

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η πρόωμη ήβη είναι 10 φορές πιο συχνή στα κορίτσια από ότι στα αγόρια και διακρίνεται σε κεντρική ή εξαρτώμενη από τις γοναδοτροφίνες και σε ανεξάρτητη από τις γοναδοτροφίνες. Η δεύτερη περιλαμβάνει τις περιπτώσεις όγκων των γονάδων ή των επινεφριδίων, όγκων που παράγουν β- hCG στα αγόρια, ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του υποδοχέα της LH καθώς και έκθεση σε εξωγενή στεροειδή του φύλου. Η κεντρική πρόωμη ήβη οφείλεται σε πρόωμη ενεργοποίηση της παλμικής έκκρισης GnRH που ρυθμίζεται από το κύκλωμα kisspeptin- GRP54- GnRH νευρώνων. Στα κορίτσια η ενεργοποίηση των GnRH νευρώνων είναι ιδιοπαθής καθώς στο 92% των περιπτώσεων δεν αναδεικνύεται ενδοκράνια παθολογία. Ο χρόνος έναρξης της ήβης επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Προκειμένου να εξετάσουμε τη συμβολή υποψήφιων γενετικών παραγόντων στο χρόνο ενήβωσης, μελετήσαμε την επίπτωση των πολυμορφισμών *XbaI* και *PvuII* του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α (*ERα*) σε κορίτσια με ιδιοπαθή πρόωμη ήβη μέσα από μια μελέτη ασθενών- μαρτύρων.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Μελετήθηκαν 41 κορίτσια που παρακολουθούνται στο εξωτερικό παιδοενδοκρινολογικό ιατρείο του ΠΓΝΑ « Αττικών» λόγω πρόωμης ήβης και 50 νεαρές γυναίκες με φυσιολογική ηλικία έναρξης της ήβης, οι οποίες χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Η μελέτη διήρκεσε από το Νοέμβριο 2008 έως τον Ιούνιο 2010. Η μελέτη εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο και την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας του νοσοκομείου. Όλες οι συμμετέχουσες ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Στον πληθυσμό της μελέτης λήφθηκε λεπτομερές ατομικό αναμνηστικό και κληρονομικό ιστορικό. Η ήβη σταδιοποιήθηκε με τη μέθοδο του Tanner, μετρήθηκε το ύψος και το βάρος κατά τη διάγνωση ενώ σωματομετρικά στοιχεία από τη γέννηση μέχρι τη διάγνωση καταγράφηκαν από το ατομικό βιβλιάριο υγείας του παιδιού για εκτίμηση του ρυθμού αύξησης. Εκτιμήθηκε επίσης η οστική ηλικία κατά τη διάγνωση και υπολογίστηκε το ύψος στόχος με βάση το μέσο γονεϊκό ύψος των γονέων. Ακολούθως τα κορίτσια με πρόωμη ήβη υποβλήθηκαν σε εργαστηριακό έλεγχο που περιλάμβανε LH και FSH, οιστραδιόλη (E2) και των ανδρογόνων DHEAS και τεστοστερόνη. Όλα τα κορίτσια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία διέγερσης με GnRH και υπερηχογράφημα έσω γεννητικών οργάνων για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της κεντρικής πρόωμης ήβης, καθώς και σε MRI υποθαλάμου- υποφύσεως για τον αποκλεισμό ενδοκράνιας παθολογίας. Οι μάρτυρες ερωτήθηκαν για την ηλικία εμμηναρχής, για το ατομικό τους αναμνηστικό και το κληρονομικό τους ιστορικό. Τόσο από τον πληθυσμό μελέτης όσο και από τους μάρτυρες ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος για απομόνωση DNA, PCR και πέψη με περιοριστικά ένζυμα για ανίχνευση των πολυμορφισμών *XbaI* και *PvuII* του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η μέση ηλικία έναρξης της ήβης του πληθυσμού μελέτης μας ήταν 7,26 έτη. Η μέση ηλικία προσέλευσης των κοριτσιών με πρόωμη ήβη ήταν 8,41 ετών και η αντίστοιχη μέση οστική ηλικία ήταν 9,26 ετών. Όλα τα κορίτσια είχαν αρνητική MRI υποθαλάμου-υπόφυσης, σε ποσοστό 80,5% είχαν εφηβική απάντηση της LH στη δοκιμασία διέγερσης με GnRH, σε ποσοστό 82,9% είχαν υπερηχογραφικά ευρήματα συμβατά με έναρξη ήβης και σε ποσοστό 78,1% παρουσίαζαν ιδιοσυστατική

επιτάχυνση της αύξησης. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τους πολυμορφισμούς *XbaI* και *PvuII* του *ERα* ανάμεσα στα κορίτσια με πρόωμη και σε αυτά με φυσιολογική έναρξη ήβης. Τα κορίτσια της ομάδας με πρόωμη ήβη που είναι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό *XbaI* παρουσιάζουν σημαντικά νωρίτερη έναρξη ήβης σε σχέση με τα κορίτσια που δεν έχουν ή είναι ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό *XbaI* ($p=0.015$). Η ήβη άρχιζε νωρίτερα στα κορίτσια που ήταν ομόζυγα και για τους δύο πολυμορφισμούς *XbaI* και *PvuII* ($p=0.002$), γεγονός που υποδηλώνει συνεργική δράση των δύο πολυμορφισμών. Επιπλέον διακρίνοντας τα κορίτσια της ομάδας με πρόωμη ήβη σε παχύσαρκα ($BMISDS >2$) και μη παχύσαρκα ($BMISDS <2$) κατά τη διάγνωση, διαπιστώσαμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο δείκτη μάζας σώματος κατά τη διάγνωση και την παρουσία είτε του *XbaI* είτε του *PvuII* πολυμορφισμού του *ERα*. Στις μάρτυρες η ηλικία εμμηναρχής δεν επηρεαζόταν σημαντικά ούτε από την παρουσία του πολυμορφισμού *XbaI* ($p=0.8$), ούτε από την παρουσία του πολυμορφισμού *PvuII* ($p=0.97$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Οι πολυμορφισμοί *XbaI* και *PvuII* του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α δεν σχετίζονται με την ανάπτυξη ιδιοπαθούς πρόωμης ήβης στα κορίτσια. Ωστόσο στα κορίτσια που παρουσιάζουν ιδιοπαθή πρόωμη ήβη, η παρουσία ομοζυγωτίας (*xx*) για τον πολυμορφισμό *XbaI* και σε μικρότερο βαθμό για τον *PvuII* (*pp*), οδηγεί σε έναρξη ήβης σε σημαντικά μικρότερη ηλικία από τα κορίτσια που είναι ετερόζυγα ή δεν έχουν καθόλου τον πολυμορφισμό. Η επίδραση αυτή ενισχύεται στα κορίτσια που είναι ομόζυγα και για τους δύο πολυμορφισμούς, γεγονός που ερμηνεύεται από την ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των δύο πολυμορφισμών που βρίσκονται στο ίδιο εσώνιο 1. Ο πιθανότερος φυσιολογικός μηχανισμός που ερμηνεύει πως οι πολυμορφισμοί του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου α εμπλέκονται στη νωρίτερη έναρξη της ήβης είναι ότι αυξάνουν την οιστρογόνο-εξαρτώμενη έκφραση του γονιδίου *kiss1* και κατά συνέπεια ευοδώνουν τη μετάδοση του σήματος *kisspeptin-GRP54-GnRH*. Η μη εμφάνιση ενωρίτερης ήβης στις μάρτυρες μπορεί να εξηγηθεί μέσω της ιδιοσυστασιακής επιτάχυνσης της αύξησης που παρουσιάζουν τα κορίτσια με πρόωμη ήβη, και τα οποία έχουν αυξημένα επίπεδα IGF-1 σε αντίθεση με τα κορίτσια με φυσιολογική ηλικία έναρξης της ήβης τα οποία έχουν φυσιολογικά επίπεδα IGF-1. Ο IGF-1 προάγει τη μορφολογική διαφοροποίηση των υποθαλαμικών νευρώνων και η δράση του ασκείται μέσω σύνδεσής του με οιστρογονικούς υποδοχείς. Επιπλέον ο IGF-1 διεγείρει την έκφραση του γονιδίου *kiss1*. Η πρόωμη έναρξη της ενήβωσης ενδέχεται να πυροδοτείται από τα αυξημένα επίπεδα του IGF-1. Πιθανολογούμε ότι οι πολυμορφισμοί του οιστρογονικού υποδοχέα α, ιδιαίτερα ο *xx*, σε έδαφος αυξημένου IGF-1, ευοδώνουν την ενεργοποίηση του συστήματος *kisspeptin-GRP54-GnRH* ενωρίτερα από ότι στα κορίτσια που δεν φέρουν τους πολυμορφισμούς αυτούς.

Abstract

INTRODUCTION: Precocious puberty is about 10 times as high more often in girls as than in boys and it is classified into two types, central or gonadotropin- dependent and in peripheral or gonadotropin independent. The latter may be caused by includes adrenal or gonadal tumors, tumors producing hCG in boys, activating LH mutations and exposure to exogenous sex steroids. Central precocious puberty is triggered by the premature activation of the GnRH pulse generator, regulated by *kisspeptin-GRP54-GnRH* neuronal circuit. Regarding In girls, GnRH pulse generator activation is rather in most instances is idiopathic, since in 92% of the cases intracranial lesions are absent.

Timing of pubertal onset is influenced by both genetic and environmental factors as well. In order to evaluate the contribution of candidate genetic factors in the timing of puberty, we studied the incidence of the *XbaI* and *PvuII* polymorphisms of the estrogen receptor α (*ERa*) gene through a case-control study.

PATIENTS AND METHODS. We studied 41 girls with medical follow-up who were followed at in our pediatric endocrine department unit for central precocious puberty and 50 young women with pubertal maturation within normal age limits that served who were as the control group. The study lasted took place from November 2008 until June 2010. The study was approved by the ethics committee of the hospital. The participants or one of their parents were informed about the purpose of the study and gave their written consent. A detailed individual and family history was taken from our study population. Puberty was rated according to Tanner stages. Statural height and body weight were measured at diagnosis, whereas body height and weight measurements from birth until diagnosis were assessed registered from the child's personal health book in order to evaluate the patients' previous growth rate. Bone age at diagnosis was also evaluated and target height according to mid-parental height was estimated. Then The girls diagnosed with precocious puberty underwent a laboratory check investigations, which included including serum LH and FSH (chemiluminescence), estradiol E2 (ECLIA), DHEAS (ECLIA) and testosterone measurements (chemiluminescence). All girls underwent a GnRH stimulation test and an abdominal ultrasonography in order to confirm the diagnosis of gonadotropin-dependent precocious puberty and a magnetic resonance imaging (MRI) of the hypothalamic-pituitary region for the exclusion of intracranial lesion. The young women consisting the control group were asked about their age at menarche and about their medical history and the family's medical history as well. From all girls and young women participating in the study a blood sample was obtained for DNA isolation. PCR products, which consisted of the *ERa* gene, were digested with *XbaI* and *PvuII* restriction enzymes.

RESULTS. Mean age of puberty onset was 7,26 years. Mean age at presentation of the girls with precocious puberty was 8,41 years and mean bone age was 9.26 years. MRI was normal in all girls, therefore the diagnosis of idiopathic precocious puberty was established. 80,5% of the patients had a pubertal response of LH to GnRH stimulation. 82,9% had ultrasonographic findings consistent with pubertal onset and 78,1 % presented the growth pattern of constitutional advancement of growth. There were no significant differences in the overall distribution of the *XbaI* and *PvuII* genotypes between the study and the control groups. Girls with idiopathic precocious puberty homozygous for the *XbaI* polymorphism had significantly earlier pubertal onset (SD:1.07) compared to non-carriers (SD:0.78) or heterozygous (SD:0.74) for the *XbaI* polymorphism ($p=0.015$). Onset of puberty was also earlier in girls homozygous for both *XbaI* and *PvuII* polymorphisms, (SD:0.95) ($p=0.002$), suggesting a synergistic effect of these two polymorphisms. Moreover, we classified girls with idiopathic precocious puberty into obese (BMISDS >2) and non-obese (BMISDS <2) at diagnosis. We found that there was no significant correlation between BMI at diagnosis and the presence of either *XbaI* or *PvuII* polymorphism of the *ERa* gene. Age at menarche of the control group was not significantly influenced by the presence of either *XbaI* (SD:1.2) ($p=0.8$) or *PvuII* polymorphism (SD:0.6) ($p=0.97$).

CONCLUSIONS. Our data show that the studied single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *ERa*, namely *XbaI* and *PvuII*, are not related to idiopathic precocious puberty in girls. However, in girls that present idiopathic precocious puberty, the presence of homozygosity for *XbaI* polymorphism (xx) and to a lesser extend to *PvuII* polymorphism (pp) results in onset of puberty at a significantly earlier age than those

that are heterozygous or do not carry any of these polymorphisms. This effect is amplified in the few girls that are homozygous for both SNPs. These girls have onset of puberty at an even earlier age than those that are homozygous for only one polymorphism, either xx or pp. This suggests a synergistic action of both polymorphisms in the onset of puberty, which can be interpreted by the high linkage disequilibrium between the two polymorphisms, which are located at the same intronic site. The most probable underlying mechanism is that these two polymorphisms upregulate estrogen- dependent expression of *kisspeptin* gene and consequently facilitate kisspeptin – GRP54- GnRH mediated signaling. The fact that the young women in the control group do not present earlier pubertal onset may be explained by the commonly observed growth pattern of constitutional advancement of growth (CAG) and the elevated IGF1 levels in girls with idiopathic precocious puberty compared to girls with normal pubertal onset. The latter do not present the growth pattern of CAG and they also have IGF1 levels within normal range. IGF1 promotes proliferation of the hypothalamic neurons and its action is mediated through estrogen receptor α . Early puberty might be triggered by elevated IGF1 levels. We speculate that in girls with idiopathic precocious puberty, *ERA* polymorphisms especially the xx genotype, on the ground of elevated IGF1 levels, activate the kisspeptin- GRP54- GnRH circuit significantly earlier than in girls that do not carry these polymorphisms.