί και συχνότητα αλληλίων σε κορίτσια με πρώιμη ήβη

<b>XbaI</b>	<b>Group n (%)</b>		<b>Total n (%)</b>
	<b>Control</b>	<b>Patients</b>	
XX	19 (23.5%)	15 (14.0%)	34 (18.1%)
<b>Xx</b>	41 (50.6%)	60 (56.1%)	101 (53.7%)
<b>xx</b>	21 (25.9%)	32 (29.9%)	53 (28.2%)
Total	81 (100.0%)	107 (100.0%)	188 (100.0%)
<b>Allele XbaI</b>			
Wild-type	60 (49.2%)	75 (44.9%)	
Mutant	62 (50.8%)	92 (55.1%)	
<b>PvuI</b>	<b>Group n (%)</b>		<b>Total n (%)</b>
	<b>Control</b>	<b>Patients</b>	
PP	17 (19.8%)	17 (15.9%)	34 (17.6%)
<b>Pp</b>	51 (59.3%)	59 (55.1%)	110 (57.0%)
<b>pp</b>	18 (29.0%)	31 (29.0%)	43 (25.4%)
Total	86 (100.0%)	107 (100.0%)	193 (100.0%)
<b>Allele PvuI</b>			
Wild-type	68 (49.6%)	76 (45.8%)	
Mutant	69 (50.4%)	90 (44.2%)	

**Πίνακας 2β:** Συνδυασμός διάφορων γονοτύπων των δύο πολυμορφισμών σε κορίτσια με πρώιμη ήβη



Xbal & PvuII	Group n (%)	
	Control	Patients
Xxpp	13 (16.0)	24 (22.4)
xxPp	7 (8.6)	8 (7.5)
xxPP	1 (1.2)	0 (0.0)
xXpp	3 (3.7)	7 (6.5)
XxPp	35 (43.2)	48 (44.9)
XxPP	3 (3.7)	5 (4.7)
XXpp	1 (1.2)	0 (0.0)
XXPp	5 (6.2)	3 (2.8)
XXPP	13 (16.0)	12 (11.2)
Total	81 (100)	107 (100)

Δεν υπήρχε στατιστική διαφορά μεταξύ της ηλικίας έναρξης της ήβης και των πολυμορφισμών Xbal και PvuII: για XbaI  $p = 0,923$  και για PvuII  $p = 0,962$  (Πίνακας 3). Ωστόσο, σε κορίτσια που ήταν ομόζυγα για αυτούς τους πολυμορφισμούς, είτε xx είτε pp, η έναρξη της ήβης εμφανίστηκε νωρίτερα από εκείνα που ήταν ετερόζυγα ή χωρίς πολυμορφισμούς (Πίνακας 3). Κορίτσια που ήταν ομόζυγα για συνδυασμένους πολυμορφισμούς, δηλ.  $\underline{x}pp$ , είχαν νωρίτερη εφηβική έναρξη  $x: 7.28$  (1.2) από τα κορίτσια  $XxPp$   $x: 7,65$  (0,73), αν και η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική,  $p = 0,9$ . Εξετάσαμε περαιτέρω τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών ERa και της έναρξης της ήβης πριν από την ηλικία των επτά ετών (28 κορίτσια): δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά, ωστόσο υπήρξε σημαντική μείωση της τιμής  $p$  από 0,923 σε 0,091 και από 0,962 σε 0,086 για XbaI και PvuII, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3:** Συσχετισμός μεταξύ μέσης ηλικίας έναρξης ήβης και γονοτύπων των Xbal and PvuII πολυμορφισμών

Xbal	n	Mean (SD)	Minimum	Maximum
XX	15	7.53 (0.72)	6.00	8.60
Xx	60	7.58 (0.71)	5.92	9.49
xx	32	7.30 (1.11)	4.00	8.50
Total	107	7.49 (0.85)	4.00	9.49
PvuII	N	Mean (SD)	Minimum	Maximum
PP	17	7.56 (0.57)	6.00	8.60
Pp	59	7.55 (0.72)	5.92	9.49
pp	31	7.32 (1.15)	4.00	8.50
Total	107	7.49 (0.85)	4.00	9.49

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων γονότυπων Xbal και Pnull και αυξολογικών μεταβλητών, όπως το ύψος του σώματος, εκφραζόμενο ως HSDS και το σωματικό βάρος, εκφραζόμενο ως BMI Z-score (πίνακας 4). Η διαφορά HSDS μεταξύ ομάδων με τον πιο συχνό συνδυασμό πολυμορφισμού, δηλαδή xhrr και XhPr, ήταν στατιστικά σημαντική, το HSDS του xhrr ήταν 1,63 (0,77) και του XhPr ήταν 1,12 (0,88),  $p = 0,014$ . Για να εξεταστεί εάν οι διαφορές στο ύψος θα είχαν ως αποτέλεσμα διαφορές στο προβλεπόμενο τελικό ανάστημα, συγκρίθηκε η οστική ηλικία (OH) σε αυτές τις ομάδες. Η OH στο xhrr ήταν 9,2 (1,9) έτη και στο XhPr ήταν 9,7 (1,2) έτη,  $p = 0,629$ . Επιπλέον, δεν υπήρχε διαφορά στην OH μείον τη χρονολογική ηλικία (CA) μεταξύ xhrr: 1,92 έτη και XhPr = 2,05 έτη.

Τριάντα τέσσερα κορίτσια (31,8%) ήταν υπέρβαρα και 27 (25,2%) ήταν παχύσαρκα.

**Πίνακας 4:** Συσχέτιση μεταξύ των διάφορων γονοτύπων Xbal και Pnull με το HSDS και BMI Z-score

Xbal&Pnull		N	Mean (SD)	Minimum	Maximum
<b>HSDS</b>	XXPP	11	1.19 (0.73)	0.00	2.38
	XXPr	3	1.99 (0.84)	1.38	2.94
	XhPP	5	1.60 (0.45)	0.87	1.94
	XhPr	44	1.12 (0.88)*	-0.26	3.15
	Xhrr	7	0.50 (1.59)	-1.68	2.64
	xhPr	7	1.35 (1.03)	-0.20	2.46
	xhrr	22	1.63 (0.77)*	0.18	2.82
	Total	99	1.26 (0.93)	-1.68	3.15
	<b>BMI Z-score</b>	XXPP	12	0.76 (1.18)	-2.58
XXPr		3	1.99 (0.21)	1.81	2.22
XhPP		5	0.88 (0.57)	0.14	1.69
XhPr		47	1.12 (0,84)	-2.05	2.52
Xhrr		5	0.93 (1.34)	-0.91	2.40
xhPr		7	0.99 (0.63)	-0.01	1.73
xhrr		23	1.10 (0.64)	0.14	2.82
Total		102	1.07 (0.84)	-2.58	2.82

HSDS: Height standard deviation score, BMI: Body mass index

\*p value =0.014 for the comparison for HSDS between XhPr and xhrr

#### Συσχέτιση πολυμορφισμών Xbal και Pnull με την ηλικία εμμηναρχής και το ύψος στις μάρτυρες

Δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII και της ηλικίας εμμηναρχής στις γυναίκες ελέγχου (πίνακας 5). Ωστόσο, η εμμηναρχή στις γυναίκες που ήταν ομόζυγες (xx) για το XbaI εμφανίστηκε σημαντικά νωρίτερα από ό,τι σε γυναίκες χωρίς πολυμορφισμό (XX),  $x:12,27 (1,14)$  έτη έναντι  $13,03 (1,03)$ , αντίστοιχα,  $p = 0,013$ . Παρόμοια τάση για μικρότερη ηλικία εμμηναρχής βρέθηκε σε γυναίκες με γονότυπο pp,  $x:12,16 (1,06)$  έτη σε σύγκριση με τον γονότυπο PP,  $x:12,82 (0,92)$  έτη,  $p = 0,026$ . Υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ύψους και αριθμού πολυμορφικών αλληλίων στην ομάδα ελέγχου. Το μέσο ύψος για τις γυναίκες xxpp ήταν 167,5 cm, για το XxPp ήταν 164,5 cm και για το XXPP ήταν 160 cm,  $p = 0,017$  (Πίνακας 6).

**Πίνακας 5:** Συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών XbaI και PvuII και ηλικίας εμμηναρχής στην ομάδα ελέγχου

<b>XbaI</b>	<b>n</b>	<b>Mean, years (SD)</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
XX	19	13.03 (1.03)#	11.00	15.00
Xx	39	12.56 (1.12)	10.00	14.50
xx	20	12.27 (1.14)#	11.00	15.00
Total	78	12.60 (1.13)	10.00	15.00
<b>PvuII</b>	<b>n</b>	<b>Mean, years (SD)</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
PP	17	12.82 (0.92)*	11.00	15.00
Pp	49	12.72 (1.18)	10.00	15.00
pp	16	12.16 (1.06)*	11.00	15.00
Total	82	12.63 (1.12)	10.00	15.00

# p value=0.013 for the comparison for age at menarche between XX and xx

\* p value=0.026 for the comparison for age at menarche between PP and pp

**Πίνακας 6:** Τελικό ύψος των μαρτύρων με διάφορους γονότυπους των XbaI και PvuII πολυμορφισμών

Genotype	n	Mean, cm	SD	Minimum	Maximum
XXPP	12	161.26*	7.51	154.40	183.00
XXPp	5	171.20	5.40	166.00	180.00
XXpp	1	167.00	-	-	-
XxPP	3	167.66	7.50	160.00	175.00
XxPp	34	164.20*	6.19	145.00	178.00
Xxpp	2	164.00	1.41	163.00	165.00
xxPp	7	161.64	6.00	152.50	172.00
xxpp	12	167.00*	6.36	157.00	178.00
Total	76	164.57	6.63	145.00	183.00

\*p value =0.017

### Συσχέτιση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του ERa με την ιδιοσυστασιακή επιτάχυνση αύξησης των κοριτσιών με πρόωμη ήβη

Στη μελέτη μας το 64.9% των κοριτσιών με πρόωμη/νωρίς ήβη ακολουθούν το αυξητικό μοντέλο της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης της αύξησης (CAG). Για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ της κατηγορίας πολυμορφισμών XbaI και της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης της αύξησης των κοριτσιών με πρόωμη/νωρίς ήβη χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος  $\chi^2$ . Τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά,  $p=0,736$ . Αντίστοιχα, για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ της κατηγορίας PvuII και της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης αύξησης των κοριτσιών με πρόωμη/νωρίς ήβη χρησιμοποιήθηκε ομοίως ο έλεγχος  $\chi^2$ . Τα αποτελέσματα ήταν επίσης μη στατιστικά σημαντικά,  $p=0,450$ . Συμπερασματικά, δεν αποδείχθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του ERa και της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης της αύξησης

**Πίνακας 7.** Συσχέτιση μεταξύ XbaI και PvuII πολυμορφισμών και ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης αύξησης (CAG) των κοριτσιών με πρόωμη ήβη

XbaI	Ομάδα n (%)		Σύνολο n (%)
	non-CAG=0	CAG=1	
<b>XX</b>	4 (11,8%)	10 (15,9%)	14 (14,3%)
<b>Xx</b>	20 (58,8%)	34 (54,0%)	54 (55,7%)
<b>xx</b>	10 (29,4%)	19 (30,2%)	29 (29,9%)
<b>Σύνολο</b>	34 (100,0%)	63 (100,0%)	97 (100,0%)

PvuII	Ομάδα n (%)		Σύνολο n (%)
	non-CAG=0	CAG=1	
<b>PP</b>	3 (8,8%)	12 (19,0%)	15 (15,5%)
<b>Pp</b>	20 (58,8%)	33 (52,4%)	53 (54,6%)
<b>pp</b>	11 (32,4%)	18 (28,6%)	29 (29,9%)
<b>Σύνολο</b>	34 (100,0%)	63 (100,0%)	97 (100,0%)

## 2.5 Συζήτηση

Σε αυτή τη μελέτη εξετάσαμε τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII του γονιδίου ERa και της πρόωμης ήβης σε κορίτσια ελληνικής καταγωγής. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη παρόμοια μελέτη σε Καυκάσια κορίτσια.

Στη μελέτη μας δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών XbaI και PvuII και της πρόωμης ήβης. Ωστόσο, τα δεδομένα μας έδειξαν ότι μεταξύ των κοριτσιών με πρόωμη ήβη, τα κορίτσια που ήταν ομόζυγα για έναν από τους δύο πολυμορφισμούς (δηλ. xx ή pp) εμφάνισαν νωρίτερη έναρξη ήβης συγκριτικά με τα κορίτσια που είτε ήταν ετερόζυγα ή δεν έφεραν κανέναν πολυμορφισμό. Όταν αυτή η συσχέτιση εξετάστηκε σε κορίτσια με έναρξη ήβης πριν από την ηλικία των 7 ετών (τα κορίτσια με ανάπτυξη μαζικών αδένων πριν από την ηλικία των 6 ετών ήταν πολύ λίγα προς ανάλυση) τα αποτελέσματα ήταν ενδεικτικά πιθανής συσχέτισης, με την τιμή p να μειώνεται σημαντικά από 0,9 για ολόκληρη την ομάδα μελέτης σε 0,09 για κορίτσια με έναρξη εφηβείας <7 ετών. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός ασθενών (n: 28) με έναρξη της εφηβείας πριν από την ηλικία των 7 ετών δεν επέτρεψε να τεκμηριώσουμε αυτή τη συσχέτιση.

Η βιβλιογραφία σχετικά με τη συσχέτιση των πολυμορφισμών ERa και της πρόωμης ήβης είναι περιορισμένη. Οι Ke et al έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού XbaI και της πρόωμης ήβης σε κορίτσια του κινέζικου πληθυσμού (132), ενώ οι Lee et al στη μελέτη τους σε

κορίτσια με πρόωμη ήβη από την Κορέα (126) διαπίστωσαν ότι οι πολυμορφισμοί PvuII και XbaI δεν σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη της εφηβείας. Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών ERa και της πρόωμης εφηβείας αναφέρθηκε επίσης πρόσφατα σε μελέτη από τους Soares et al που αφορούσε κορίτσια από την Βραζιλία (127).

Τα κορίτσια με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη είναι γενικά ψηλότερα από τα συνομήλικά τους κορίτσια, διαφορά ύψους που υπάρχει ήδη από πολύ νωρίς, πολύ πριν από την είσοδο στην ήβη. Τα περισσότερα κορίτσια με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό τρόπο αύξησης, αυτόν της επιτάχυνσης της αύξησης από τους πρώτους μήνες ζωής, και έχει οριστεί ως ιδιοσυστασιακή επιτάχυνση της αύξησης (CAG) (234). Στη μελέτη μας, το 64,9% των κοριτσιών με πρόωμη ήβη παρουσίαζαν το μοντέλο αύξησης CAG. Τα κορίτσια με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη, τα οποία παρουσιάζουν το αυξητικό μοντέλο CAG, εκδηλώνουν επιτάχυνση της αύξησης αμέσως μετά την γέννηση φτάνοντας στην μέγιστη εκατοστιαία θέση στα πρώτα 2-4 χρόνια της ζωής. Στη συνέχεια παραμένουν σε αυτή την θέση μέχρι την έναρξη της εφηβείας, η οποία είναι πρόωμη, συνήθως μεταξύ 6 και 8 ετών. Ποιοι παράγοντες εμπλέκονται στο CAG είναι άγνωστο, όμως ορμονικοί παράγοντες που σχετίζονται με την έναρξη της ήβης, π.χ. οιστραδιόλη, λεπτίνη, IGF-1, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο.

Εξετάζοντας τις διαφορές του ύψους (HSDS) στις ομάδες των γονοτύπων με τον πιο συχνό συνδυασμό πολυμορφισμών (xxpp έναντι XxPp) προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση στατιστικά σημαντικής συσχέτισης, δείχθηκε ότι τα κορίτσια με πρόωμη ήβη που είναι ομόζυγα και για τους δύο πολυμορφισμούς (xxpp) ήταν σημαντικά ψηλότερα από τα κορίτσια που είναι ετεροζυγώτες (XxPp). Επιπλέον, το εύρημά μας ότι δεν υπάρχει διαφορά στην οστική ηλικία μείον τη χρονολογική ηλικία μεταξύ των ομόζυγων και των ετερόζυγων κοριτσιών, υποδηλώνει ότι τα κορίτσια με πολυμορφισμό xxpp είναι πιθανό να καταλήξουν στην ενήλικη ζωή ψηλότερα από τα κορίτσια με XxPp. Η διαφορά ύψους μεταξύ των ομόζυγων και των ετερόζυγων κοριτσιών δεν οφειλόταν σε διαφορές στο σωματικό βάρος, καθώς τα BMI Z-scores ήταν σχεδόν παρόμοια. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι πολυμορφισμοί του ERa μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην επιτάχυνση της αύξησης από τα πρώτα χρόνια της ζωής των κοριτσιών με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη.

Δεν γνωρίζουμε κάποια μελέτη που να εξετάζει τη λειτουργία του ERa ειδικά κατά τη διάρκεια της προεφηβικής ανάπτυξης. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι σε κορίτσια με γοναδική δυσγενεσία, η χορήγηση πολύ χαμηλής δόσης 17β-οιστραδιόλης αυξάνει την ταχύτητα του ύψους (235) και ότι αυτή η δράση επάγεται μέσω του ERa (236). Επιπλέον, η διαπίστωσή μας ότι, στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου, η ομοζυγωτία και για τους δύο πολυμορφισμούς σχετίζεται με υψηλότερο ύψος στην

ενήλικο ζωή υποστηριζόμενη επίσης από τα προαναφερθέντα δεδομένα μας σχετικά με το ύψος των κοριτσιών με πρόωμη ήβη υποδηλώνει ότι ο ERa παίζει ρόλο στην αύξηση, τουλάχιστον στις γυναίκες.

Τα κορίτσια με πρόωμη ήβη έχουν γενικά μεγαλύτερο βάρος για το ύψος τους από τα συνομήλικά τους κορίτσια. Πράγματι, περισσότερο από το ήμισυ (57%) της ομάδας μελέτης μας ήταν υπέρβαρο ή παχύσαρκο. Ωστόσο, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι σε κορίτσια με πρόωμη ήβη οι πολυμορφισμοί ERa δεν σχετίζονται με την κατάσταση του βάρους τους. Το υπερβάλλον βάρος στα κορίτσια της προεφηβικής ηλικίας έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη οιστραδιόλη στον ορό και γοναδοτοξικούς μεταβολίτες σε σύγκριση με κορίτσια μάρτυρες παρόμοιας ηλικίας και χαμηλού βάρους (191). Πιθανώς τα αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης μπορεί να προκαλέσουν την έναρξη της ήβης σε ένα υποσύνολο των υπέρβαρων κοριτσιών που είναι επιρρεπή στην εμφάνιση πρόωμης ήβης.

Αν και τα δεδομένα μας δεν έδειξαν κάποια συσχέτιση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII με την ηλικία εμμηναρχής μεταξύ των μαρτύρων, οι ομόζυγες γυναίκες με γονότυπο xx για τον XbaI και pp για τον PvuII εμφάνισαν σημαντικά νωρίτερα εμμηναρχή σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς πολυμορφισμό (XX). Μικρότερη ηλικία εμμηναρχής παρουσιάζουν και οι νεαρές γυναίκες με συνδυασμό γονότυπου xxpp, σε σχέση με τις γυναίκες με συνδυασμό XxPp, με τα αποτελέσματα να είναι οριακά μη στατιστικά σημαντικά, πιθανότατα λόγω του περιορισμένου δείγματος γυναικών με τους συγκεκριμένους γονότυπους. Οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη σχέση των πολυμορφισμών XbaI και PvuII με την ηλικία εμμηναρχής δίνουν αντιφατικά αποτελέσματα. Οι Stavrou et al (237) έδειξαν πως έφηβα κορίτσια ελληνικής καταγωγής που φέρουν τον φυσιολογικό τύπο αλληλόμορφου εμφανίζουν ελαφρά καθυστέρηση στην ηλικία έναρξης της εμμήνου ρύσεως. Ωστόσο αυτή η συσχέτιση δεν αποδείχτηκε σε γυναίκες Ιαπωνικής καταγωγής (238) και σε γυναίκες Πολωνικής καταγωγής με ιδιοπαθή σκολίωση (239).

Η βιολογική οδός μέσω της οποίας οι πολυμορφισμοί XbaI και PvuII του ERa μπορεί να επηρεάσουν την ηλικία έναρξης της ήβης και της εμμηναρχής είναι άγνωστη. Ανεξάρτητα από τον ακριβή μηχανισμό, εάν οι πολυμορφισμοί των γονιδίων ERa δύνανται να μεταβάλουν την οιστρογονική βιολογική δραστηριότητα σε κυτταρικό επίπεδο, αυτό μπορεί να επηρεάσει την επανενεργοποίηση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων, η οποία καθορίζει τον χρονισμό της ηλικίας έναρξης της ήβης και της εμμηναρχής.

Συνοψίζοντας, στα κορίτσια ελληνικής καταγωγής η πρόωμη ήβη δεν σχετίζεται με τους πολυμορφισμούς XbaI και PvuII του ERa. Η σύγκριση των γονότυπων ERa μεταξύ των κοριτσιών με πρόωμη ήβη έδειξε ότι τα κορίτσια με γονότυπο xx και pp (ομόζυγα) είχαν νωρίτερη έναρξη ήβης από τα ετερόζυγα κορίτσια ή τα κορίτσια χωρίς πολυμορφισμούς. Αναλύοντας χωριστά τα κορίτσια με έναρξη ήβης σε ηλικία μικρότερη των 7 ετών, η συσχέτιση πολυμορφισμών και ηλικίας έναρξης ήβης

τείνει να γίνει σημαντική, στη μελέτη μας όμως αυτό δεν συνέβη, πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού δείγματος κοριτσιών που εισήλθαν στην ήβη σε ηλικία <7 ετών. Τα δεδομένα μας έδειξαν επίσης ότι τα κορίτσια με πρόωμη ήβη και με γονότυπο *xxrr* ήταν σημαντικά ψηλότερα. Επιπλέον, στις γυναίκες ελέγχου, η ομοζυγωτία του *xx* για το *XbaI* και του *rr* για το *PvuII* συσχετίστηκε με σημαντικά νωρίτερη ηλικία εμμηναρχής από ό, τι σε γυναίκες χωρίς πολυμορφισμό, ενώ ο γονότυπος *xxrr* συσχετίστηκε με υψηλότερο ύψος στην ενήλικη ζωή.

Τα δεδομένα της μελέτης μας υποδηλώνουν ότι οι πολυμορφισμοί *XbaI* και *PvuII* στα ομόζυγα κορίτσια ενδεχομένως αυξάνουν τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της κισπεπτίνης, η οποία είναι εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα, και συνεπώς διεγείρουν το σύστημα κισπεπτίνης-GRP54-GnRH. Το γεγονός ότι τα κορίτσια με πρόωμη ήβη που είναι ομόζυγα και για τους δύο πολυμορφισμούς (*xxrr*) ήταν σημαντικά ψηλότερα από τα ετερόζυγα (*XxPp*) κορίτσια υποδηλώνουν ένα ρόλο για τον IGF-1 στην έναρξη της ήβης. Είναι γνωστό ότι ο IGF-1 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της κισπεπτίνης, μια δράση που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη Akt (240) και προάγει τον πολλαπλασιασμό των υποθαλαμικών νευρώνων. Για τη δράση αυτή του IGF-1 μεσολαβούν οι υποδοχείς οιστρογόνων (241). Η συσχέτιση του IGF-1 με την έναρξη της ήβης είχε ήδη προταθεί σε άλλες μελέτες με βάση την παρατήρηση ότι κορίτσια με εμμηναρχή σε ηλικία μικρότερη των 11.5 χρόνων, στην προεφηβική ηλικία (8 χρόνων) είχαν μεγαλύτερο ύψος και σημαντικά αυξημένα επίπεδα του IGF-1 στον ορό σε σύγκριση με κορίτσια που είχαν φυσιολογική ή καθυστερημένη ηλικία εμμηναρχής (242). Ως εκ τούτου, πολυμορφισμοί του ERα, υπό την επίδραση των αυξημένων επιπέδων του IGF-1, μπορεί να ενισχύσουν το κύκλωμα ενεργοποίησης της κισπεπτίνης-GRP54-GnRH προκαλώντας πρόωμη έναρξη της ήβης.

Ο κύριος περιορισμός της μελέτης ήταν ο μικρός αριθμός κοριτσιών που παρουσίασαν ανάπτυξη μαζικών αδένων πριν από την ηλικία των 7 ετών (μόνο 4 κορίτσια εισήλθαν στην ήβη πριν από την ηλικία των 6 ετών), όπως αναμενόταν σε κορίτσια με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη. Ένας ακόμη περιορισμός της μελέτης ήταν πως δεν μπορούμε να αποκλείσουμε πως κάποιες γυναίκες της ομάδας ελέγχου μπορεί να είχαν εισέλθει στην ήβη πριν την ηλικία των 9 ετών. Ωστόσο, δεδομένου πως η εμμηναρχή συνήθως συμβαίνει 2 με 2.5 έτη μετά την ανάπτυξη των μαζικών αδένων (θηλαρχή) και πως η αναφερόμενη ηλικία εμμηναρχής στην ομάδα ελέγχου ήταν τα 12.6 έτη, πιστεύουμε πως δεν είναι πιθανό ο αριθμός των μαρτύρων που παρουσίασαν νωρίς ήβη να είναι τόσο μεγάλος ώστε να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μελέτης είναι πως είναι η πρώτη που μελέτησε τη συσχέτιση των πολυμορφισμών ERα σε αμιγώς καυκάσιο πληθυσμό με πρόωμη ή νωρίς ήβη.



Συμπερασματικά, στα κορίτσια ελληνικής καταγωγής οι πολυμορφισμοί XbaI και PvuII δεν σχετίζονται με την πρόωμη ήβη. Μεταξύ των κοριτσιών με πρόωμη ήβη, η ομοζυγωτία και για τους δύο πολυμορφισμούς συσχετίστηκε με μικρότερη ηλικία έναρξης της ήβης και υψηλότερο ανάστημα σε σύγκριση με τα κορίτσια με ετεροζυγωτία ή με κορίτσια που δεν έφεραν κανέναν από αυτούς τους πολυμορφισμούς. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες σε μεγάλο αριθμό παιδιών με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη, ειδικά σε κορίτσια με έναρξη ήβης πριν από την ηλικία των 7 ετών. Επιπλέον, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι ο ERα παίζει ένα ρόλο στην αύξηση των κοριτσιών.

## 2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kirk J, Bhandhakavi M, Simon C. Disorders of puberty. *InnovAiT* 2008;1:722–8 [<http://dx.doi.org/10.1093/innovait/inn157>].
2. Aksglaede, L., Sorensen, K., Petersen, J. H., Skakkebaek, N. E. & Juul, A. Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. *Pediatrics* **123**, e932–e939 (2009).
3. Sorensen, K., Aksglaede, L., Petersen, J. H. & Juul, A. Recent changes in pubertal timing in healthy Danish boys: associations with body mass index. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 263–270 (2010).
4. Papadimitriou A, Pantiotou S, Douros K, Papadimitriou DT, Nicolaidou P, Fretzayas A. Timing of pubertal onset in girls: evidence for non-Gaussian distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Nov;93(11):4422-5. doi: 10.1210/jc.2008-0661. Epub 2008 Aug 26. PMID: 18728173.
5. Plant, T. M. (2015). Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in neuroendocrinology*, 38, 73-88.
6. Johannsen, TH., Main, KM., Ljubicic, ML., Jensen, TK., Andersen, HR., Andersen, MS., Petersen, JH., Andersson, AM., Juul, A.: Sex differences in reproductive hormones during mini-puberty in infants with normal and disordered sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 103, 3028-3037 (2018)
7. Marakaki C, Karapanou O, Gryparis A, Hochberg Z, Chrousos G, Papadimitriou A. Early Adiposity Rebound and Premature Adrenarche. *J Pediatr.* 2017 Jul;186:72-77. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.03.058. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28457524.
8. Chumlea WC, Schubert CM, Roche AF, Kulin HE, Lee PA, Himes JH, Sun SS. Age at menarche and racial comparisons in US girls. *Pediatrics.* 2003 Jan;111(1):110-3. doi: 10.1542/peds.111.1.110. PMID: 12509562.
9. Finer LB, Philbin JM. Trends in ages at key reproductive transitions in the United States, 1951-2010. *Womens Health Issues.* 2014 May-Jun;24(3):e271-9. doi: 10.1016/j.whi.2014.02.002. Epub 2014 Apr 12. PMID: 24721149; PMCID: PMC4011992.
10. Malaspina H, 1935 The commencement of menstruation in Greek girls. *Proceedings of the Academy of Athens* 10: 70-81. (In Greek, French summary).
11. Dacou-Voutetakis C, Klontza D, Lagos P, Tzonou A, Katsarou E, Antoniadis S, Papazisis G, Papadopoulos G, Matsaniotis N, 1983 Age of pubertal stages including menarche in Greek girls. *Ann Hum Biol* 10: 557-563.
12. Mantzagriotis-Meimaridis M, 1985 Anthropometric study of child and adolescent population, 1981 Institute of Child Health, Athens.
13. Papadimitriou A, Gousia E, Pitaouli E, Tapaki G, Philippidis P, 1999 Age at menarche of Greek girls. *Ann Hum Biol* 26: 175- 177.
14. Papadimitriou A, Fytanidis G, Douros K, Bakoula C, Nicolaidou P, Fretzayas A. Age at menarche in contemporary Greek girls: evidence for levelling-off of the secular trend. *Acta Paediatr.* 2008 Jun;97(6):812-5
15. Kleanthous K, Dermitzaki E, Papadimitriou DT, Papaevangelou V, Papadimitriou A. Secular changes in the final height of Greek girls are levelling off. *Acta Paediatr.* 2017 Feb;106(2):341-343.
16. Sykiotis, G. P., Pitteloud, N., Seminara, S. B., Kaiser, U. B. & Crowley, W. F. Jr. Deciphering genetic disease in the genomic era: the model of GnRH deficiency. *Sci. Transl. Med.* 2, 32rv2 (2010)
17. Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandepuut F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M.: The metastasis suppressor gene kiss-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001, 276:34631-34636.

18. Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24(2):79–93.
19. Herbison AE. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Plant TM, Zeleznik AJ, eds. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Vol 1.* 4th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier B.V.; 2015:399–467.
20. Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P. Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol.* 1992;13(2):95–119
21. Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P. Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology.* 1999;140(3):1432–1441.
22. Moore JP Jr, Shang E, Wray S. In situ GABAergic modulation of synchronous gonadotropin releasing hormone-1 neuronal activity. *J Neurosci.* 2002;22(20):8932–8941.
23. Funabashi T, Daikoku S, Shinohara K, Kimura F. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *Neuroendocrinology.* 2000;71(2):138–144.
24. Duittoz AH, Batailler M. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J Reprod Fertil.* 2000;120(2):391–396.
25. Herde MK, Iremonger KJ, Constantin S, Herbison AE. *J Neurosci.* 2013;33(31):12689–12697
26. Iremonger KJ, Porteous R, Herbison AE. Spike and neuropeptide-dependent mechanisms control GnRH neuron nerve terminal Ca<sup>2+</sup> over diverse time scales. *J Neurosci.* 2017;37(12):3342–3351
27. Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W. Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 1991; 53(3):261–267
28. Herbison AE. The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Endocrinology.* 2018 Nov 1;159(11):3723–3736. doi: 10.1210/en.2018-00653. PMID: 30272161.
29. Nagatani S, Tsukamura H, Murahashi K, Bucholtz DC, Foster DL, Maeda K. Paraventricular norepinephrine release mediates glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 1996
30. GuizhenDu<sup>abc1</sup>JialeiHu<sup>d1</sup>ZhenyaoHuang<sup>ab</sup>MingmingYu<sup>ab</sup>ChunchengLu<sup>abc</sup>XinruWang<sup>abc</sup>DiWu<sup>abc</sup> Neonatal and juvenile exposure to perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS): Advance puberty onset and kisspeptin system disturbance in female rats <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.025>
31. Perry JR et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014 Oct 2;514(7520):92–97. doi: 10.1038/nature13545. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25231870; PMCID: PMC4185210.
32. Donoso AO, Seltzer AM, Navarro CE, Cabrera RJ, López FJ, Negro-Vilar A. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids. *Braz J Med Biol Res.* 1994 Apr;27(4):921–32. PMID: 8087094.
33. Claypool LE, Kasuya E, Saitoh Y, Marzban F, Terasawa E. N-methyl D,L-aspartate induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in the prepubertal and pubertal female rhesus monkey as measured by in vivo push-pull perfusion in the stalk-median eminence. *Endocrinology.* 2000 Jan;141(1):219–28. doi: 10.1210/endo.141.1.7231. PMID: 10614642.
34. Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H. Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation

35. Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y et al. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res* 2010; 1364: 103–115.
36. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. Kisspeptin Neurons and Estrogen-Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 26;22(17):9229. doi: 10.3390/ijms22179229. PMID: 34502135; PMCID: PMC8430864.
37. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaughaupt SA, Gusella JF, O’Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614–1627.
38. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1137–1144.
39. Steyn FJ, Wan Y, Clarkson J, Veldhuis JD, Herbison AE, Chen C. Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology*. 2013;154(12):4939–4945.
40. Clarkson J, Herbison AE 2006 Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817–5825
41. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM 2005 Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2129–2134
42. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA 2006 Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26:6687–6694
43. Clarkson J, d’Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE 2008 Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28:8691–8697
44. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*. 2009 Jul;150(7):3214–20. doi: 10.1210/en.2008-1733. Epub 2009 Mar 19. PMID: 19299459; PMCID: PMC2703539.
45. Ruka KA, Burger LL, Moenter SM. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and  $\kappa$ -opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology*. 2013 Aug;154(8):2761–71. doi: 10.1210/en.2013-1268. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23744642; PMCID: PMC3713217.
46. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonca BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013 Jun 27;368(26):2467–75. doi: 10.1056/NEJMoa1302160. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23738509; PMCID: PMC3808195.
47. Aylwin CF, Toro CA, Shirtcliff E, Lomniczi A. Emerging genetic and epigenetic mechanisms underlying pubertal maturation in adolescence. *J Res Adolesc*. (2019) 29:54–79. doi: 10.1111/jora.12385
48. Kurian JR, Keen KL, Terasawa E. Epigenetic changes coincide with in vitro primate GnRH neuronal maturation. *Endocrinology*. (2010) 151:5359–68. doi: 10.1210/en.2010-0555
49. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci*. (2013) 16:281–9. doi: 10.1038/nn.3319

50. Greenspan LC, Lee MM. Endocrine disrupters and pubertal timing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* (2018) 25:49–54. doi: 10.1097/MED.0000000000000377
51. Papadimitriou, A., & Papadimitriou, D. T. (2021). Endocrine-Disrupting Chemicals and Early Puberty in Girls. *Children (Basel, Switzerland)*, 8(6), 492. <https://doi.org/10.3390/children8060492>
52. Brix N, Ernst A, Lauridsen LLB, Parner E, Støvring H, Olsen J, et al. Timing of puberty in boys and girls: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* (2019) 33:70–8. doi: 10.1111/ppe.1250
53. Li W, Liu Q, Deng X, Chen Y, Liu S, Story M. Association between obesity and puberty timing: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* (2017) 14:E1266. doi: 10.3390/ijerph14 101266
54. Cousminer DL, Berry DJ, Timpson NJ, Ang W, Thiering E, Byrne EM, et al. Genome-wide association and longitudinal analyses reveal genetic loci linking pubertal height growth, pubertal timing and childhood adiposity. *Hum Mol Genet.* (2013)22:2735–47. doi: 10.1093/hmg/ddt104
55. Kaplowitz PB. Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics.* (2008) 121 (Suppl 3):S208–17. doi: 10.1542/peds.2007-1813F
56. Dalamaga M, Chou SH, Shields K, Papageorgiou P, Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab* 2013;18:29–42.
57. Moon HS, Dalamaga M, Kim SY, Polyzos SA, Hamnvik OP, Magkos F, et al. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr Rev* 2013;34:377–412.
58. Lane PW, Dickie MM. Fertile obese male mice. Relative sterility in obese males corrected by dietary restrictions. *J Hered.* 1954;45:56–58. [Google Scholar]
59. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996;137:3144-3147. doi: 10.1210/en.137.7.3144. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
60. Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin in health and disease: facts and expectations at its twentieth anniversary. *Metabolism.* (2015) 64:5–12. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.017
61. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril.* 2002;77:433–444. doi: 10.1016/S0015-0282(01)03010-2.
62. Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Mar;70(5):841-62. doi: 10.1007/s00018-012-1095-1. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22851226; PMCID: PMC3568469.
63. Manfredi-Lozano M, Roa J, Ruiz-Pino F, Piet R, Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab.* (2016) 5:844–57. doi: 10.1016/j.molmet.2016.08.003
64. Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* (2017) 102:1557–67. doi: 10.1210/jc.2016-3677
65. McVey Neufeld KA, Luczynski P, Dinan TG, Cryan JF. Reframing the teenage wasteland: adolescent microbiota-gut-brain axis. *Can J Psychiatry.* (2016) 61:214–21. doi: 10.1177/0706743716635536
66. Cheng HL, Sainsbury A, Garden F, Sritharan M, Paxton K, Luscombe G, et al. Ghrelin and peptide YY change during puberty: relationships with adolescent growth, development, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* (2018) 103:2851–60. doi: 10.1210/jc.2017-01825
67. Tena-Sempere M. Ghrelin, the gonadal axis and the onset of puberty. *Endocr Dev.* (2013) 25:69–82. doi: 10.1159/000346055
68. Ellis BJ, Del Giudice M. Developmental adaptation to stress: an evolutionary perspective. *Annu Rev Psychol.* (2019) 70:111–39. doi: 10.1146/annurev-psych-122216-011732

69. Katugampola H, King PJ, Chatterjee S, Meso M, Duncan AJ, Achermann JC, et al. Kisspeptin is a novel regulator of human fetal adrenocortical development and function: a finding with important implications for the human fetoplacental unit. *J Clin Endocrinol Metab.* (2017) 102:3349–59. doi: 10.1210/jc.2017-00763
70. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Fujisawa S, Kinouchi R, Gereltsetseg G, et al. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol.* (2010) 588:821–9. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183558
71. Neville K, Walker J. Precocious pubarche is associated with SGA, prematurity, weight gain, and obesity. *Arch Dis Child.* (2005) 90: 258–61. doi: 10.1136/adc.2004.053959
72. Gur RE, Moore TM, Rosen AFG, Barzilay R, Roalf DR, Calkins ME, et al. Burden of environmental adversity associated with psychopathology, maturation, and brain behavior parameters in youths. *JAMA Psychiatry.* (2019). doi: 10.1001/jamapsychiatry.2019.0943.
73. Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzales L, et al. Effects of changes in nutritional conditions on timing of puberty: clinical evidence from adopted children and experimental studies in the male rat. *Horm Res* 1992;37(S1):97–105.
74. Nimrod AK, Ryan J. Aromatisation of androgens by human abdominal and breast fat tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40:367–72.
75. Yackobovitch-Gavan M, Fisch Shvalb N, Bhutta ZA. Malnutrition and catch-up growth during childhood and puberty. *World Rev Nutr Diet.* (2018) 117:129–50. doi: 10.1159/000484503
76. Callaghan BL, Tottenham N. The stress acceleration hypothesis: effects of early-life adversity on emotion circuits and behavior. *Curr Opin Behav Sci.* (2016) 7:76–81. doi: 10.1016/j.cobeha.2015.11.018
77. Virdis R, Street M, Zampolli M, Radetti G, Pezzini B, Benelli M, et al. Precocious puberty in girls adopted from developing countries. *Arch Dis Child.* (1998) 78:152–4. doi: 10.1136/adc.78.2.152
78. Sabatini DM. Twenty-five years of mTOR: uncovering the link from nutrients to growth. *PNAS.* (2017) 114:11818–25. doi: 10.1073/pnas.1716173114
79. Lu M, Sarruf DA, Li P, Osborn O, Sanchez-Alavez M, Talukdar S, et al. Neuronal Sirt1 deficiency increases insulin sensitivity in both brain and peripheral tissues. *J Biol Chem.* (2013) 288:10722–35. doi: 10.1074/jbc.M112.443606
80. Vazquez MJ, Toro CA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Roa J, Beiroa D, et al. SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nat Commun.* (2018) 9:4194. doi: 10.1038/s41467-018-06459-9
81. Partsch CJ, Sippell WG. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Hum Reprod Update.* 2001 May-Jun;7(3):292-302. doi: 10.1093/humupd/7.3.292. PMID: 11392376.
82. Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3539–44.
83. Freire AV, Escobar ME, Gryngarten MG, et al. High diagnostic accuracy of subcutaneous triptorelin test compared with GnRH test for diagnosing central precocious puberty in girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78: 398–404.
84. Carel JC, Léger J. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358: 2366–77.
85. Neely EK, Hintz RL, Wilson DM, et al. Normal ranges for immunochemiluminometric gonadotropin assays. *J Pediatr* 1995; 127: 40–46.
86. Hagen CP, Sørensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1920–26.

87. Sathasivam A, Rosenberg HK, Shapiro S, Wang H, Rapaport R. Pelvic ultrasonography in the evaluation of central precocious puberty: comparison with leuprolide stimulation test. *J Pediatr* 2011; 159: 490–95.
88. Mogensen SS, Aksglaede L, Mouritsen A, et al. Pathological and incidental findings on brain MRI in a single-center study of 229 consecutive girls with early or precocious puberty. *PLoS One* 2012; 7: e29829.
89. Pedicelli S, Alessio P, Scirè G, Cappa M, Cianfarani S. Routine screening by brain magnetic resonance imaging is not indicated in every girl with onset of puberty between the ages of 6 and 8 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 4455–61.
90. Carel JC, Eugster EA, Rogol A, et al, and the ESPE-LWPES GnRH Analogs Consensus Conference Group. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. *Pediatrics* 2009; 123: e752–62
91. Heger S, Müller M, Ranke M, et al. Long-term GnRH agonist treatment for female central precocious puberty does not impair reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254–255: 217–20. Gillis D, Karavani G, Hirsch HJ, Strich D. Time to menarche and final height after histrelin implant treatment for central precocious puberty. *J Pediatr* 2013; 163: 532–36.
92. Tanaka T, Hibi I, Kato K, Saito S, Shimizu N, Suwa S, Nakajima H 1991 A dose finding study of a super long-acting luteinizing hormone-releasing hormone analog (leuprolide acetate depot, TAP-144-SR) in the treatment of central precocious puberty. The TAP-144-SR CPP Study Group. *Endocrinol Jpn* 38: 369–376
93. Carel JC, Lahlou N, Guazzarotti L, Joubert-Collin M, Roger M, Colle M, Chaussain JL 1995 Treatment of central precocious puberty with depot leuprorelin. French Leuprorelin Trial Group. *Eur J Endocrinol* 132:699–704
94. Badaru A, Wilson DM, Bachrach LK, Fechner P, Gandrud LM, Durham E, Wintergerst K, Chi C, Klein KO, Neely EK. Sequential comparisons of one-month and three-month depot leuprolide regimens in central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1862-7. doi: 10.1210/jc.2005-1500.
95. Klein KO, Freire A, Gryngarten MG, Kletter GB, Benson M, Miller BS, Dajani TS, Eugster EA, Mauras N. Phase 3 Trial of a Small-volume Subcutaneous 6-Month Duration Leuprolide Acetate Treatment for Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Oct 1;105(10):e3660–71. doi: 10.1210/clinem/dgaa479. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Jun 16;106(7):e2842. PMID: 32738042; PMCID: PMC7442270.
96. Pasquino AM, Pucarelli I, Segni M, Matrunola M, Cerroni F. Adult height in girls with central precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone analogues and growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 449–52.
97. Vottero A, Pedori S, Verna M, et al. Final height in girls with central idiopathic precocious puberty treated with gonadotropin-releasing hormone analog and oxandrolone. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91: 1284–87.
98. Rahhal S, Clarke WL, Kletter GB, et al. Results of a second year of therapy with the 12-month histrelin implant for the treatment of central precocious puberty. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2009;2009:812517.
99. Hirsch HJ, Gillis D, Strich D, et al. The histrelin implant: a novel treatment for central precocious puberty. *Pediatrics.* 2005;116(6):e798–e802.
100. Eugster EA, Clarke W, Kletter GB, Lee PA, Neely EK, Reiter EO, Saenger P, Shulman D, Silverman L, Flood L, Gray W, Tierney D. Efficacy and safety of histrelin subdermal implant in children with central precocious puberty: a multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 May;92(5):1697-704. doi: 10.1210/jc.2006-2479. Epub 2007 Feb 27. PMID: 17327379

101. Lewis KA, Goldyn AK, West KW, Eugster EA. A single histrelin implant is effective for 2 years for treatment of central precocious puberty. *J Pediatr.* 2013 Oct;163(4):1214-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.05.033. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23809043; PMCID: PMC4063525
102. Roger M, Lahlou N, Chaussain JL 1996 Gonadotropin-releasing hormone testing in pediatrics. In: Ranke MB, ed. *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents.* Heidelberg, Germany: Johann Ambrosius Barth Verlag; 346–369
103. Hirsch HJ, Lahlou N, Gillis D, Strich D, Rosenberg-Hagen B, Chertin B, Farkas A, Hartman H, Spitz IM. Free alpha-subunit is the most sensitive marker of gonadotropin recovery after treatment of central precocious puberty with the histrelin implant. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2841-4. doi: 10.1210/jc.2009-2078. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20339028.
104. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002 Jan 31;346(5):340-52. doi: 10.1056/NEJMra000471. PMID: 11821512.
105. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2010;21:40-54.
106. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135–170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
107. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993;7:4-11
108. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;240:889–895. [PMC free article][PubMed] [Google Scholar]
109. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443–453.
110. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec 5;16(1):4-20. doi: 10.1002/rmb2.12006. PMID: 29259445; PMCID: PMC5715874.
111. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65
112. Hewitt SC, Winuthayanon W, Korach KS. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol.* 2016;56:R55–R71.
113. Li Y, Hamilton KJ, Perera L, Wang T, Gruzdev A, Jefferson TB, Zhang AX, Mathura E, Gerrish KE, Wharey L, Martin NP, Li JL, Korach KS. ESR1 Mutations Associated With Estrogen Insensitivity Syndrome Change Conformation of Ligand-Receptor Complex and Altered Transcriptome Profile. *Endocrinology.* 2020 Jun 1;161(6):bqaa050. doi: 10.1210/endo/bqaa050. PMID: 32242619; PMCID: PMC7947601.
114. Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas P, Maggiolini M, & Prossnitz ER (2018). Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *J Steroid Biochem Mol Biol,* 176, 4–15.
115. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 May 25;389(1-2):71-83. doi: 10.1016/j.mce.2014.02.002. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24530924; PMCID: PMC4040308.
116. Arnal JF, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, Henrion D, Adlanmerini M, ... Katzenellenbogen J (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol Rev,* 97(3), 1045–1087
117. Al-Koofee, D. A. , Mubarak, S. M. , 2019, 'Genetic Polymorphisms', in M. Çalışkan, O. Erol, G. C. Öz (eds.), *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms,* IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.8806
118. Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: Mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet.* 2005;366(9492):1223-1234



119. Ismail S, Essawi M. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*. 2012;1:57-63
120. Figtree GA, Noonan JE, Bhindi R, Collins P. Estrogen receptor polymorphisms: significance to human physiology, disease and therapy. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2009;3(3):164-71. doi: 10.2174/187221509789318397. PMID: 19673701.
121. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, et al. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4524–7
122. Andersen TI<sup>1</sup>, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Børresen AL. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet*. 1994 Dec;94(6):665-70.
123. Yaich L<sup>1</sup>, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res*. 1992 Jan 1;52(1):77-83
124. Luo, Y., Liu, Q., Lei, X., Wen, Y., Yang, YL., Zhang, R., Hu, MY.: Association of estrogen receptor gene polymorphisms with human precocious puberty: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol. Endocrinol*. 31, 516-521 (2015)
125. Sundermann EE, Maki PM, Bishop JR. A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. *Menopause*. 2010 Jul;17(4):874-86. doi: 10.1097/gme.0b013e3181df4a19. PMID: 20616674; PMCID: PMC2901885.
126. Lee, HS., Park, HK., Kim, KH., Ko, JH., Kim, YJ., Yi, KH., Hwang, JS.: Estrogen receptor  $\alpha$  gene analysis in girls with central precocious puberty. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab*. 26, 645-649 (2012)
127. Soares-Jr, JM., de Holanda, FS., Matsuzaki, CN., Sorpreso, ICE., de Arruda Veiga, EC., de Abreu, LC., Carvalho, KC., Baracat, EC.: Analysis of the PvuII and XbaI polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene in girls with central precocious puberty: a pilot study. *BMC. Med. Genet*. 19, 84 (2018)
128. Mayer C, Acosta-Martinez M, Dubois SL, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Levine JE. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2010 Dec 28;107(52):22693-8. doi: 10.1073/pnas.1012406108. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21149719; PMCID: PMC3012491.
129. Takase K, et al. (2009) Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss 1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol* 21:527–537.
130. Terasawa E, et al. (2010) Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J Neuroendocrinol* 22:630–638.
131. Kulin HE (1996) Delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3460–3464.
132. Ke JW, Yang Y, Duan R, et al. Association between estrogen receptor-a gene polymorphism and girls with precocious puberty. *Chin J Lab Diagn* 2010;14:1628–32.
133. Deng L, Lu Y. Research on polymorphism of estrogen  $\alpha$  receptor sites Xba I and Pvu II in relation to breast cancer[J]. *Chin J of Oncol Prev and Treat(In Chinese)*, 2011, 01): 19–22
134. Smith RA, et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA. Cancer J. Clin*. 2019;69:184–210. doi: 10.3322/caac.21557.
135. Kord-Varkaneh H, et al. Association between healthy eating index-2015 and breast cancer risk: A case-control study. *Asian Pacific J. Cancer Prev*. 2020;21:1363–1367. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.5.1363.
136. Michailidou K, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat. Genet*. 2013;45:353–361. doi: 10.1038/ng.2563.

137. Mallepell S, Krust A, Chambon P, et al. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2196–201.
138. Zhang W, Yu YY. Polymorphisms of short tandem repeat of genes and breast cancer susceptibility. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:529–34.
139. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277(5328):965–8.
140. Mussi P, Liao L, Park SE, et al. Haploinsufficiency of the corepressor of estrogen receptor activity (REA) enhances estrogen receptor function in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(45):16716–21.
141. Germain D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011 Sep;40(3):473–84, vii. doi: 10.1016/j.ec1.2011.05.009. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21889715
142. Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108(3):351–61
143. Tang LY, Chen LJ, Qi ML, et al. Effects of passive smoking on breast cancer risk in pre/post-menopausal women as modified by polymorphisms of PARP1 and ESR1. *Gene* 2013;524:84–9
144. Cai Q, Shu XO, Jin F, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:853–9.
145. Zhang ZL, Zhang CZ, Li Y, Zhao ZH, Yang SE. Association between ER $\alpha$  gene Pvu II polymorphism and breast cancer susceptibility: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Apr;97(17):e0317. doi: 10.1097/MD.00000000000010317. PMID: 29702977; PMCID: PMC5944501.
146. Li LW, Xu L. Menopausal status modifies breast cancer risk associated with ESR1 PvuII and XbaI polymorphisms in Asian women: a HuGE review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5105–11.
147. Zhang Y, et al. Association between ESR1 PvuII, XbaI, and P325P polymorphisms and breast cancer susceptibility: A metaanalysis. *Med. Sci. Monit.* 2015;21:2986–2996. doi: 10.12659/MSM.894010
148. Wang J, et al. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res. Treat.* 2007;106:273–280. doi: 10.1007/s10549-007-9497-8.
149. Sierra-Martinez M, et al. Predictive polymorphisms for breast cancer in postmenopausal Mexican women. *J. Cancer Res. Ther.* 2018;14:640–646. doi: 10.4103/0973-1482.179109.
150. Sakoda LC, et al. Selected estrogen receptor 1 and androgen receptor gene polymorphisms in relation to risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions among Chinese women. *Cancer Epidemiol.* 2011;35:48–55. doi: 10.1016/j.canep.2010.08.005
151. Tan SC, Low TY, Mohamad Hanif EA, Sharzehan MAK, Kord-Varkaneh H, Islam MA. The rs9340799 polymorphism of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene and its association with breast cancer susceptibility. *Sci Rep.* 2021 Sep 20;11(1):18619. doi: 10.1038/s41598-021-97935-8. PMID: 34545128; PMCID: PMC8452701.
152. Yue W, Wang JP, Li Y, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer.* 2010;127(8):1748–1757. doi:10.1002/ijc.25207
153. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:520–9.
154. Jeselsohn R, et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(10):573–583
155. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, Cummings SR. Postmenopausal osteoporosis. *Nature reviews Disease primers.* 2016;2:16069. doi: 10.1038/nrdp.2016.69.

156. Zhu, Heping & Jiang, Jiannong & Wang, Qiang & Zong, Jun & Zhang, Liang & Ma, Tieliang & Xu, Youjia & Zhang, Leiyan. (2018). Associations between ER $\alpha$ / $\beta$  gene polymorphisms and osteoporosis susceptibility and bone mineral density in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*. 18. 10.1186/s12902-018-0230-x.
157. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. 2010. Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor–alpha. *Mol Endocrinol*. 24(5):877–885.
158. Ikeda K, Tsukui T, Horie-Inoue K, Inoue S. 2011. Conditional expression of constitutively active estrogen receptor alpha in osteoblasts increases bone mineral density in mice. *FEBS Lett*. 585(9):1303–1309.
159. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, et al. 2007. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 130(5):811–823.
160. Walker VR, Korach KS. 2004. Estrogen receptor knockout mice as a model for endocrine research. *Ilar J*. 45(4):455–461.
161. Wang KJ, Shi DQ, Sun LS, Jiang X, Lu YY, Dai J, Chen DY, Xu ZH, Jiang Q. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density: a meta-analysis. *Chin Med J*. 2012;125(14):2589–2597.
162. García-Rojas MD, Palma-Cordero G, Martínez-Ramírez CO, Ponce de León-Suárez V, Valdés-Flores M, Castro-Hernández C, Rubio-Lightbourn J, Hernández-Zamora E, Reyes-Maldonado E, Velázquez-Cruz R, Barredo-Prieto B, Casas-Avila L. Association of Polymorphisms in Estrogen Receptor Genes (ESR1 and ESR2) with Osteoporosis and Fracture-Involvement of Comorbidities and Epistasis. *DNA Cell Biol*. 2022 Apr;41(4):437-446. doi: 10.1089/dna.2021.1165. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35285722.
163. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004; 292:2105-14.
164. Tang L, Cheng GL, Xu ZH. Association between estrogen receptor  $\alpha$  gene (ESR1) PvuII (C/T) and XbaI (A/G) polymorphisms and hip fracture risk: evidence from a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e82806.
165. Krela-Kaźmierczak I, Skrzypczak-Zielińska M, Kaczmarek-Ryś M, Michalak M, Szymczak-Tomczak A, Hryhorowicz ST, et al. ESR1 gene variants are predictive of osteoporosis in female patients with Crohn's disease. *J Clin Med* 2019;8:1306.
166. Hasan LK, Aljabban J, Rohr M, Mukhtar M, Adapa N, Salim R, Aljabban N, Syed S, Syed S, Panahiazar M, Hadley D, Jarjour W. Metaanalysis Reveals Genetic Correlates of Osteoporosis Pathogenesis. *J Rheumatol*. 2021 Jun;48(6):940-945. doi: 10.3899/jrheum.200951. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33262303.
167. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. *circulation*. 2017;135(10):e146-e603
168. Gurevitz O, Jonas M, Boyko V, et al. Clinical profile and long-term prognosis of women  $\leq$ 50 years of age referred for coronary angiography for evaluation of chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;85(7):806–809. doi: 10.1016/S0002-9149(99)00871-1
169. Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med*. 1997;336(25):1769–1775. doi: 10.1056/NEJM199706193362501
170. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321–333. doi: 10.1001/jama.288.3.321.

171. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ.* 2017;8(1):1–16. doi: 10.1186/s13293-017-0152-8
172. Sherwood A, Bower JK, McFetridge-Durdle J, Blumenthal JA, Newby LK, Hinderliter AL. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1782–1787.
173. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, et al. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation.* (2004) 110:3270–5. doi: 10.1161/01.CIR.0000147610.41984.E8
174. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, et al. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J.* (2006) 20:926–34. doi: 10.1096/fj.05-5148com
175. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation.* (1994) 89:1501–10. doi: 10.1161/01.CIR.89.4.1501
176. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* (1999) 43:985–91. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00153-4
177. Leibowitz D, Dresner-Pollak R, Dvir S, Rokach A, Reznik L, Pollak A. Association of an estrogen receptor-alpha gene polymorphism with left ventricular mass. *Blood Press.* (2006) 15:45–50. doi: 10.1080/08037050500539569
178. Peter I, Shearman AM, Vasan RS, Zucker DR, Schmid CH, Demissie S, et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women. *Am J Hypertens.* (2005) 18:1388–95. doi: 10.1016/j.amjhyper.2005.05.023
179. Kunnas T, Silander K, Karvanen J, Valkeapää M, Salomaa V, Nikkari S. ESR1 genetic variants, haplotypes and the risk of coronary heart disease and ischemic stroke in the Finnish population: a prospective follow-up study. *Atherosclerosis.* 2010 Jul;211(1):200-2. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.026.
180. Schuit SC, Oei HH, Witteman JC, Geurts van Kessel CH, van Meurs JB, Nijhuis RL, van Leeuwen JP, de Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 2004 Jun 23;291(24):2969-77. doi: 10.1001/jama.291.24.2969. PMID: 15213208.
181. Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH, Karas RH, et al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA.* (2003) 290:2263–70. doi: 10.1001/jama.290.17.2263 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
182. Shearman AM, Cooper JA, Kotwinski PJ, Miller GJ, Humphries SE, Ardlie KG, et al. Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts. *Circ Res.* (2006) 98:590–2. doi: 10.1161/01.RES.0000210578.62102.a6
183. Ding J, Xu H, Yin X, Zhang FR, Pan XP, Gu YA, Chen JZ, Guo XG. Estrogen receptor  $\alpha$  gene PvuII polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis of 21 studies. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2014 Mar;15(3):243-55. doi: 10.1631/jzus.B1300220. PMID: 24599688; PMCID: PMC3955911.
184. Foroughinia F, Dehghani P, Dianatpour M, Amiri A, Jamhiri I, Ghasemiyeh P. The association between estrogen receptor 2 gene polymorphism and complexity of coronary artery disease: an analysis in elective percutaneous coronary intervention patients. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021 Jun 4;21(1):275. doi: 10.1186/s12872-021-02088-1. PMID: 34088265; PMCID: PMC8176575.
185. Jemal A, Bray F (2011) Center MM, Ferlay J, Ward E, et al (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69–90

186. Howlader N, Noone AM & Krapcho M et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018. National Cancer Institute; 2021. Accessed March 30, 2022. [seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2018/](http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2018/)
187. Miller KD, Nogueira L, Devasia T, Mariotto AB, Yabroff KR, Jemal A, Kramer J, Siegel RL. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jun 23. doi: 10.3322/caac.21731. Epub ahead of print. PMID: 35736631.
188. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER\*Stat Database: North American Association of Central Cancer Registries Incidence—Cancer in North America Analytic File, 1995-2018, with Race/Ethnicity, Custom File With County, American Cancer Society Facts and Figures Projection Project. North American Association of Central Cancer Registries; 2019
189. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. SEER\*Stat Database: Incidence—SEER 18 Registries Research Data + Hurricane Katrina Impacted Louisiana Cases, November 2020 Submission (2000-2018) <Katrina/Rita Population Adjustment>—Linked To County Attributes—Total United States, 1969-2019 Counties. National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program; 2021.
190. Fedewa SA, Lerro C, Chase D, Ward EM. Insurance status and racial differences in uterine cancer survival: a study of patients in the National Cancer Database. *Gynecol Oncol*. 2011;122:63-68. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.03.010>
191. Kufe D, Bast R, Hait W, Hong W, Pollack R, Weichselbaum R, et al. *Cancer Medicine*, 7th edn. Columbia: BC Decker Inc, 2006. 1522–36.
192. Ryan naJ, glaire Ma, Blake D, cabrera-Dandy M, evans Dg, crosbie eJ. The proportion of endometrial cancers associated with lynch syndrome: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Genet Med* 2019.
193. Key T, Pike M. The dose-effect relationship between ‘unopposed’ oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *Br J Cancer* 1988;57: 205–12.
194. Lluís-Ganella C, Lucas G, Subirana I, Escurriol V, Tomas M, et al. (2009) Qualitative assessment of previous evidence and an updated meta-analysis confirms lack of association between the ESR1 rs2234693 (PvuII) variant and coronary heart disease in men and women. *Atherosclerosis* 207: 480–486.
195. Wang Y, Cui M, Zheng L (2012) Genetic polymorphisms in the estrogen receptor-alpha gene and the risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 91: 911–916.
196. Wedrén S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvänen AC, Kindmark A, Landegren U, Fermér ML, Stiger F, Persson I, Baron JA, Weiderpass E. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and endometrial cancer risk--a case-control study. *BMC Cancer*. 2008 Nov 6;8:322. doi: 10.1186/1471-2407-8-322. PMID: 18990228; PMCID: PMC2613912.
197. Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, Gilbert M, Hamann U, Scott RJ. Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. *BJOG*. 2009 Jul;116(8):1053-61. doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02185.x. Epub 2009 May 11. PMID: 19438492.
198. Zhou X, Gu Y, Wang DN, Ni S, Yan J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Apr 8;8(4):e60851. doi: 10.1371/journal.pone.0060851. PMID: 23593326; PMCID: PMC3620469.
199. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2022*. Atlanta: American Cancer Society; 2022.
200. Tkalia IG, Vorobyova LI, Svintsitsky VS, Nespryadko SV, Goncharuk IV, Lukyanova NY, Chekhun VF. Clinical significance of hormonal receptor status of malignant ovarian tumors. *Exp Oncol*. 2014;36:125–133

201. Brown SB, Hankinson SE. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids*. 2015 Jul;99(Pt A):8-10. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.013. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25555473.
202. Sieh W, Köbel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, Høgdall E, Deen S, Wentzensen N, Moysich KB, et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: An ovarian tumor tissue analysis consortium study. *Lancet Oncol*. 2013;14:853–862. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70253-5
203. Yang XY, Xi MR, Yang KX, Yu H. Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor status in young Chinese ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 2009;113:99–104
204. Liew PL, Hsu CS, Liu WM, Lee YC, Lee YC, Chen CL. Prognostic and predictive values of Nrf2, Keap1, p16 and E-cadherin expression in ovarian epithelial carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:85642–85649
205. Khandakar B, Mathur SR, Kumar L, Kumar S, Datta Gupta S, Iyer VK, Kalaivani M. Tissue biomarkers in prognostication of serous ovarian cancer following neoadjuvant chemotherapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:401245–401253.
206. Shen Z, Luo H, Li S, et al. Correlation between estrogen receptor expression and prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(37):62400-62413. Published 2017 May 29. doi:10.18632/oncotarget.18253
207. Zhao D, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Sun J. Prognostic role of hormone receptors in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23:25–33.
208. Andersen CL, Sikora MJ, Boisen MM, et al. Active Estrogen Receptor-alpha Signaling in Ovarian Cancer Models and Clinical Specimens. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3802-3812. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1501
209. Pemmaraju S, Amidyala L, Vottery R, Nallari P, Akka J, Ananthapur V. Association of ER- $\alpha$  gene PvuII polymorphism with ovarian cancer. *Cancer Treat Res Commun*. 2018;14:13-16. doi: 10.1016/j.ctarc.2017.11.001. Epub 2017 Nov 4. PMID: 30104002.
210. Mendoza N, Morón FJ, Quereda F et al (2008) A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci* 15(3):305–311. doi:10.1177/1933719107314064
211. Mendoza N, Sánchez-Borrego R, Galiano D et al (2009) Multigenic combination of estrogen-related genes is associated with age at natural menopause in a Spanish population. *Menopause Int* 15(4):150–156. doi:10.1258/mi.2009.009043
212. Li AJ, Baldwin RL, Karlan BY (2003) Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. *Am J Obstet Gynecol* 189(1):22–27
213. Figtree GA, Noonan JE, Bhindi R, Collins P (2009) Estrogen receptor polymorphisms: significance to human physiology, disease and therapy. *Recent Pat DNA Gene Seq* 3(3):164–171
214. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ et al (2009) Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control* 20(1):47–55. doi:10.1007/s10552-008-9216-8
215. Ryan J, Canonico M, Carcaillon L et al (2012) Hormone treatment, estrogen receptor polymorphisms and mortality: a prospective cohort study. *PLoS One* 7(3):e34112. doi:10.1371/journal.pone.0034112
216. Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. *Obstet Gynecol* 2019;133:e377–84.
217. Kohler HP, Rodgers JL, Miller WB, Skytthe A, Christensen K. Bio-social determinants of fertility. *Int J Androl* 2006;29:46–53.
218. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 2003;3:281–292.

219. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 2003;125:143 – 149.
220. Couse JF, Mahato D, Eddy EM, Korach KS. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:211–212.
221. Corbo RM, Ulizzi L, Piombo L, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Scacchi R. Estrogen receptor alpha polymorphisms and fertility in populations with different reproductive patterns. *Mol Hum Reprod.* 2007 Aug;13(8):537-40. doi: 10.1093/molehr/gam041. Epub 2007 Jun 6. PMID: 17556378
222. Chu KY, Patel P, Ramasamy R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol* 2019;29:267–71.
223. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research* 2019. 08
224. Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, et al. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 2013;50:340–5.
225. Correia S, Cardoso HJ, Cavaco JE, Socorro S. Oestrogens as apoptosis regulators in mammalian testis: angels or devils? *Expert Rev Mol Med* 2015;17:e2
226. Dostalova P, Zatecka E, Dvorakova-Hortova K. Of oestrogens and sperm: a review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction. *Int J Mol Sci* 2017;18
227. Balasinor, N H. (2017). Role of Estrogen in Males: An Update. *Advances in Biotechnology & Microbiology.* 2. 10.19080/AIBM.2017.02.555587
228. Luo H, Huang Y, Han M, Pang Y, Yu P, Tang Y, Yuan H, Li J, Chen W. Associations of serum estradiol level, serum estrogen receptor-alpha level, and estrogen receptor-alpha polymorphism with male infertility: A retrospective study. *Medicine (Baltimore).* 2021 Jul 23;100(29):e26577. doi: 10.1097/MD.00000000000026577. PMID: 34398012; PMCID: PMC8294872.
229. Li TF, Wu QY, Zhang C, Li WW, Li N, Cui YX, Li XJ, Xia XY. Polymorphisms in estrogen receptors predict the risk of male infertility: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Aug 16;12:79. doi: 10.1186/1477-7827-12-79. PMID: 25128001; PMCID: PMC4141121.
230. Bordin BM, Moura KK. Association between RsaI polymorphism in estrogen receptor  $\beta$  gene and male infertility. *Genet Mol Res.* 2015 Sep 21;14(3):10954-60. doi: 10.4238/2015.September.21.7. PMID: 26400324.
231. Papadimitriou A, Kanakis G, Douros K, Papadimitriou DT, Boutsiadis AH, Nicolaidou P, Fretzayas A. Constitutional advancement of growth is associated with early puberty in girls. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(4):273-7. doi: 10.1159/000330005. Epub 2011 Aug 22. PMID: 21860223.
232. de Vries L, Horev G, Schwartz M, Phillip M. Ultrasonographic and clinical parameters for early differentiation between precocious puberty and premature thelarche. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:891–898. doi: 10.1530/eje.1.02151. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
233. Harrington J, Palmert MR, Hamilton J. Use of local data to enhance uptake of published recommendations: an example from the diagnostic evaluation of precocious puberty. *Arch Dis Child.* 2014 Jan;99(1):15-20. doi: 10.1136/archdischild-2013-304414. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24170688.
234. Papadimitriou, A., Nicolaidou, P., Fretzayas, A., Chrousos, GP.: Clinical review: Constitutional advancement of growth, a.k.a. early growth acceleration, predicts early puberty and childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 4535-4541 (2010)
235. Ross, JL., Quigley, CA., Cao, D., Feullan, P., Kowal, K., Chipman, JJ., Cutler, GB Jr.: Growth hormone plus childhood low-dose estrogen in Turner's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 364, 1230 – 1242 (2011)
236. Shi, S., Zheng, S., Li, XF., Liu, ZD.: The effect of estradiol on the growth plate chondrocytes of limb and spine from postnatal mice in vitro: the role of estrogen- receptor and estradiol concentration. *Int. J. Biol. Sci.* 13:100-109 (2017)

237. Stavrou, I., Zois, C., Ioannidis, JP., Tsatsoulis, A.: Association of polymorphisms of the oestrogen receptor alpha gene with the age of menarche. *Hum. Reprod.* 17, 1101–1105 (2002)
238. Gorai, I., Tanaka, K., Inada, M., Morinaga, H., Uchiyama, Y., Kikuchi, R., Chaki, O., Hirahara, F.: Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor-alpha gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 799–803 (2003)
239. Janusz, P., Kotwicka, M., Andrusiewicz, M., Czapowski, D., Czubak, J., Kotwicki, T.: Estrogen receptors genes polymorphisms and age at menarche in idiopathic scoliosis. *BMC. Musculoskelet. Disord.* 15, 383 (2014)
240. Hiney, JK., Srivastava, VK., Les Dees, W.: Insulin-like growth factor-1 stimulation of hypothalamic KiSS-1 gene expression is mediated by Akt: effect of alcohol. *Neuroscience.* 166, 625-632 (2010)
241. Fernandez-Galaz, MC., Morschl, E., Chowen, JA., Torres-Aleman, I., Naftolin, F., Garcia-Segura, LM.: Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone-dependent synaptic plasticity. *Brain. Res. Bull.* 44, 525-531 (1997)
242. Thankamony, A., Ong, KK., Ahmed, ML., Ness, AR., Holly, JM., Dunger, DB.: Higher levels of IGF-I and adrenal androgens at age 8 years are associated with earlier age at menarche in girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E786-790 (2012)