

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. Σ. ΣΜΠΥΡΑΚΙΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΟΥ, ΑΘΗΝΑ

ΤΜΗΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΛΛΩΝ (Διευθύντρια κ. Ε. Βοσκάκη)

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ (Διευθύντρια κ. Κ.
Σούλη)

**Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ ΦΑΙΝΥΛΚΕΤΟΝΟΥΡΙΑ**

ΑΜΠΙΑΣ Α. ΑΛ-ΚΑΝΤΡΕ, ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1998

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΜΠΙΑΣ Α. ΑΛ-ΚΑΝΤΡΕ (Abbas A. Al-Qadreh)

Ημερομηνία & Τόπος Γέννησης : 15 Απριλίου 1956, Ιορδανία
 Διεύθυνση : Ξενίας 18, 11528 Αθήνα
 Τηλέφωνο : 7707307, 094.384506
 e-mail : alqadreh@otenet.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

1974 : Απολυτήριο γυμνασίου στην Ιορδανία.
 10/75-6/81 : Σπουδές στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.
 3/82-10/82 : Ειδίκευση στην Ακτινοδιαγνωστική, Νοσηλευτικό Ίδρυμα Εκκλησίας Ελλάδας
 10/82-4/83 : Ειδίκευση στην Ακτινολογία, Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία».
 7/83-7/87 : Ειδίκευση στην Παιδιατρική στην Α' Παιδιατρική Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων "Π & Α Κυριακού".
 9/87 : Τίτλος ειδικότητας Παιδιατρικής.
 9/88-6/92 : Παιδίατρος στο Τμήμα Μεταβολικών Νοσημάτων, Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού.
 Από 10/87 : Παιδίατρος στο Ιατρικό Κέντρο Αθηνών.
 Από 1/7/92 : Επιστημονικός συνεργάτης του Διαβητολογικού Κέντρου της Παιδιατρικής Κλινικής του Τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων "Π & Α Κυριακού".

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

1987 : Ελληνική Παιδιατρική Εταιρεία
 1988 : Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία
 1989 : Ελληνική Εταιρεία Μεταβολισμού Μετάλλων
 1992 : International Society of Pediatric & Adolescent Diabetes (ISPAD).

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- IVth International Clinical Genetics Seminar on "Endocrine Disorders & Growth", Athens, May 1985.
- Vth International Clinical Genetics Seminar on Kidney and Neuromuscular disorders, Crete, October 1988.
- VIth International Clinical Genetics Seminar on "Hematologic Disorders", Corfu, May 1990.
- 4th ISPAD (International Society for Pediatric and Adolescent

Diabetes) Course, «Theoretical and practical aspects of the treatment of diabetic children», Dolmeti-Italy, 20-27/3/1993.

- 5th ISPAD Course" Theoretical and practical aspects of the treatment of diabetic children", Sesto-Italy, 10-18/3/1995.
- The First ISPAD Workshop on IDDM in Children and Adolescents. Amman - Jordan, October 26-29, 1997.

ΒΡΑΒΕΙΑ

Χωρέμιο Έπαθλο (1989) για την εργασία με θέμα «Η επίδραση της υδροχλωροθειαζίδης στην νεφρικού τύπου υπερασβεστουρία σε παιδιά με νεφρολιθίαση». Ειρήνη Βοσκάκη, Α. Αλ-Καντρέ, Χ. Μεγγρέλη, Σ. Συμπυράκις.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Χ. Μπαρτσόκας, Α. Δάκου, Δ. Δαμιανάκη, Α. Αλ-Καντρέ, Χ. Καραγιάννη και άλλοι. "Συχνότητα του ινσουλινοεξαρτώμενου ΣΔ στην Αθήνα. *Materia Medica Greca*, 19:3. 240-251, 1991.
2. Α. Αλ-Καντρέ, Ε. Βοσκάκη, Δ. Δελής, Β. Αναστασιάδου, Κ. Κασσιού, Χ.Μπαρτσόκας. "Η οστεοπενία στα παιδιά με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. *Οστούν*, τόμος 2:2, 119-123, 1991.
3. Ε. Βοσκάκη, Α. Αλ-Καντρέ, Π. Αντωνοπούλου, Ε. Αθανασοπούλου, Κ. Βρειτός, Σ. Συμπυράκις. "Παιδική νεφρολιθίαση: Παθογένεια και κλινική προβολή της νόσου". *Ιατρική* :65, 166-170, 1994.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Voskaki I, Al-Qadreh A, Mengreli C, and Sbyrakis S: The Effect of Hydrochlorothiazide on renal Hypercalciuria. *Child Nephrol Urology* 12:6-9, 1992
2. Al-Qadreh A, Athanasopoulou E, Voskaki I: Inhibitors of stone formation in hypercalciuric children with and without stone disease. *European Urology* 21:227-230, 1992
3. M Karagiorga, A Chatziliami, A Katsantoni, J Iousef, A Al-Qadreh: Secondary Diabetes Mellitus in Thalassemic Patients. S. And et al (Eds), *Endocrine Disorders in Thalassemia*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 161-165, 1995.
4. A Al-Qadreh, K Kassiou, I Voskaki, E Athanasopoulou, E Sarafidou, CS Bartsocas: "Treatment of osteopenia in children with insulin-dependent diabetes mellitus: The effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃. *Eur J of Paediatrics*, 155:15-17, 1996.
5. C Bartsocas, C Dakou-Vouterakis, D Damiannaki, A Al-Qadreh et

- al (for the EURODIAB ACE G1 Group): Epidemiology of childhood IDDM in Athens: trends in incidence for the years 1989-1995, "Letter to the editor". *Diabetologia* (1998) 41: 245-246.
6. A Al-Qadreh, KH Sculpis, H Athanasopoulou, C Mengreli, A Skarpalezou, I Voskaki: Bone mineral status in children with phenylketonuria under treatment. *Acta Paediatr [In press]*.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- κ. Σ. Σμπυράκης,
Καθηγητής
- κ. Δ. Εμμανουήλ,
Καθηγητής
- κ. Μ. Καλμαντή,
Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	1
1. Ο ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ	1
1.1 Οστικά Κύτταρα	1
1.1.α. Οι οστεοκλάστες	2
1.1.β. Οι οστεοβλάστες	2
1.1.γ. Τα οστεοκύτταρα	3
1.2 ΜΕΣΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΟΥΣΙΑ	4
1.2.α. Κολλαγόνο	4
1.2.β. Ανόργανα στοιχεία	4
1.3 Η Οστική ανακατασκευή	5
2. Ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	8
2.1 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών του ορού και των ούρων	8
2.2 Ακτινολογικός έλεγχος του σκελετού	9
2.3. Μέτρηση της οστικής πυκνότητας	10
2.3.α. Απλή απορρόφηση φωτονίων (SPA)	10
2.3.β. Διπλή γ-φωτονιακή δέσμη (DPA)	10
2.3.γ. Μέτρηση οστικής μάζας με ακτίνες ενέργειας	X διπλής
2.3.δ. Ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (QCT)	11
2.4 Ιστολογική μελέτη "Βιοψία οστού"	12
2.5 Κορυφαία οστική μάζα (PBM)	12

3. ΚΛΑΣΙΚΗ ΦΑΙΝΥΛΚΕΤΟΝΟΥΡΙΑ	13	
3.1 Εξέλιξη	13	
3.2 Κλινικές εκδηλώσεις		14
3.3 Διάγνωση	15	
3.4 Συχνότητα	17	
3.6 Γενετική	17	
3.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση		18

	Σελίδα
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ «ΦΑΙΝΥΛΚΕΤΟΝΟΥΡΙΑ ΚΑΙ ΟΣΤΑ»	20
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	42
SUMMARY	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εφαρμογή των προγραμμάτων ανίχνευσης της φαινυλκετονουρίας (PKU) στην νεογνική ηλικία [Guthrie & Susi 1963, Jinks et al 1985] έδωσε την δυνατότητα για την έγκαιρη έναρξη θεραπείας με δίαιτα φτωχή σε φαινυλαλανίνη (Phe), με αποτέλεσμα την πρόληψη της νοητικής καθυστέρησης που συνδυάζεται με αυτή την νόσο [Flannery 1983, Koch 1984]. Η δίαιτα συνίσταται στην μερική ή ολική αντικατάσταση των φυσικών πρωτεϊνών διατροφής με συνθετικά προϊόντα χαμηλής περιεκτικότητας σε Phe και προσθήκη των απαιτούμενων βιταμινών και ιχνοστοιχείων [MacCabe et al 1987]. Για όλους τους διατροφικούς χειρισμούς είναι πολύ σημαντικό, η διαιτητική θεραπεία υποκατάστασης να είναι τέτοια που να εξασφαλίζει φυσιολογική σωματική και διανοητική ανάπτυξη, με την προϋπόθεση οι ασθενείς να ελέγχονται για μακροπρόθεσμες επιπλοκές [Kock 1987, Thompson et al 1990].

Γενικά τα περισσότερα παιδιά με PKU σε δίαιτα πτωχή σε Phe μπορούν να έχουν φυσιολογική αύξηση και δεδομένης της βελτίωσης της νοητικής τους ανάπτυξης, οι ασθενείς σήμερα προτρέπονται να συνεχίζουν την δίαιτα για όλη τους τη ζωή [Koch et al 1996, Endres 1998].

Οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές της φτωχής σε Phe δίαιτας είναι ασυνήθεις, αλλά κάποια ανησυχία προκαλεί η διαπίστωση οστικών αλλοιώσεων και οστεοπενίας σε μερικούς από τους ασθενείς. Αρχικά, αυτά τα προβλήματα διαπιστώθηκαν ακτινολογικά [Feinberg 1962, Fisch 1966] και στη συνέχεια με την αξονική τομογραφία [Carson 1990] ή με απλή απορρόφηση φωτονίων (SPA) της κερκίδας [McMurry 1992].

Εν τούτοις, η σημασία αυτών των παρατηρήσεων δεν ήταν τεκμηριωμένη, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών και των διαφορών που προέκυψαν στις προηγούμενες μελέτες. Επιπλέον, υπήρχαν αντίθετες απόψεις όσον αφορά την συσχέτιση των οστικών αλλοιώσεων με τη δίαιτα, διότι οι Kindt et al 1987 υποστήριξαν ότι γι' αυτές ευθύνεται η οριακή πρόσληψη πρωτεϊνών, ενώ οι McMurry και συνεργάτες υπέθεσαν ότι οφείλεται στη μη συμμόρφωση στη διαιτητική αγωγή.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο Τμήμα Μεταβολισμού Μετάλλων στο Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού (ΙΥΠ), (1988-1992) είχαν δημιουργηθεί πολλές απορίες για τα οστικά προβλήματα σε παιδιά με χρόνια νοσήματα και τη δυνατότητα πρόληψης ή θεραπευτικής παρέμβασης.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η κατάσταση των οστών σε παιδιά με PKU υπό θεραπεία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Η μελέτη αφορούσε ασθενείς που παρακολουθούνται στο ΙΥΠ στο Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία», Αθήνα. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί από το ανιχνευτικό πρόγραμμα νεογνών και είχαν αρχίσει την διαιτητική αγωγή στη νεογνική ηλικία.

Η μελέτη προεγκρίθηκε από την Επιστημονική και την Δεοντολογική Επιτροπή του ΙΥΠ. Επίσης ενημερώθηκαν τα παιδιά και οι γονείς τους για τους στόχους της μελέτης και συμφώνησαν για την συμμετοχή.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε από κοινού στο Τμήμα Μεταβολισμού Μετάλλων (ΤΜΜ) και τη Διεύθυνση Ενδογενών Μεταβολικών Νοσημάτων του ΙΥΠ.

Στο σεβαστό καθηγητή Παιδιατρικής κ. Στέλιο Σμπυράκη θα ήθελα να εκφράσω την μεγάλη μου ευγνωμοσύνη για την ουσιαστική συμπαράστασή και τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και στα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητή κ. Δ. Εμμανουήλ και καθηγήτρια κ. Μ. Καλμαντή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη διευθύντρια του ΤΜΜ κ. Ειρήνη Βοσκάκη και στη διευθύντρια του Τμήματος Ενδογενών Μεταβολικών Νοσημάτων κ. Κλεοπάτρα Σούλη για την σημαντική συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Ε. Αθανασοπούλου, Ν. Τσαουσιδου, Κ. Γεωργακοπούλου για την πολύτιμη συνεργασία τους.

Τέλος ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του ΙΥΠ για την καλή τους συνεργασία και τις κυρίες Χ. Μεγγρέλη, Α. Σκαρπαλέζου και Έμμη Σαραφίδου για την βοήθειά τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

1. Ο ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ

Μακροσκοπικά διακρίνονται δύο τύποι οστών, τα σπογγώδη (δοκιδώδη) και τα φλοιώδη (συμπαγή) οστά. Τα σπογγώδη βρίσκονται στις μεταφύσεις των μακρών οστών, στους σπονδύλους και στα πλατειά οστά. Τα φλοιώδη βρίσκονται στις διαφύσεις των μακρών οστών και αποτελούν το 80% του σκελετού. Παρ' όλο ότι τα σπογγώδη οστά αποτελούν μόλις το 20% του σκελετού, η επιφάνεια τους και η μεταβολική τους δραστηριότητα είναι πολύ μεγαλύτερη των φλοιωδών οστών [Gormack 1987].

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από τα οστικά κύτταρα και τη μεσοκυττάρια ουσία που τα περιβάλλει. Το οργανικό μέρος αποτελεί το 35% του οστού και περιλαμβάνει τα κύτταρα, τις ίνες του κολλαγόνου και την θεμέλια ουσία ενώ το ανόργανο αποτελεί το 65% και περιλαμβάνει κυρίως άλατα ασβεστίου με φωσφόρο (υδροξυαπατίτη) και άνθρακα (ανθρακικό ασβεστίου) καθώς και άλατα μαγνησίου. Η συνηθέστερη μορφή κρυστάλλου υδροξυαπατίτη είναι η $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ και η σχέση Ca/P είναι 1,67.

1.1 Οστικά Κύτταρα

Υπάρχουν τέσσερες τύποι κυττάρων: Οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες, τα οστεοκύτταρα και τα επενδυτικά κύτταρα. Δύο από αυτά, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες ενέχονται ιδιαίτερα στην ανακατασκευή του οστού, ενώ ο βασικός προορισμός των οστεοκυττάρων και των επενδυτικών κυττάρων είναι μεταβολικός, δηλαδή η διατροφή του οστού και η διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου [Rosselot et al 1996]. Τα κύτταρα συνεργάζονται μεταξύ τους με αρμονία. Το φαινόμενο αυτό της αρμονικής συνεργασίας ονομάζεται φαινόμενο σύζευξης (coupling phenomenon). Τα οστικά κύτταρα είναι πολύ δραστήρια και κινούνται μέσα σε ένα συγκεκριμένο χώρο, που αποτελεί την μεταβολική μονάδα του οστού. Κάθε μεταβολική μονάδα είναι αυτόνομη και περιβάλλεται από μεμβράνη. Η ανταλλαγή ιόντων, βιταμινών και ορμονών γίνεται από πόρους που υπάρχουν

μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων της μεμβράνης [Malluch 1986, Martin et al 1988, Rosselot et al 1996].

1.1.α Οι οστεοκλάστες

Είναι πολύ μεγάλα ευκίνητα κύτταρα με πολλούς πυρήνες (5-60), προέρχονται από τον μυελό των οστών από μακροφάγα κύτταρα. Εμφανίζονται συνήθως στην επιφάνεια του οστού που υφίσταται διάβρωση και απορρόφηση, στην οποία δημιουργούν κοιλώματα γνωστά σαν κοιλότητες του Howship. Παρουσιάζονται στις ενεργείς επιφάνειες απορρόφησης των σπογγωδών οστών (cutting cone) και περιέχουν σημαντική ποσότητα από λυσοσωμιακά και μιτοχονδριακά ένζυμα. Η επιφάνεια της οστεοκλάστης που απορροφά αποτελείται από ευκίνητα συμπλέγματα κυτταρικής μεμβράνης, που σχηματίζει μια κροσσωτή επιφάνεια. Έτσι αυξάνεται η δραστική επιφάνεια του κυττάρου [Martin et al 1988, Yamamoto et al 1995].

Οι οστεοκλάστες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου στον οργανισμό, αυξάνουν σε αριθμό και δραστηριότητα με την επίδραση της παραθορμόνης (PTH) και της 1,25-(OH)₂-βιταμίνης D ενώ η δραστηριότητα και ο αριθμός τους ελαττώνεται από την καλσιτονίνη. Στην επιφάνεια των οστεοκλαστών υπάρχουν υποδοχείς για διάφορες ορμόνες, ιδιαίτερα της καλσιτονίνης. Οι βιοχημικοί δείκτες αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα όξινης φωσφατάσης στο πλάσμα και υδροξυπρολίνης ούρων, που είναι προϊόν αποδόμησης του κολλαγόνου [Bordier 1973, Eastoe J.E. 1984, Zimolo et al 1995, Yamamoto et al 1995, Schepetkin 1997].

1.1.β Οι οστεοβλάστες

Είναι μικρά μονοπύρηννα κύτταρα που προέρχονται από διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά κύτταρα. Πιστεύεται ότι προέρχονται είτε από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών είτε από τα πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού. Δεν διαιρούνται, έχουν κυβοειδές σχήμα, διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο για να συνθέτουν την ζώνη του

οστεοειδούς. Εμφανίζουν αποφυάδες με τις οποίες συνδέονται με τους γειτονικούς οστεοβλάστες και τα υποκείμενα οστεοκύτταρα [Martin 1988].

Ο κύριος ρόλος των οστεοβλαστών είναι η σύνθεση και έκκριση των μακρομοριακών οργανικών συστατικών της θεμέλιας ουσίας που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο και γλυκοπρωτεΐνες [Bord et al 1996]. Ο δεύτερος ρόλος τους είναι η συμμετοχή στη διαδικασία εμφάνισης των πυρήνων μετάλλωσης όπου βοηθούν στη μετακίνηση ιόντων μεταξύ του εξωκυτταρίου χώρου και της επιφάνειας των οστών [Martin et al 1988, Rosselot et al 1996, Kronenberg 1997].

Όταν το οστόν ευρίσκεται σε στατική κατάσταση τα κύτταρα λεπταίνουν. Οι οστεοβλάστες εγκλωβίζονται στο ώριμο οστόν, αλλάζουν σχήμα και γίνονται οστεοκύτταρα. Άλλα προϊόντα τους είναι η αλκαλική φωσφατάση, η οστεονεκτίνη που πιθανώς συνδέει το ασβέστιο με το κολλαγόνο και η οστεοκαλσίνη (Gla protein) [Kruse K. 1989, Schanau 1997].

1.1.γ Τα οστεοκύτταρα

Αντιπροσωπεύουν το 95% των κυττάρων των οστών. Ο ρόλος των οστεοκυττάρων είναι η συντήρηση της θεμέλιας ουσίας του οστού, με την παραγωγή μικρών ποσοτήτων θεμέλιας ουσίας και η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από την θεμέλια ουσία όταν αυτό απαιτείται. Βρίσκονται σε κοιλότητες μέσα στη θεμέλια ουσία, έχουν ωοειδές σχήμα και αναπτύσσουν προσεκβολές που γεμίζουν τις κοιλότητες όπου γίνεται η επικοινωνία με τα άλλα οστεοκύτταρα και οστεοβλάστες της ίδιας οστικής μονάδας. Μικρό ποσοστό των οστεοκυττάρων, που κυμαίνεται στο 1-3%, εκκρίνουν οστεολυτικά ένζυμα και απορροφούν αρκετή ποσότητα αποτιτανωμένης θεμέλιας ουσίας (περιοστεολυτική οστεόλυση). Η διαδικασία αυτή προάγεται από μικρή αύξηση της παραθορμόνης και αναστέλλεται από τη θυρεοκαλσιτονίνη [Bordier 1973, Tenenbaum 1982, Schanau 1997].

Η καταστροφή των οστεοκυττάρων ακολουθείται από απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας. Αυτό δείχνει ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της θεμέλιας ουσίας [Eastoe 1984, Martin et al 1988, Rosselot et al 1996].

1.2 ΜΕΣΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΟΥΣΙΑ

Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από την θεμέλια ουσία και τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Η θεμέλια ουσία αποτελείται από κολλαγονικές και μη κολλαγονικές πρωτεΐνες. Η μη κολλαγονικές πρωτεΐνες είναι πρωτεϊνικοί πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες και λιπίδια [Λυρίτης 1991, Rosselot 1996].

1.2.α Κολλαγόνο

Το 95% της θεμέλιας ουσίας αποτελείται από το ασύμμετρο πρωτεϊνικό κολλαγόνο. Σχηματίζεται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που η κάθε μία αποτελείται από αλληλοδιαδοχή τριών κυρίως αμινοξέων: γλυκίνης, προλίνης ή υδροξυπρολίνης και λυσίνης. Οι αλυσίδες του κολλαγόνου ονομάζονται α-αλυσίδες και έχουν μοναδική αλληλοδιαδοχή αμινοξέων. Έτσι τα αμινοξέα που υπάρχουν στη τριάδα (γλυκίνη, προλίνη ή υδροξυπρολίνη και λυσίνη) καθορίζουν τη δομή και λειτουργία του μορίου του κολλαγόνου.

1.2.β Ανόργανα στοιχεία

Τα οστά, εκτός από την μηχανική υποστήριξη του σώματος, την προστασία ζωτικών οργάνων και την αιμοποίηση, αποτελούν μεγάλη αποθήκη ασβεστίου, φωσφόρου και άλλων ιόντων. Περίπου το 99% του ολικού Ca και το 85% του φωσφόρου του οργανισμού βρίσκεται στο σκελετό σε μορφή υδροξυαπατίτη. Μόνον το 1% του Ca βρίσκεται στο ενδο- και εξωκυττάριο υγρό, και έχει ζωτική σημασία για την ρύθμιση πολλών βιοχημικών αντιδράσεων, την πήξη του αίματος, τις ενδοκρινείς εκκρίσεις και μερικές λειτουργίες ενζύμων [Gormack 1987, Bronner 1998, Weaver 1998].

Η συγκέντρωση του Ca στο πλάσμα δεν μεταβάλλεται με την ηλικία και κυμαίνεται μεταξύ (8.8-10.4 mg/dl ή 2.2-2.6 mmol). Το Ca του ορού αποτελείται από τρία κλάσματα: ιονισμένο (iCa) (περίπου 50%), συνδεδεμένο με λευκωματίνη (περίπου 40%) και σύμπλοκα με κιτρικά, φωσφορικά άλατα και άλλες ενώσεις στον ορό (περίπου 10%). Η βιολογική δράση του Ca ασκείται κυρίως από iCa, που υπόκειται σε ρύθμιση. Επειδή το ολικό Ca του ορού περιλαμβάνει και το κλάσμα που είναι συνδεδεμένο με λευκωματίνη, τα περισσότερα εργαστήρια διορθώνουν τις τιμές του ολικού Ca ανάλογα με την ποσότητα

λευκωματίνης. Το ενδοκυττάριο Ca είναι σημαντικό για πολλές κυτταρικές λειτουργίες, αλλά επειδή η συγκέντρωση του Ca μέσα στο κύτταρο διατηρείται σε ποσότητες μικρότερες από αυτές του εξωκυτταρίου υγρού, ελάχιστα συμβάλει στον γενικότερο μεταβολισμό του Ca στο σώμα [Bronner 1998].

Πολλές λειτουργίες του κυττάρου εξαρτώνται από τον οργανικό και ανόργανο φώσφορο (P). Οι τιμές του ανόργανου P του ορού έχουν ευρεία διακύμανση ανάλογα με την ηλικία, στα βρέφη από 4-9 mg/dl ή 1.3-2.3 mmol και ελαττώνονται στα επίπεδα ενηλίκων (2.5-4.6 mg/dl ή 0.8-1.5 mmol) μετά την εφηβεία [Thalassinos et al 1970, Bistrakis et al 1986, Kruse 1989].

1.3 Η ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ

Στη διάρκεια της ζωής, όλα τα οστά παρουσιάζουν ένα συνεχή κύκλο σχηματισμού και απορρόφησης και μάλιστα σε μεταβαλλόμενους ρυθμούς. Στο συμπαγές οστό η μεταβολή αυτή γίνεται πιο αργά από ότι στο σπογγώδες. Η εναλλαγή αυτή επιτρέπει την διόρθωση των σκελετικών μικροκακώσεων, ενώ αποτελεί ταυτόχρονα μηχανισμό ελευθέρωσης ασβεστίου στην κυκλοφορία για να εξυπηρετηθούν οι ομοιοστατικές απαιτήσεις. Στην ανακατασκευή, ομάδες καλά διαφοροποιημένες οστικών κυττάρων, οι μονάδες ανακατασκευής, συνδυάζουν την απορρόφηση μικροσκοπικών οστικών ποσοτήτων και την επακόλουθη επανόρθωση των απορροφητικών ελλειμμάτων [Kruse 1989, Kronenberg 1997, Weaver 1998].

Πολλοί παράγοντες, συστηματικοί και τοπικοί, επηρεάζουν την παραγωγή ή και την απορρόφηση του οστού με άμεση ή έμμεση δράση [Raisz 1988, Martin 1989, Kallervo 1991]. Οι ορμονικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των οστών φαίνονται στον πίνακα 1.

Τα ικανοποιητικά επίπεδα του iCa και του ελεύθερου P έχουν μεγάλη σημασία για την μετάλλωση των οστών. Η ρύθμιση της ομοιοστασίας του Ca και του P είναι αποτέλεσμα πολύπλοκου συστήματος που περιλαμβάνει τρεις δέκτες (οστά, έντερο, νεφρούς) και τρεις ορμόνες: την βιταμίνη D (1,25-βιταμίνη D), την παραθορμόνη (PTH) και την καλσιτονίνη

[Broadus 1981, Tiegs et al 1985, Hurely et al 1987, Shepetkin 1997].

Η PTH είναι ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 82 αμινοξέα με μοριακό βάρος 9500. Η ανθρώπινη PTH προσδιορίστηκε από τον Keutmann (1978). Στον άνθρωπο, το γονίδιο της PTH ευρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 κοντά στο γονίδιο της ινσουλίνης [Antonarakis et al. 1983]. Η PTH μεταβολίζεται στο ήπαρ, στους νεφρούς, πιθανόν στα οστά και στους ίδιους τους παραθυροειδείς αδένες [McSheehy και συν 1986].

Η PTH εκκρίνεται από τους παραθυροειδείς αδένες και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του Ca στο πλάσμα. Αυξάνει την οστεόλυση και την επαναρρόφηση του Ca από τα νεφρικά σωληνάκια και ευνοεί την απορρόφηση του Ca από το εντερικό τοίχωμα, διεγείροντας την σύνθεση της 1,25-(OH)₂ βιταμίνης D. Η έκκριση της PTH ρυθμίζεται από το επίπεδα του ιονισμένου ασβεστίου του πλάσματος [Kruse 1989].

Η βιταμίνη-D συντίθεται στο δέρμα με την δράση του ηλιακού φωτός στην 7-δωδροχολεστερόλη. Ο ορμονικός μεταβολίτης της βιταμίνης D είναι η 1,25-(OH)₂ βιταμίνη D, που συντίθεται κυρίως στους νεφρούς. Η σύνθεση της 1,25-(OH)₂ βιταμίνης D προάγεται από την PTH. Η 1,25-(OH)₂ βιταμίνη D αυξάνει την απορρόφηση του Ca από το έντερο και βοηθά στη διατήρηση του Ca του πλάσματος σε φυσιολογικά επίπεδα καθώς και στη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών [Holick 1989, Collins et al 1998].

Πίνακας 1
 Ορμόνες που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των οστών*

	Παραγωγή οστού	Απορρόφηση**
ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΟ ΑΣΒΕΣΤΙΟ		
• Παραθορμόνη	±	+
• 1,25-διυδροξυβιταμίνη D	+	+
• Καλσιτονίνη	±	-
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ		
• Γλυκοκορτικοειδή	-	±
• Ινσουλίνη	+	
• Θυροξίνη	+	+
• Ανδρογόνα/Οιστρογόνα	+	-
• Αυξητική ορμόνη	+	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (GROWTH FACTORS)		
• Σωματομεδίνες	+	
• Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας	-	
• Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας	+	+
• Επιδερμοειδής παράγων	-	+
ΤΟΠΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ		
• Πρσταγλανδίνες	±	+
• Ενεργοποιητής οστεοβλαστών (Osteoclast-activating factor)	-	+
• Οστεοπαράγοντας αυξητικός (Bone-derived growth factor)	+	

* [Reisz 1988, Martin 1989, Kalevro 1991, Ledger et al 1995, Kronenberg 1997, Collins et al 1998]

** Παραγωγή ή απορρόφηση οστού

Η Καλσιτονίνη είναι ένα πεπτίδιο με 32 αμινοξέα που παράγεται στα κύτταρα C του θυρεοειδούς αδένου [Austin 1981]. Οι καλύτερα μελετημένες δράσεις της ορμόνης είναι η αναστολή της υπερασβεσταιμίας και η αναστολή της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και συνεπώς της οστικής απορρόφησης. Είναι γνωστό ότι η καλσιτονίνη εμποδίζει τις διεγερτικές δράσεις της PTH και άλλων παραγόντων της οστικής απορρόφησης [Austin 1981, Tieggs 1985, Hurely 1987, Kronenberg 1997, Schepetkin 1997].

2. Ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

- 2.1 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών του ορού και των ούρων
- 2.2 Ακτινολογικό έλεγχο του σκελετού
- 2.3 Μέτρηση της οστικής πυκνότητας
- 2.4 Ιστολογική μελέτη "Βιοψία οστού"

2.1 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών του ορού και των ούρων

Στη κλινική πράξη, η αναδόμηση του οστού μπορεί να εκτιμηθεί με την μέτρηση τριών δεικτών που είναι η αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ), η οστεοκαλσίνη στον ορό και η υδροξυπρολίνη στα ούρα. Η ΑΦ παράγεται από διάφορες πηγές κυρίως τα οστά, το ήπαρ και το έντερο. Στα παιδιά προέρχεται κυρίως από τα οστά όπου παράγεται από τους οστεοβλάστες.

Η οστεοκαλσίνη, παράγεται όπως η ΑΦ από τους οστεοβλάστες υπό την επίδραση της 1,25-(OH)₂D₃. Βρίσκεται στον ορό σε πολύ μικρές ποσότητες. Μετράται με ραδιοανοσολογική μέθοδο RIA και είναι πολύ καλός δείκτης της παραγωγής του οστού με την προϋπόθεση ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D και η νεφρική λειτουργία είναι φυσιολογικά [Kruse et al 1986, Demas 1991, Ledger et al 1995, Garnero et al 1996].

Η υδροξυπρολίνη είναι ένα αμινοξύ που βρίσκεται αποκλειστικά στο μόριο του κολλαγόνου, το οποίο περισσότερο από 50% βρίσκεται στα οστά. Η υδροξυπρολίνη που παράγεται μετά από την αποδόμηση του οστού δεν μεταβολίζεται και αποβάλλεται στα ούρα, γι' αυτό θεωρείται καλός δείκτης για την αποδόμηση του οστού. Ο δείκτης

υδροξυπρολίνης/κρεατινίνης ούρων σε πρωινά ούρα μετά από 12ώρη νηστεία είναι χρήσιμος επειδή αποφεύγεται έτσι η επίδραση της διατροφής [Kruse 1989].

Τα επίπεδα της ΑΦ και Οστεοκαλσίνης ορού και ο δείκτης OH-Pr/Cr ούρων κυμαίνονται στα παιδιά ανάλογα με την ηλικία και τον ρυθμό αύξησης. Ο συνδυασμός μέτρησης όλων αυτών δίνει πληρέστερες πληροφορίες για την διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με οστικά προβλήματα.

2.2 Ακτινολογικός έλεγχος του σκελετού.

Μέχρι προ τίνων ετών, ο έλεγχος της οστικής πυκνότητας με μη επεμβατικές μεθόδους γινόταν αποκλειστικά με τεχνικές που βασίζονται στη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας. Οι αρχικές προσπάθειες στηρίχθηκαν στην ανάγνωση της απλής ακτινογραφίας. Η εκτίμηση της οστεοπενίας με ακτινογραφίες δεν είναι ασφαλής ούτε ευαίσθητη μέθοδος και απαιτεί σημαντική απώλεια οστού (30-50%) ώστε να φανεί μία οστεοπενική πάθηση. Τότε όμως οι ασθενείς έχουν συχνά υποστεί ήδη μικρά κατάγματα και η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι πολύ καθυστερημένη [Rensick et al 1992]. Όμως και σήμερα, πολλές φορές, συνεχίζει να αποτελεί την πρώτη οδό προσέγγισης της οστεοπόρωσης (εμφανής μείωση της οστικής μάζας, εύρεση οστεοπορωτικών καταγμάτων).

Στη συνέχεια έχουμε την χρήση των ακτινολογικών μορφομετρικών δεικτών σε συγκεκριμένα οστά (σπονδυλικής στήλης, αυχένα μηριαίου, δευτέρου μετακαρπίου). Αυτοί υπόκεινται στην υποκειμενικότητα του παρατηρητή και στις εκάστοτε συνθήκες λειτουργίας και χρήσης του ακτινολογικού εργαστηρίου, ώστε να αμφισβητείται η αξιοπιστία τους [Λυρίτης 1991, Smith 1991].

2.3 Μέτρηση της οστικής πυκνότητας: Η ποσοτική μέτρηση της περιεκτικότητας των οστών σε μέταλλα έχει πολλά πλεονεκτήματα. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι είναι οι εξής:

2.3.α Απλή απορρόφηση φωτονίων (Single Photon Absorptiometry - SPA)

Η χρησιμοποίηση των νεότερων μεθόδων μέτρησης της οστικής πυκνότητας αρχίζει το 1963 με τους Cameron και Savenson με τη χρήση SPA. Στην κλινική πράξη η μέθοδος εισήχθη γύρω στο 1970. Κατ' αυτή χρησιμοποιείται ραδιενεργός πηγή ιωδίου-125 (I^{125}) που εκπέμπει μονοχρωματική δέσμη φωτονίων. [Christiansen et al 1975, Chesney et al 1982]. Βασική περιοχή μέτρησης είναι το κάτω άκρο του αντιβραχίου. Η ακτινοδιαγνωστική αρχή της μέτρησης είναι η ίδια όπως και στις επόμενες μεθόδους, δηλαδή η εξασθένιση που υφίσταται η δέσμη φωτονίων ανάλογα με το πάχος και τη σύσταση του παρεμβαλλόμενου υλικού. Από την άλλη πλευρά της πηγής ειδικός ανιχνευτής μετρά την υφιστάμενη διαφορά. Οι σύγχρονες μέθοδοι είναι αναίμακτες και έχουν μικρό ποσοστό λάθους (1-3%). Πρέπει να σημειωθεί ότι για να αποφευχθούν προβλήματα στην μέτρηση λόγω συμπίεσης των μαλακών μορίων του άκρου, εμβαπτίζεται αυτό σε υδατόλουτρο γνωστού πάχους [Osterte & Gold 1991].

3.3.β Διπλή γ-φωτονιακή δέσμη (Dual Photon Absorptiometry, DPA)

Η μέθοδος άρχισε ουσιαστικά να λειτουργεί στην πράξη στις αρχές της δεκαετίας του 80. Σ' αυτήν χρησιμοποιείται πηγή Γαδολένιου-153 (Gd^{153}) που εκπέμπει μια δέσμη φωτονίων, η οποία απορροφάται κυρίως από τους μαλακούς ιστούς και άλλη μια που απορροφάται από το παρεμβαλλόμενο οστό. Έτσι ξεπεράστηκε το δεσμεικό υδατόλουτρο και μπόρεσαν πλέον να γίνουν μετρήσεις στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και στον αυχένα του μηριαίου. Θέσεις όπου η ανάπτυξη οστεοπορωτικού κατάγματος συναντάται συχνότερα στην καθημερινή κλινική πρακτική. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί πάλι η αναγκαία τακτική αντικατάσταση της ραδιενεργού πηγής λόγω μείωσης της ισχύος της [Glastre et al 1990, Osterte et al 1991].

3.3.γ Μέτρηση οστικής μάζας με ακτίνες X διπλής ενέργειας (DEXA)

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι μέτρησης της οστικής μάζας επειδή η ραδιενεργός πηγή που χρησιμοποιείται για το DPA αντικαταστάθηκε από πηγή

ακτίνων X διπλής ενέργειας. Όπως γίνεται με τη μέθοδο της διπλής απορρόφησης φωτονίων, η συσκευή αυτή καθορίζει την οστική πυκνότητα από μία προσθιοπίσθια εικόνα, δηλαδή σε δύο διαστάσεις. Ο μετρητής οστικής πυκνότητας με ακτινοβολία είναι ταχύτερος από τη μέτρηση με DPA και δίνει αποτελέσματα με καλή επαναληπτικότητα και ακρίβεια [Osterter & Gold 1991].

3.3.δ Ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (Quantitative Computed Tomography, QCT)

Μία άλλη μέθοδος για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας είναι η ποσοτική υπολογιστική τομογραφία. Η QCT αποτελεί τη μόνη μέθοδο που μετρά μόνο το σπογγώδες οστό των σπονδυλικών σωμάτων ή σε άλλα σημεία, ενώ αντίθετα με τη μέθοδο της διπλής απορρόφησης φωτονίων μετρά τόσο το σπογγώδες όσο και το φλοιώδες τμήμα των σπονδυλικών σωμάτων, του ισχίου ή όλου του σκελετού. Η ποσοτική υπολογιστική τομογραφία απλής ενέργειας έχει μικρό σφάλμα ακρίβειας (από 2-5%), ενώ το σφάλμα επαναληπτικότητας κυμαίνεται μεταξύ 5 και 20%. Επιπλέον, η δόση της ακτινοβολίας που προσδίδεται με αυτή τη μέθοδο είναι 100-300mRem, που ελαττώνει τον αριθμό των επιτρεπομένων επαναλαμβανομένων μετρήσεων [Carson et al 1991, Schwahn et al 1998].

Η διπλής ενέργειας QCT χρησιμοποιεί την ίδια αρχή με την DPA και την DEXA. Η διπλής ενέργειας QCT δίνει μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι η απλής ενέργειας QCT (2%). Η επαναληπτικότητα επίσης είναι πολύ καλύτερη (περίπου 10%). Η δόση της ακτινοβολίας που προσδίδει η διπλής ενέργειας QCT είναι 100-1000 mRem.

Για την εκτίμηση της οστικής μάζας χρησιμοποιούνται σήμερα επίσης άλλες νέες μέθοδοι. Τέτοιες είναι η ραδιογραμμομετρία των μετακαρπίων ή του ισχίου [Greeves et al 1995] και η τεχνική των υπερήχων. Οι μέθοδοι πάντως αυτές δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί και η εφαρμογή τους είναι στο πειραματικό στάδιο [Osterter & Gold 1991].

3.4 Ιστολογική μελέτη "Βιοψία οστού"

Η οστική βιοψία επιτρέπει ποσοτική και μορφολογική ανάλυση. Είναι δυνατόν να υπολογίζεται ο ρυθμός της παραγωγής ή της αναδόμησης του οστού. Οι ενδείξεις της

βιοψίας του οστού στα παιδιά είναι πολύ περιορισμένες, αν και η μέθοδος μπορεί να δώσει πληροφορίες εκεί που οι αναίμακτες μέθοδοι δεν δίνουν σαφείς απαντήσεις [Malluche 1986, Rosselot et al 1996, Hill 1998].

2.5 Κορυφαία οστική μάζα (Peak bone mass, PBM):

Είναι η μέγιστη οστική μάζα που επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της ζωής. Η αύξηση της μετάλλωσης των οστών στην παιδική ηλικία είναι γραμμική. Η μετάλλωση είναι μεγαλύτερη στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια στην ηλικία των 12 ετών, πιθανόν λόγω του ότι τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάλλωση των οστών [Glastre 1990]. Η επίτευξη της τελικής κορυφαίας οστικής μάζας στη ζωή ενός ατόμου εξαρτάται από κληρονομικούς παρόντες κατά 80% περίπου, και κατά 20% από άλλους παράγοντες όπως ορμονικοί, διατροφή, φυσική άσκηση και διάφορα νοσήματα στην περίοδο της ανάπτυξης [Hansen MA 1991, Teengarden et al 1995]. Συνεπώς, η επίτευξη σημαντικής αύξησης της PBM στην παιδική και εφηβική ηλικία πρέπει να μειώνει τον κίνδυνο της οστεοπόρωσης και καταγμάτων στους ενήλικες [Teengarden et al 1995, Molgaard et al 1998].

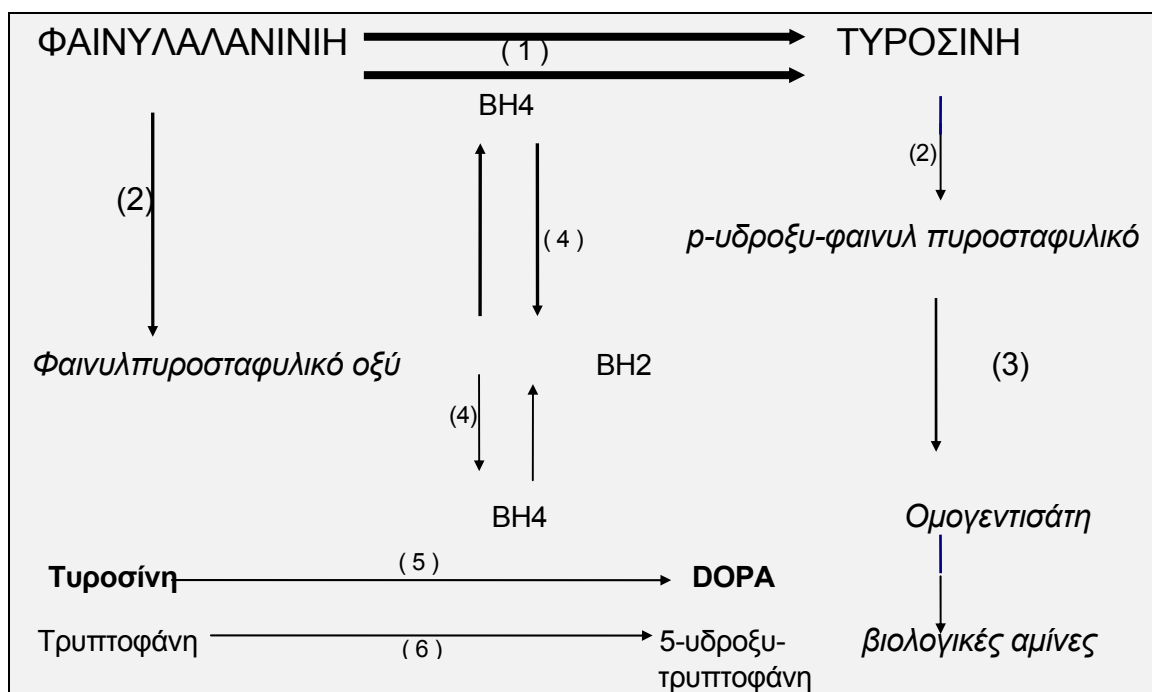
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

3. ΚΛΑΣΙΚΗ ΦΑΙΝΥΛΚΕΤΟΝΟΥΡΙΑ (PKU)

3.1 ΕΞΕΛΙΞΗ

Η PKU (McK 26160) είναι η πλέον μελετημένη ενδογενής μεταβολική νόσος. Περιγράφηκε αρχικά από τον Folling το 1934, ο οποίος μελέτησε δέκα παιδιά με ψυχοκινητική καθυστέρηση χωρίς άλλα παθολογικά ευρήματα που απέβαλαν μεγάλες ποσότητες φαινυλπυροσταφυλικού οξέος στα ούρα. Ο Jervis (1947), οι Undenfriend και συν. (1953) και ο Wallace (1957) απέδειξαν ότι η νόσος οφείλεται στην αδυναμία μετατροπής της φαινυλαλανίνης (Phe) σε τυροσίνη. Η Phe συσσωρεύεται στους ιστούς. Η υδροξυλίωση της Phe σε τυροσίνη είναι μια πολύπλοκη αντίδραση, όπου στη συνέχεια μετατρέπεται σε φαινυλπυροσταφυλικό οξύ και φαινυλγαλακτικό οξύ αλλά και άλλους μεταβολίτες και συμμετέχουν περισσότερα από ένα ενζυμικά συστήματα (σχ. 1).

Η κλασική PKU οφείλεται στην σχεδόν πλήρη ανεπάρκεια της υδροξυλάσης της Phe. Ανάλογα με την δραστικότητα του ενζύμου αναφέρονται η ήπια και η παροδική μορφή [Kaufman 1976, Levy 1987, Fusetti 1998]. Το ένζυμο αυτό ευρίσκεται κυρίως στο ήπαρ, δευτερευόντως στους νεφρούς και το πάγκρεας [Lane 1980]. Υπάρχουν άλλες σπανιότερες μορφές της νόσου (πίνακας 3), που αποτελούν το 2% των νεογνών με υπερφαινυλαλανιναιμία (HPE) και οφείλονται στην ανεπάρκεια της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH4) λόγω μη παραγωγής του συνενζύμου της, ή στην ανεπάρκεια της βιοσύνθεσης της (πιν. 1) [Kaufmann et al 1975, Danks 1978, Niederwieser et al 1982 & 1984, Curtius 1985, McKusick 1992].



Σχήμα 1 : Μεταβολικός δρόμος αποδόμησης της φαινυλαλανίνης και τυροσίνης.

(1) Φαινυλαλανίνη υδροξυλάση, (2) Τυροσίνη Τρανσαμινάση, (3) Ρ-υδροξυφαινυλπυροσταφυλικό οξειδάση, (4) Διϋδροβιοπτερίνη αναγωγή, (5) Τυροσίνη υδροξυλάση, (6) Τρυπτοφάνη υδροξυλάση BH2=Διϋδροβιοπτερίνη, BH4=Τετραϋδροβιοπτερίνη.

3.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Τα συμπτώματα της PKU (πίνακας 2) συνήθως δεν εμφανίζονται στην νεογνική περίοδο όπως συμβαίνει στις άλλες μεταβολικές διαταραχές των αμινοξέων, μπορεί όμως να εμφανισθούν εμετοί που συχνά συσχετίζονται με πυλωρική στένωση [O'Flynn 1980]. Η ιδιάζουσα οσμή, το επίμονο έκζεμα και κυρίως η ψυχοκινητική καθυστέρηση εμφανίζονται μετά τον 3ο-4ο μήνα και οδηγούν στην διάγνωση. Το 95% των χωρίς θεραπεία νεογνών χάνουν 50 βαθμούς του IQ στο πρώτο χρόνο ζωής. Σπασμοί βρεφικού τύπου παρατηρούνται στις σοβαρές μορφές της PKU στο 25% των ασθενών, συνήθως σε ηλικία μικρότερη των 18 μηνών [Partington 1961]. Φαινοτυπικά το χρώμα των ματιών και των

μαλλιών είναι ανοιχτότερο από τα υγιή μέλη των οικογενειών τους [Levy 1987]. Αυτό οφείλεται στην βλαπτική δράση της Phe στο ένζυμο τυροσινάση που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μελανίνης, καθώς επίσης στα μειωμένα επίπεδα τυροσίνης που είναι από τα κυριότερα εργαστηριακά ευρήματα της νόσου [Miymoto 1957, Swaiman 1984, Griffiths 1998].

Πίνακας 2: Οι κλινικές εκδηλώσεις της φαινυλκετονουρίας

Νευρικό σύστημα	<i>Νοητική καθυστέρηση Ευερεθιστότητα Αθετωσικές κινήσεις Σπασμοί</i>
Κεφαλή	<i>Μικροκεφαλία</i>
Δέρμα	<i>Ανοικτό χρώμα (σε σύγκριση με τα υγιή μέλη της οικογενείας) Ξηρό δέρμα Έκζεμα Σκληροδερμία Ξανθά μαλλιά ή ανοιχτότερα από τα υγιή μέλη της οικογενείας</i>
Γαστρεντερικό Σύστημα	<i>Εμετοί (εικόνα πυλωρικής στένωσης)</i>
Μάτια	<i>Ανοικτόχρωμα</i>
Διάφορα	<i>Χαρακτηριστική οσμή</i>

3.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Δέκα εκατομμύρια νεογνά σε όλο τον κόσμο ελέγχονται ετησίως με τα προληπτικά ανιχνευτικά προγράμματα (screening) [Guthrie 1963] με αποτέλεσμα την έγκαιρη εντόπιση και αντιμετώπιση της PKU και των άλλων διαταραχών στην προκλινική τους μορφή [Bickel 1981]. Το screening για PKU στην Ελλάδα γίνεται στο Ινστιτούτο Υγείας του

Παιδιού. Άρχισε το 1968 με την μελέτη 1363 ατόμων με νοητική καθυστέρηση οπότε βρέθηκαν 29 (1/47) με PKU. Το πρόγραμμα σήμερα καλύπτει περίπου 98% των νεογέννητων, ενώ ελέγχονται επίσης ο συγγενής υποθυρεοειδισμός και η έλλειψη της G6PD [Tsagaraki et al 1988].

Το Guthrie test είναι μια εύκολη και ευαίσθητη εξέταση για τον προσδιορισμό των επιπέδων Phe στο αίμα. Την 4η-6η ημέρα ζωής (2 ημέρες μετά από την διατροφή με λεύκωμα), μια σταγόνα από τριχοειδικό αίμα σε απορροφητικό χαρτί, αναλύεται με την μέθοδο βακτηριδιακής αναστολής (microbiologic inhibition, *Bacillus subtilis* ATCC 6051) [Guthrie 1963, Jinks 1985]. Σε όλα τα νεογνά που έχουν τιμή Phe >4mg/dl γίνεται περαιτέρω έλεγχος και παρακολούθηση [Σούλπη 1987, Missiou-Tsagaraki et al 1988].

Πίνακας 3: Η κατάταξη των υπερφαινωλαλανιναιμιών

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΚΛΑΣΙΚΗ PKU	ΑΤΥΠΕΣ ΜΟΡΦΕΣ
ΕΛΛΕΙΨΗ ENZYMOY	Φαινωλαλανίνη υδροξυλάση	ένζυμο του μεταβολισμού της BH ₄
ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	Διανοητική καθυστέρηση	νευρολογικές δυσλειτουργίες (μετά τον 5-8 μήνα της ζωής)
% ΕΜΦΑΝΙΣΗ	97 - 99,5 %	0,5 - 3 %
Phe ΑΙΜΑΤΟΣ	> 20 mg/dl	ποικίλει ανάλογα με την έλλειψη
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ	κυρίως Φαινυλπυροσταφυλικό	ανωμαλίες στους μεταβολίτες της BH ₄ και των νευροδιαβιβαστών
ΘΕΡΑΠΕΙΑ	δίαιτα με χαμηλή Phe	η δίαιτα σε χαμηλή Phe δεν αποδίδει

3.4 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Η συχνότητα της PKU ποικίλει στις διάφορες χώρες από 1:3.000 (Ιρλανδία) έως 1:60.000 (Ιαπωνία) [Bickel 1981, McKusick 1992]. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι η μέση συχνότητα της είναι 1:13.750 (πίνακας 4) [Σούλπη 1987, Missiou-Tsagaraki 1988, McKusick 1992].

Πίνακας 4 : Διακυμάνσεις της συχνότητας της PKU σε διάφορες χώρες

Αγγλία 1:12.000	Ελβετία 1:16.000
Αμερική 1:11.000	Ελλάδα 1:13.750
Αυστραλία 1:9.000	Ιρλανδία 1:3.000
Αυστρία 1:11.000	Ισραήλ 1:19.000
Βέλγιο 1:28.000	Ιαπωνία 1:60.000
Γαλλία 1:13.000	Καναδάς 1:15.000
Γερμανία 1:6.000	Σουηδία 1:38.000
Δανία 1:9.000	Φιλανδία 1:10.000

3.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η κλασική PKU μεταβιβάζεται με τον υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα, όπως και οι άλλες μορφές της υπερφαινυλαλανιναιμίας. Οι φορείς της νόσου υπολογίζονται στους λευκούς αμερικανούς σε 1:50. Όταν και οι δυο γονείς είναι φορείς, ο κίνδυνος να γεννηθεί παιδί με PKU είναι 25%. Ενώ στη περίπτωση που ο ένας γονιός είναι πάσχων και υπό θεραπεία για PKU η πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί με PKU είναι 1%, και 50% αν ο άλλος γονιός είναι φορέας της νόσου. Προγεννητική διάγνωση μπορεί να γίνει με ανάλυση DNA. Το υπεύθυνο γονίδιο για την ανεπάρκεια του ενζύμου υδροξυλάση της Phe έχει εντοπισθεί στο χρωματόσωμα 12 (12q) [Antonarakis 1982, Woo 1989, Okano et al 1991, McKusick 1992, Farrioux 1997]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η γονιδιακή θεραπεία της PKU μπορεί να γίνει στο άμεσο μέλλον όπως έχει δοκιμασθεί σε ποντίκια. Η

εισαγωγή του cDNA στο ηπατικό κύτταρο επιτεύχθηκε με την χρησιμοποίηση ενός αδενοϊού σαν ξενιστή με αποτέλεσμα η δραστηριότητα του ενζύμου PAH να αυξηθεί μέχρι 10-80% [Shedlovsky 1993, Eisensmith 1996].

3.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η μοναδική θεραπευτική αντιμετώπιση της κλασικής PKU είναι η "ειδική" πτωχή στο αμινοξύ Phe διαίτα, που για πρώτη φορά θεσπίστηκε από τον Bickel (1954) με άριστα αποτελέσματα στην ψυχοκινητική εξέλιξη των PKU παιδιών [Koch 1987, Levy 1987, Azen et al 1991].

Η ειδική διαίτα εφαρμόζεται με στόχο η τιμή της Phe στο αίμα να είναι <5mg/dl. Αυτό επιτυγχάνεται είτε δίδοντας συγκεκριμένη ποσότητα λευκώματος ώστε η Phe αίματος να είναι σε χαμηλά επίπεδα και να αναπτύσσονται οι ασθενείς αυτοί κανονικά, είτε, όταν αυτό δεν είναι δυνατόν, μέρος του απαιτούμενου λευκώματος αντικαθίσταται από "ειδικό" σκεύασμα σε σκόνη που περιέχει όλα τα άλλα απαραίτητα αμινοξέα εκτός από την Phe (π.χ. PKU-Milupa, Phenyldone A-M Nutricia κ.λ.π.) [Flannery 1983, McCabe 1987, British Guideline 1993].

Στην κλασική PKU το μεγαλύτερο μέρος του απαιτούμενου λευκώματος δίδεται στο μικρό ασθενή υπό μορφή της "ειδικής" σκόνης και ελάχιστο σαν φυσικό λεύκωμα. Οι θερμιδικές ανάγκες καλύπτονται από τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες και λίπη [Bickel 1954, Σούλπη 1987, British Guideline 1993, Griffiths 1998].

Μέχρι ποία ηλικία πρέπει να συνεχίζεται η ειδική διαίτα;

Φαίνεται ότι θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον μέχρι την ενηλικίωση [Endres 1998]. Μία μελέτη που περιλάμβανε 28 παιδιά που διέκοψαν την διαίτα σε ηλικία 8 ετών έδειξε ότι είχαν στατιστικά σημαντική μείωση του IQ σε σύγκριση με 27 παιδιά που την συνέχισαν [Koch et al 1984]. Πιο πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν αυτή την άποψη όπου οι ενήλικες που συνέχιζαν την διαιτητική αγωγή είχαν καλύτερο κοινωνικό και βιοτικό επίπεδο από άλλη ομάδα που την είχαν διακόψει [Thompson et al 1990, Koch et al 1996].

Άλλες μελέτες υπογραμμίζουν ότι η αυξημένη Phe (>15mg/dl) δρα τοξικά μέσω της μείωσης της σύνθεσης των νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνης και σεροτονίνης [Curtius 1981, Pratt 1982, Villasana et al 1989, Thomson et al 1990].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΦΑΙΝΥΛΚΕΤΟΝΟΥΡΙΑ ΚΑΙ ΟΣΤΑ

Για πολλά χρόνια η νοητική εξέλιξη των ασθενών με PKU ήταν το επίκεντρο εντατικής έρευνας για την αποτελεσματικότητα της διαιτητικής αγωγής [Koch et al 1984, Azen et al 1991], ενώ λίγες μελέτες αφορούσαν την κατάσταση των οστών.

Η μοναδική θεραπευτική αντιμετώπιση της κλασσικής PKU είναι η "ειδική" πτωχή στο αμινοξύ Phe δίαιτα με άριστα αποτελέσματα στην ψυχοκινητική εξέλιξη των παιδιών με PKU [Koch 1987, Levy 1987]. Η ειδική δίαιτα διαφέρει σημαντικά από την κανονική δίαιτα των φυσιολογικών παιδιών και ενηλίκων. Επειδή η Phe ευρίσκεται στις περισσότερες φυσικές τροφές, η δίαιτα των παιδιών με PKU είναι πολύ περιορισμένη σε ποσότητα και ποιότητα. Η εμπειρία περίπου 30 ετών στην διαιτητική θεραπεία της PKU επιτρέπει την φυσιολογική σωματική και νοητική ανάπτυξη των ατόμων με PKU [Flannery 1983, McCabe 1987].

Παλαιότερα, είχαν αναφερθεί οστικές αλλοιώσεις με παθολογικά ακτινολογικά ευρήματα σε ασθενείς με PKU. Αρχικά θεωρήθηκαν ως κλινικές εκδηλώσεις της νόσου [Feinberg et al 1962, Fisch 1966], και με την βελτίωση της θεραπείας (ειδικά σκευάσματα, κλπ), επιτεύχθηκε φυσιολογική ανάπτυξη των οστών [Sutherland 1966].

Ακτινολογικά ευρήματα οστικών αλλοιώσεων σε βρέφη με PKU υπό δίαιτα, όπως οστεοπόρωση και διαπλάτυνση των μεταφύσεων, αναφέρονται από τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της διαιτητικής αγωγής [Feinberg και Fisch 1962, Fisch et al 1966]. Σε μια αναδρομική μελέτη [Fisch et al 1991] βρέθηκαν οστικές αλλοιώσεις τύπου ραχίτιδας σε 56/73 (77%) των νεογνών με PKU πριν αρχίσουν δίαιτα. Τα ευρήματα δεν σχετίζονταν με τα επίπεδα της Phe της ίδιας ημέρας ούτε με την ηλικία. Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι οι αλλοιώσεις οφείλονται στα υψηλά επίπεδα Phe του ενδομητρίου κατά την διάρκεια της κύησης. Παρόμοιες εικόνες έχουν βρεθεί σε άλλες περιπτώσεις με αμινοξευρίες, όπως στην ομοκυστινουρία [Morreels et al 1968, Poznanski 1978] και τυροσινουρία [Morrison & Kerr 1989]. Αντίθετα, η Berry 1973 μελετώντας τις ακτινογραφίες παιδιών που άρχισαν

δίαιτα στη βρεφική ηλικία, δεν αναφέρει οστικές αλλοιώσεις, ενώ είχαν χαμηλό ανάστημα και η οστική τους πυκνότητα ήταν μειωμένη, ευρήματα που υπέθεσε ότι οφείλονταν στην χαμηλή πρόσληψη λευκωμάτων. Την ίδια άποψη είχαν και οι Woodring και συν (1981). Σε πρόσφατη μελέτη, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της οστεοπενίας και της χαμηλής πρόσληψης λευκωμάτων [Kindt et al 1987].

Ο McMurry και συν. 1992 μέτρησαν την περιεκτικότητα των οστών σε μέταλλα (BMC) με την μέθοδο της απλής απορρόφησης φωτονίων σε 26 παιδιά με PKU και την βρήκαν μειωμένη στους ασθενείς ηλικίας άνω των 8 ετών, ενώ ήταν φυσιολογική στην μικρότερη ηλικία. Η Phe βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα των μεγαλύτερων παιδιών. Η οστεοπενία πιθανόν να οφείλεται στην μη τήρηση της διαίτας. Επίσης ο Carson et al (1990) ανέφεραν σημαντική οστεοπενία, μετρώντας την οστική πυκνότητα στην σπονδυλική στήλη σε ασθενείς ηλικίας 19-34 ετών, που ακολουθούσαν την δίαιτα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η κατάσταση των οστών σε παιδιά με PKU υπό θεραπεία σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα. Επίσης θέλαμε να εκτιμήσουμε διάφορους βασικούς παράγοντες του μεταβολισμού των οστών στους ασθενείς με PKU. Η υπόθεσή μας ήταν ότι η μετάλλωση των οστών μπορεί να σχετίζεται με την διαιτητική πρόσληψη ή και την ίδια την νόσο.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη αφορά 48 παιδιά (20 αγόρια, 28 κορίτσια) με κλασική PKU, ηλικίας 2.5-17 ετών (8.8 ± 3.7) που είχαν διαγνωσθεί από το ανιχνευτικό πρόγραμμα νεογνών (screening) και είχαν αρχίσει την διαιτητική αγωγή στην νεογνική ηλικία.

Για τους σκοπούς της μελέτης έγιναν τα εξής:

- Μέτρηση αναστήματος, βάρους και υπολογισμός της σταθερής απόκλισης από την μέση τιμή για την αντίστοιχη ηλικία και φύλο.
- Για την εκτίμηση της συμμόρφωσης των ασθενών στη θεραπευτική διαίτα, υπολογίστηκε η μέση τιμή της Phe των τελευταίων 12 μηνών συμπεριλαμβανόμενης της τιμής την ημέρα της εξέτασης. Βάσει του πρωτοκόλλου παρακολούθησης, η Phe μετράται ανά 10 -12 ημέρες στη βρεφική ηλικία και ανά μήνα στη συνέχεια.
- Υπολογίστηκε η σχέση τεχνητού/φυσικού (artificial/natural) του προσλαμβανόμενου λευκώματος για κάθε ασθενή.
- Η εργαστηριακή διερεύνηση έγινε στο Τμήμα Μεταβολισμού Μετάλλων στο ΙΥΠ. Συγκεκριμένα, μετά από 12ωρη νηστεία, σε πρωινό δείγμα αίματος και 3ωρη συλλογή ούρων, μετρήθηκαν τα παρακάτω:
 - **στον ορό** : ολικό Ca, Ιονισμένο Ca, Φωσφόρος, Μαγνήσιο, Αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ), Κρεατινίνη (Cr) με Kit Boehringer, 25-υδροξυβιταμίνη D και παραθορμόνη (c-PTH) με ραδιοανοσολογική μέθοδο (Mallinckrodt kit test). Το ασβέστιο και το μαγνήσιο μετρήθηκαν με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης [Price 1972], ενώ ο φωσφόρος, η κρεατινίνη και η ΑΦ με χρωματομετρία.

- **στα ούρα** : σε συλλογές 3 ωρών, μετρήθηκαν Ca, P, Mg, Cr και υδροξυπρολίνη και υπολογίστηκαν οι σχέσεις Ca/Cr, P/Cr, Mg/Cr και OH-Pr/Cr. Επίσης υπολογίστηκαν οι σχέσεις TmP/GFR και TmCa/GFR. Οι βιοχημικοί δείκτες συγκρίθηκαν με αυτούς της ομάδας μαρτύρων που αποτελείται από 50 υγιή παιδιά, 22 αγόρια και 28 κορίτσια ηλικίας 3-15 ετών (9 ± 3.5).
- **Η οστική πυκνότητα (BD)** μετρήθηκε με την μέθοδο της απλής απορρόφησης φωτονίων (Single Photon Absorptiometry, SPA) στο περιφερικό τριτομόριο της δεξιάς κερκίδας [Chesney 1982]. Χρησιμοποιήθηκε το Bone Mineral Analyzer τύπου Mosgaard 1100, με ραδιενεργό πηγή ^{125}I (8.2 Gbq). Έχει αποδειχθεί ότι η μέτρηση της BD με αυτή την μέθοδο σχετίζεται πολύ καλά με το ξηρό βάρος του οστού και το ολικό ασβέστιο του σώματος ($r=0.85$) [Manzke et al 1975]. Η κάθε μέτρηση διαρκούσε περίπου 6 λεπτά και η δόση της ακτινοβολίας $<3\text{mREM}$ [Landin και Nilsson 1981, Gunnes 1994]. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σαν σταθερές αποκλίσεις ($\pm\text{SD}$) από την αντίστοιχη μέση τιμή φυσιολογικών παιδιών ίδιας ηλικίας και φύλου που έχουν προκύψει από μετρήσεις 360 Ελλήνων υγιών παιδιών 3-16 ετών.

Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο SPSS . Βάση της περιγραφικής στατιστικής του, υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι σταθερές αποκλίσεις και ελέγχθηκε κατά πόσον η κατανομή ήταν κανονική για τις διάφορες παραμέτρους προκειμένου να συγκριθούν μεταξύ των ομάδων [Lee 1992].

Το two-sided Student's t-test εφαρμόστηκε για την σύγκριση των παραμέτρων στις διάφορες ομάδες αναλόγως με την ηλικία (≤ 8 ετών, >8 ετών) και το φύλο, που είχαν κανονική κατανομή, ενώ το Mann-Whitney Non-Parametric Rank test όπου η κατανομή δεν ήταν κανονική [Lehmann 1975]. Τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων ή κυρίως των παραμέτρων οστικής πυκνότητας αφ' ενός και των βιοχημικών παραμέτρων αφ' ετέρου ελέγχθηκαν με γραμμική παλίνδρομη συσχέτιση (linear regression analysis), απλή σε πρώτη φάση και εν συνεχεία πολλαπλή. Διαφορές με

$p > 0,05$ θεωρήθηκαν μη σημαντικές [Winer et al 1991].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η σωματική ανάπτυξη των ασθενών με PKU ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια. Το ανάστημα (\pm SD) κυμαινόταν από -1.5 μέχρι $+2.2$ (0.72 ± 1.05). Το στάδιο ενήβωσης (Tanner stage) των ασθενών δεν διέφερε από το στάδιο ενήβωσης των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Η πρόσληψη ασβεστίου από τους ασθενείς και μάρτυρες ήταν επαρκής (914 ± 202 mg/ημέρα).

Οστική πυκνότητα (BD):

Η BD (απόλυτες τιμές, gr/cm^2) στα παιδιά με PKU και στα φυσιολογικά παιδιά συσχετίζεται με την ηλικία ($r=0.58$, $p < 0.001$). Μετά την ηλικία των 8 ετών η BD των ασθενών τείνει να είναι χαμηλότερη από τα φυσιολογικά (σχήμα 2).

Στο σχήμα 3 φαίνεται ότι 22/48 (46%) των ασθενών με PKU έχουν σημαντική απώλεια οστικής μάζας ($> -2\text{SD}$ από την μέση τιμή) ($p < 0.001$).

Στον πίνακα 5 φαίνονται οι διαφορές μεταξύ των ασθενών όταν χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με την ηλικία (≤ 8 και > 8 ετών). Η ομάδα των ασθενών ηλικίας > 8 ετών είχε μεγαλύτερη οστική απώλεια (-2.56 ± 0.22 και -0.87 ± 0.26 αντιστοίχως, $p < 0.001$) και υψηλότερες τιμές Phe (14.0 ± 1.09 και 7.77 ± 1.14 αντιστοίχως, $p < 0.001$) σε σύγκριση με τους μικρότερους.

Ο πίνακας 6 δείχνει τις διαφορές των δεδομένων που μελετήθηκαν ανάλογα με το φύλο των ασθενών. Η μείωση της BD ήταν μεγαλύτερη στα κορίτσια (-2.0 ± 0.21) και (-1.44 ± 0.37) στα αγόρια ($p < 0.01$).

Η γραμμική παλίνδρομη συσχέτιση (linear single regression analysis) έδειξε σημαντική αρνητική συσχέτιση της BD με την ηλικία ($r = -0.59$, $p < 0.001$) (σχ. 3), Phe ($r = -0.49$, $p < 0.001$) (σχ. 4), ενώ θετική συσχέτιση με το κλάσμα τεχνητού/φυσικού λευκώματος (artificial/natural protein) ($r = 0.43$, $p = 0.01$) (σχ. 5, πίν. 7). Η πολλαπλή συσχέτιση (multiple regression) έδειξε ότι η πιο ισχυρή συσχέτιση είναι με την ηλικία. Δεν βρέθηκαν συσχετίσεις της BD με τους διάφορους βιοχημικούς δείκτες (Ca, Mg, P, AΦ, βιταμίνη D,

PTH, UCa/UCr, UP/UCr, UMg/UCr, OHPr/UCr).

Βιοχημικοί δείκτες :

Στους πίνακες 4-6 φαίνονται οι μέσες τιμές \pm πιθανό σφάλμα (SEM) των βιοχημικών παραμέτρων που μελετήθηκαν στους ασθενείς και μάρτυρες.

Στο αίμα, το ασβέστιο και του μαγνήσιο βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα ($p < 0.04$, $p < 0.001$ αντίστοιχα), ενώ η αλκαλική φωσφατάση ήταν χαμηλότερη ($p < 0.01$) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Δεν βρέθηκε όμως σημαντική διαφορά στα επίπεδα 25-OH βιταμίνης ούτε της παραθορμόνης.

Στα ούρα, Το 40% (19/48) των ασθενών είχε αυξημένη αποβολή ασβεστίου (UCa/UCr > 60 mmol/mmol). Συγκριτικά με τα φυσιολογικά παιδιά, οι ασθενείς είχαν αυξημένη UCa/UCr (0.46 ± 0.05 και 0.22 ± 0.01 αντίστοιχα, $p < 0.001$) (σχ. 6), χαμηλότερη UP/UCr (1.54 ± 0.26 και 2.58 ± 0.16 αντίστοιχα, $p < 0.001$), σημαντικά αυξημένη σωληναριακή επαναρρόφιση φωσφόρου (TmP/GFR) (7.43 ± 0.38 και 5.65 ± 0.18 αντίστοιχα, $p < 0.001$) και χαμηλότερη αποβολή υδροξυπρολίνης (0.026 ± 0.003 και 0.086 ± 0.004 αντίστοιχα, $p < 0.001$).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους βιοχημικούς δείκτες μεταξύ των δύο φύλων, ούτε μεταξύ των ασθενών ηλικίας (≤ 8 , > 8 ετών), εκτός από τον φωσφόρο ορού που ήταν αυξημένος στους μικρότερους ασθενείς ($p = 0,02$) (πιν. 5).

Η συμμόρφωση στην θεραπευτική δίαιτα

Τα επίπεδα της Phe βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών ηλικίας > 8 ετών σε σύγκριση με τους μικρότερους ασθενείς (7.77 ± 1.14 και 14.0 ± 1.09 αντίστοιχα, $p < 0.001$). Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο 3/22 ασθενείς ≤ 8 ετών είχαν τιμές Phe > 10 mg/dl, εν αντιθέσει με 21/26 στην ομάδα > 8 ετών (σχ 6, πιν 5).

Η Phe είχε σημαντική θετική συσχέτιση με την ηλικία ($r = 0.60$, $P < 0.001$) (σχ 6), αρνητική με την BD ($r = -0.49$, $p < 0.001$) (σχ. 3) και το κλάσμα τεχνητό/φυσικό προσλαμβανόμενο λεύκωμα (artificial/natural) ($r = -0.46$, $p < 0.001$) (πιν 7).

Ο προσδιορισμός της Phe στον ορό των ασθενών μας είναι ο καλύτερος δείκτης συμμόρφωσης στην θεραπευτική διαίτητικοί αγωγή τους. Στην προσχολική ηλικία, η ρύθμιση των PKU ασθενών είναι καλύτερη, διότι ευρίσκονται υπό την επίβλεψη των

γονέων τους και αρχίζει να διαφοροποιείται με την εισαγωγή των ασθενών στο σχολείο.

Πίνακας 4

Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων στο αίμα και τα ούρα των παιδιών με PKU σε σχέση με των μαρτύρων (μέση τιμή \pm S.E.)

	Παιδιά με PKU	Μάρτυρες	<i>p</i>
Αριθμός (αγόρια, κορίτσια)	48 (20, 28)	50 (22, 28)	-
Ηλικία	2.5-17 (8.8 \pm 3.7)	3-15 (9.0 \pm 3.5)	n.s
Αίμα			
Phe ⁺	11.13 \pm 6.6	-	-
Ca (mmol/L)	2.51 \pm 0.02	2.47 \pm 0.02	0.04
iCa (mmol/L)	1.19 \pm 0.02	1.17 \pm 0.01	n.s
P (mmol/L)	1.63 \pm 0.03	1.65 \pm 0.04	n.s
Mg (mmol/L)	0.94 \pm 0.01	0.86 \pm 0.01	<0.001
AΦ (IU/l)	73.3 \pm 4.9	89.0 \pm 3.6	0.01
25 OH-βιταμίνη D (nmol/L)	45.3 \pm 3.8	49.16 \pm 2.54	n.s
c-PTH (pmol/L)	16.6 \pm 2.6	23.0 \pm 2.4*	n.s
Ούρα			
UCa/Ucr	0.46 \pm 0.05	0.22 \pm 0.01*	<0.001
UP/UCr	1.54 \pm 0.26	2.58 \pm 0.16	<0.001
UMg/UCr	0.67 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	n.s
TmP/GFR	7.43 \pm 0.38	5.65 \pm 0.18*	<0.001
TmCa/GFR	9.17 \pm 0.40	8.89 \pm 0.23	n.s
Υδροξυπρολίνη/Cr	0.026 \pm 0.003	0.086 \pm 0.004	<0.001

* Μη κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney non-parametric rank test.

⁺ Η μέση τιμή των μετρήσεων της Phe το τελευταίο χρόνο.

Πίνακας 5

Η σύγκριση των παραμέτρων στις δύο ομάδες παιδιών με PKU αναλόγως με την ηλικία ($\bar{x} \pm S.E.$)

	Παιδιά με PKU ≤ 8 ετών	Παιδιά με PKU > 8 ετών	p
Αριθμός	22	26	-
Ηλικία	5.0 \pm 0.7	11.02 \pm 2.88	-
Ύψος (\pm SDS)	0.50 \pm 0.23	0.14 \pm 0.19	n.s
Phe ⁺	7.77 \pm 1.14	14.0 \pm 1.09	< 0.001
BD (\pm SDS)	- 0.87 \pm 0.26	-2.5 \pm 0.22	< 0.001
Ca (mmol/l)	2.55 \pm 0.04	2.52 \pm 0.03	n.s
iCa (mmol/l)	1.16 \pm 0.01	1.19 \pm 0.02	n.s
P (mmol/l)	1.73 \pm 0.05	1.57 \pm 0.04	0.02
Mg (mmol/l)	0.95 \pm 0.02	0.94 \pm 0.02	n.s
AΦ (IU/L))	80.0 \pm 7.12	68.6 \pm 6.8	n.s
Cr (mmol/l)	50.2 \pm 2.3	55.6 \pm 3.7	n.s
25 OH-βιταμίνη D (nmol/L)	37.6 \pm 6.0	33.9 \pm 4.9	n.s
c-PTH (pmol/L)	13.2 \pm 3.7	19 \pm 3.75*	n.s
UCa/Ucr	0.47 \pm 0.07	0.46 \pm 0.07*	n.s
UP/UCr	1.94 \pm 0.57	1.27 \pm 0.21	n.s
UMg/UCr	0.80 \pm 0.09	0.75 \pm 0.04	n.s
TmP/GFR	7.77 \pm 0.73	7.18 \pm 0.40*	n.s
TmCa/GFR	8.85 \pm 0.32	9.4 \pm 0.65	n.s
Υδροξυπρολίνη (OH-Pr)	0.022 \pm 0.005	0.28 \pm 0.003	n.s

* Μη κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney non-parametric rank test.

+ Η μέση τιμή των μετρήσεων της Phe το τελευταίο χρόνο.

Πίνακας 6

Η σύγκριση των παραμέτρων στα παιδιά με PKU ανάλογα με το φύλο ($\bar{x} \pm S.E.$)

	PKU Αγόρια	PKU Κορίτσια	p
Αριθμός	20	28	-
Ηλικία	8.11 \pm 0.70	8.3 \pm 0.74	n.s
Ύψος (\pm SDS)	0.09 \pm 0.23	0.46 \pm 0.20	n.s
Phe ⁺	11.65 \pm 1.43	10.70 \pm 1.37	n.s
BD (\pm SDS)	- 1.44 \pm 0.37	-2.0 \pm 0.22	< 0.01
Πρόσληψη Ca (mg/ημέρα)	898 \pm 54	914 \pm 42	n.s
Λεύκωμα (PKU/Natural)	0.71 \pm 0.13	0.71 \pm 0.18 *	n.s
Ca (mmol/l)	2.53 \pm 0.03	2.54 \pm 0.03	n.s
iCa (mmol/l)	1.21 \pm 0.02	1.19 \pm 0.02	n.s
P (mmol/l)	1.67 \pm 0.05	1.61 \pm 0.04	n.s
Mg (mmol/l)	0.93 \pm 0.02	0.95 \pm 0.02	n.s
AΦ (IU/L))	63.7 \pm 5.03	80.0 \pm 7.4	n.s
Cr (mmol/l)	57.2 \pm 2.9	54.5 \pm 2.9	n.s
25 OH-βιταμίνη D (nmol/L)	38.6 \pm 7.55	33.0 \pm 3.8	n.s
C-PTH (pmol/L)	15.4 \pm 2.9	17.5 \pm 4.3 *	n.s
UCa/Ucr	0.53 \pm 0.09	0.41 \pm 0.06 *	n.s
UP/UCr	1.09 \pm 0.08	1.76 \pm 0.38 *	n.s
UMg/UCr	0.68 \pm 0.11	0.66 \pm 0.06	n.s
TmP/GFR	7.70 \pm 0.27	7.30 \pm 0.54 *	n.s
TmCa/GFR	9.20 \pm 0.55	9.16 \pm 0.53	n.s
Υδροξυπρωλίνη (OH-Pr)	0.028 \pm 0.004	0.026 \pm 0.003	n.s

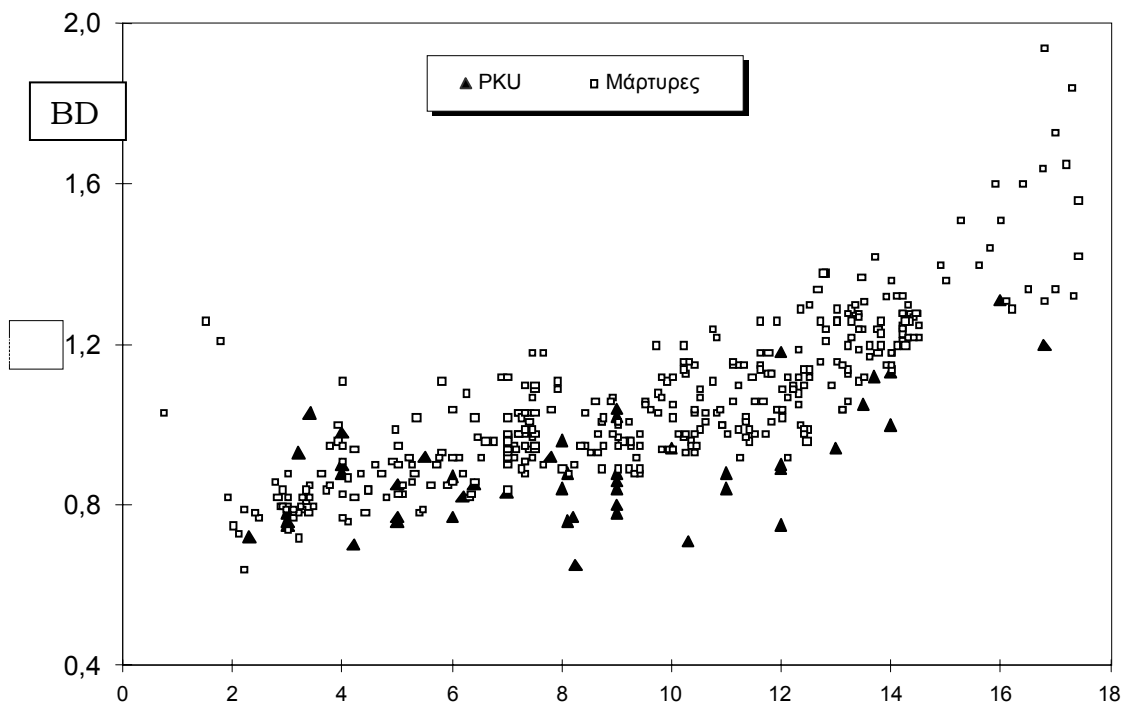
* Μη κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney non-parametric rank test.

+ Η μέση τιμή των μετρήσεων της Phe το τελευταίο χρόνο.

Πίνακας 7
Οι συσχέτιση μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων

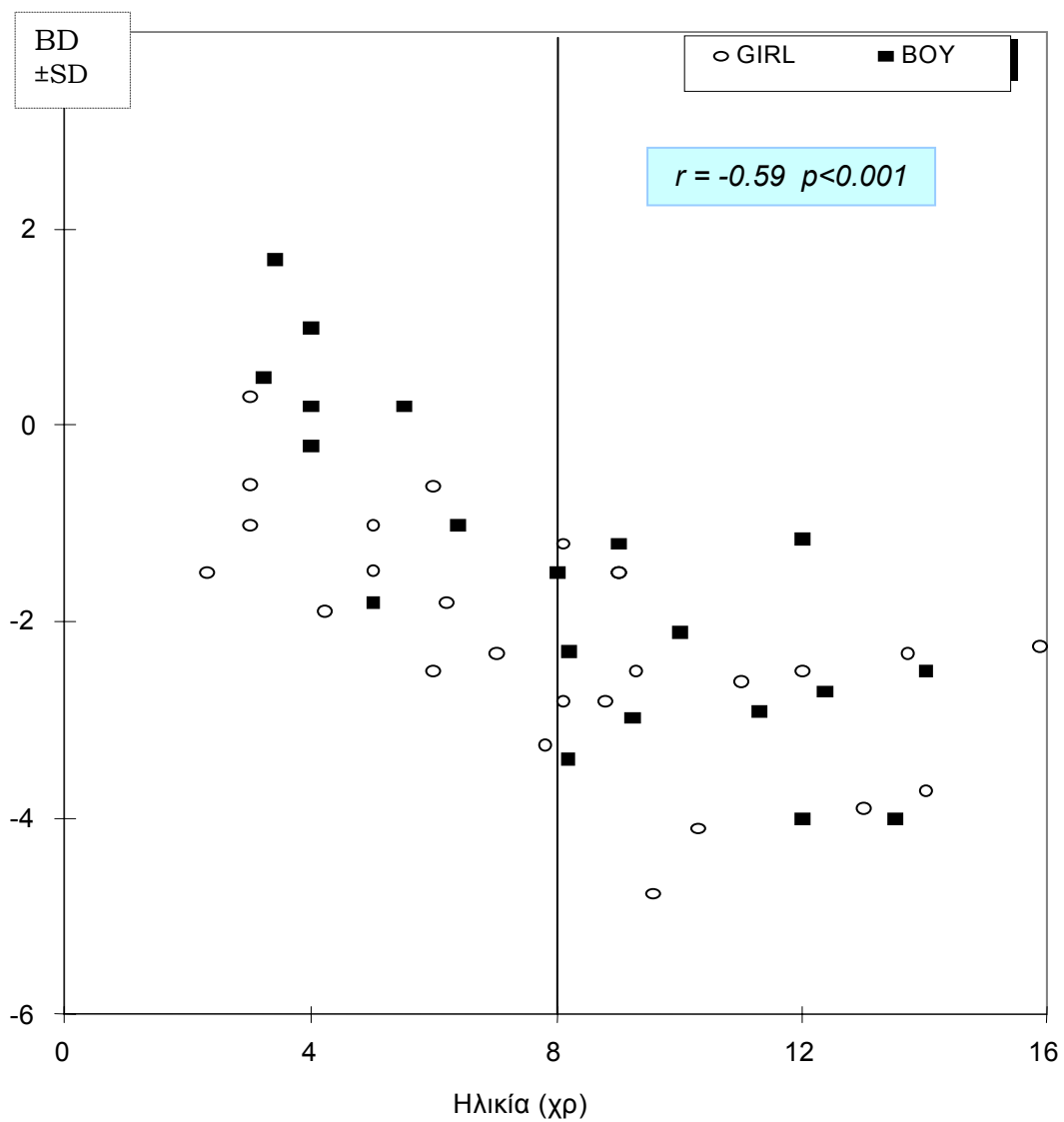
	BD (SDS)	Ηλικία	Phe
Ηλικία	r= -0.59 P <0.001		
Phe	r= -0.49 P <0.001	r= 0.60 P<0.001	
Art./Nat. proein*	r= 0.43 P=0.01	r= -0.46 P=0.001	r= -0.46 P <0.001

*artificial/natural protein



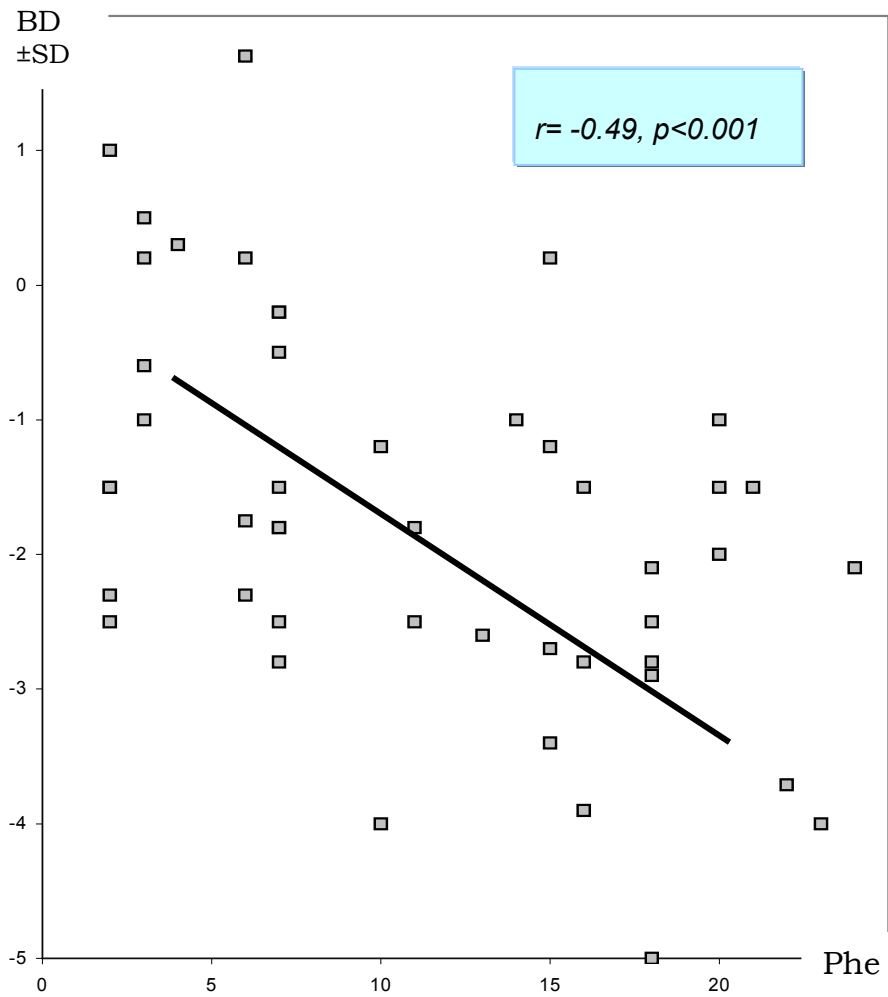
Σχήμα 2

Η οστική πυκνότητα (BD, g/cm²) σε σχέση με την ηλικία στους ασθενείς με PKU και τους μάρτυρες.

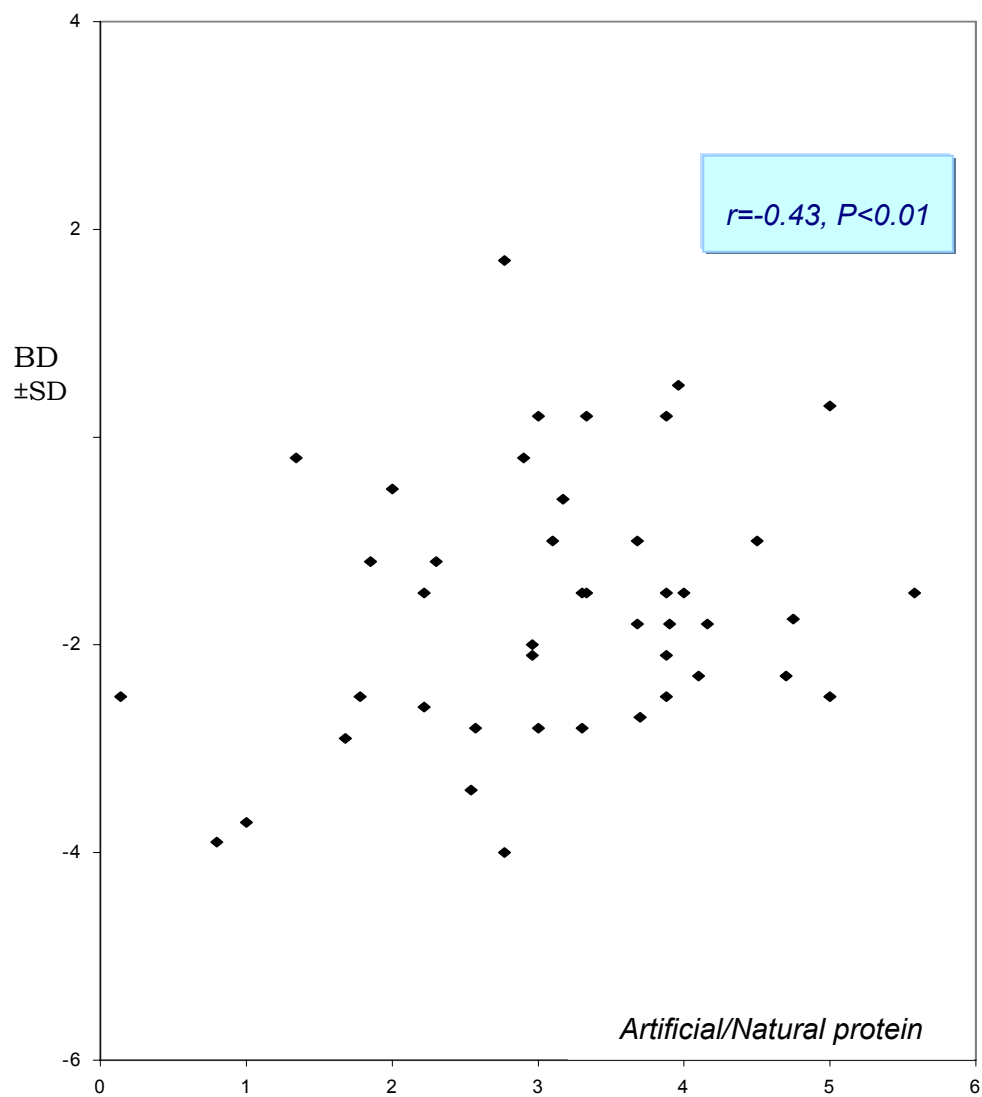


Σχήμα 3

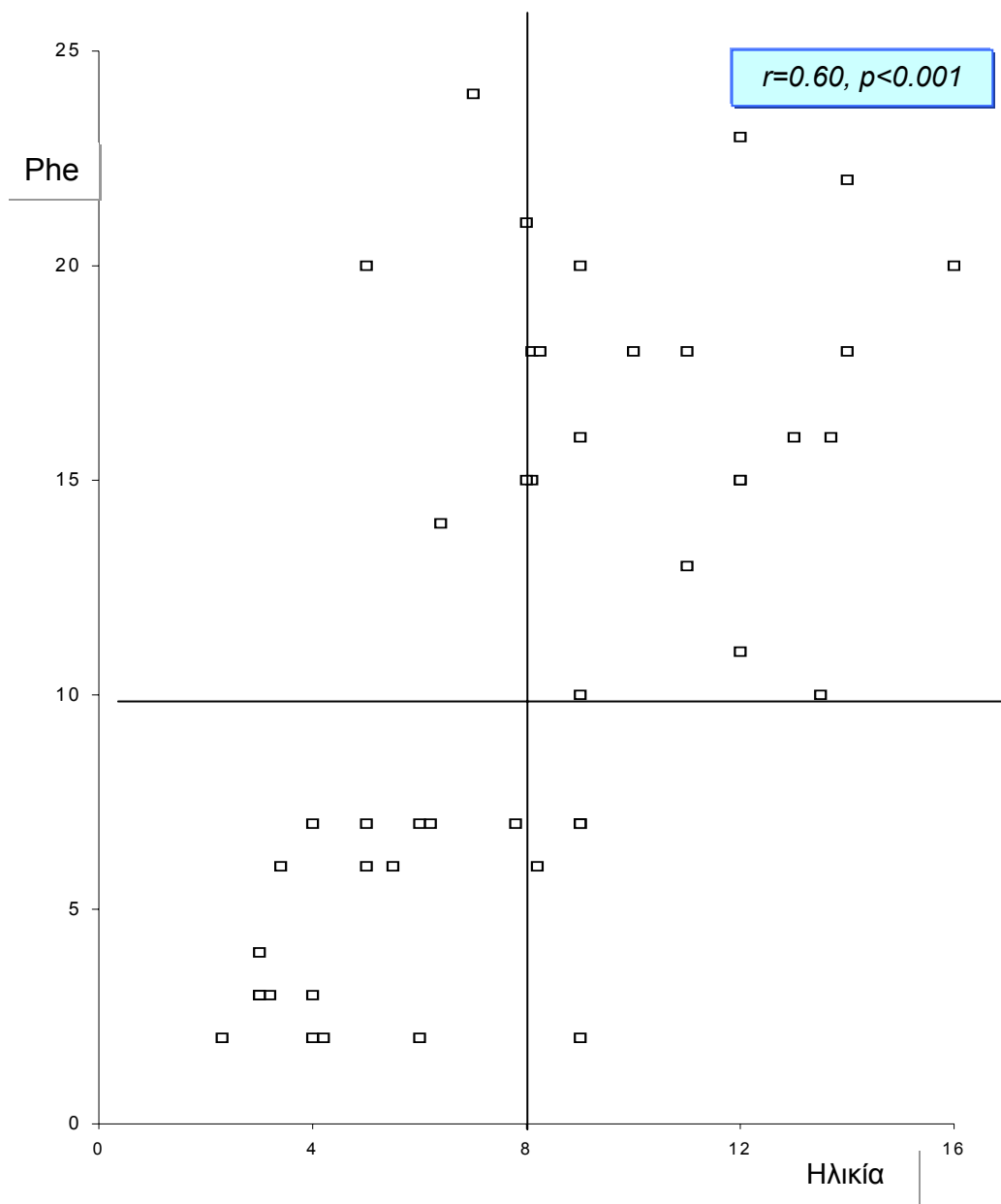
Η συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και οστικής πυκνότητας (BD, \pm SD). Είναι σαφές ότι η BD μειώνεται σημαντικά μετά την ηλικία 8 των ετών και στα δύο φύλα.



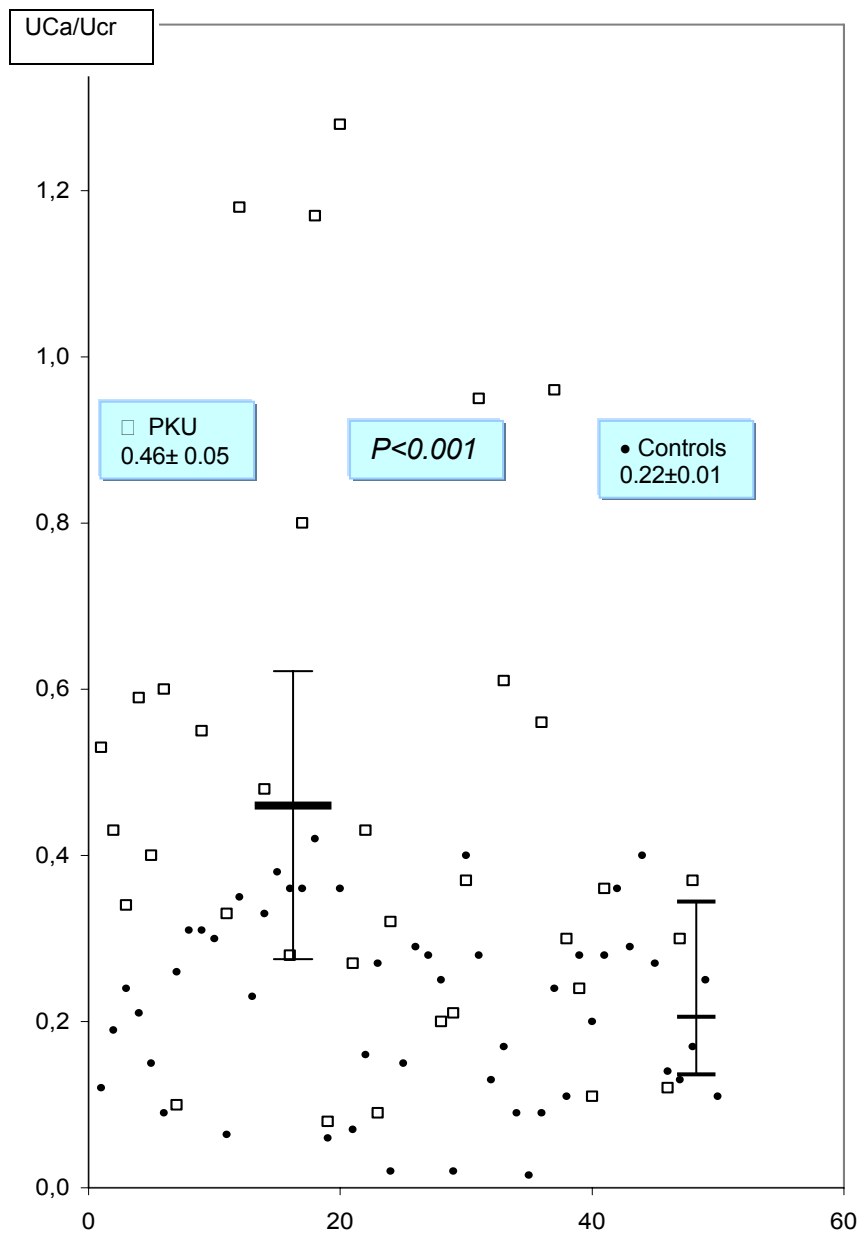
Σχήμα 4
Η συσχέτιση οστικής πυκνότητας (BD, ±SD) με το βαθμό τήρησης της θεραπευτικής διαίτας (Phe) στους ασθενείς με PKU



Σχήμα 5
Η συσχέτιση της BD (SD) και του κλάσματος Artificial/Natural protein στους ασθενείς με PKU



Σχήμα 6
Η συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και Phe στους ασθενείς με PKU



Σχήμα 7

Η διαφορά στην αποβολή ασβεστίου ορού (UCa/Ucr) μεταξύ των ασθενών με PKU και των φυσιολογικών παιδιών

Συζήτηση

Για πολλά χρόνια, η νοητική και σωματική ανάπτυξη ασθενών με PKU αποτέλεσε το αντικείμενο αρκετών μελετών. Τα αποτελέσματά μας σε προηγούμενη δημοσίευση [Missiou-Tsagaraki et al 1988] έδειξαν ότι η σωματική ανάπτυξη των παιδιών και εφήβων με PKU ήταν φυσιολογική. Ωστόσο λίγες ανακοινώσεις υπάρχουν σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις αυτής της ασθένειας ή και της διαιτητικής αγωγής στα οστά και άλλα συστήματα.

Αυτή η μελέτη, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της απλής απορρόφησης φωτονίων (SPA), έδειξε μία σημαντική απώλεια οστικής μάζας στους ασθενείς με PKU ηλικίας >8 χρονών. Ο βαθμός της οστικής απώλειας σχετίζεται σημαντικά με την ηλικία και την διαιτητική συμμόρφωση (μέση τιμή Phe). Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με εκείνα των McMurry et al (1992) που μελέτησαν 26 ασθενείς με την τεχνική SPA και βρήκαν ότι η BD ήταν φυσιολογική στα παιδιά προσχολικής ηλικίας, ενώ παιδιά ηλικίας >8 ετών είχαν σημαντικά μειωμένη BD. Αυτό ερμηνεύτηκε σαν αποτέλεσμα κακής συμμόρφωσης προς την διαιτητική αγωγή. Αντίθετα σε μια πρόσφατη μελέτη [Allen et al 1994], χρησιμοποιώντας την DXA, σε 32 ασθενείς προεφηβικής ηλικίας δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ BD και Phe. Εντούτοις, αναφέρεται σημαντικά χαμηλότερη BD, ολική και των σπονδύλων, σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0.031$ και 0.003 αντίστοιχα), παρά την σημαντικά υψηλότερη ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου ($p < 0.001$) και μαγνησίου ($p < 0.001$) των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Πιο πρόσφατα οι Hillman et al (1996) που βρήκαν μειωμένη BD ($p < 0.05$), στους οσφυϊκούς σπονδύλους και τα κάτω άκρα με DXA, ενίσχυσαν τα παραπάνω ευρήματα. Η μελέτη αφορούσε 11 παιδιά με PKU, ηλικίας 10.9 ± 4.2 ετών, Ο Carson et al (1990), χρησιμοποιώντας CT οσφυϊκής μοίρας ανέφεραν σημαντική ελάττωση της BD σε 4 από τους 11 ασθενείς με PKU ηλικίας 19-34 χρόνων. Επίσης βρήκαν σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην οστική πυκνότητα και την αξιολόγηση των προσλαμβανόμενων θερμίδων πρωτεϊνών, ασβεστίου και χαλκού.

Από τις πιο σημαντικές παρατηρήσεις αυτής της μελέτης καθώς και εκείνης των McMurry et al (1992) είναι το γεγονός ότι η αυστηρή διαιτητική συμμόρφωση που δίνει

επιθυμητά επίπεδα Phe στο αίμα μπορεί να προάγει φυσιολογική οστική μετάλλωση. Ο λόγος για τον οποίο οι Allen et al (1994) δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ της BD και της διαιτητικής συμμόρφωσης θα μπορούσε να είναι ότι μελετήθηκαν μόνο ασθενείς προεφηβικής ηλικίας, με μέση ηλικία 7.7 ± 2.3 (κορίτσια <10 ετών, αγόρια <12 ετών).

Αναλύοντας όλα τα μέχρι τώρα αποτελέσματα (και τα δικά μας) (πίν. 8) φαίνεται ότι υπάρχει πρόβλημα στην μετάλλωση των οστών σε όλες τις ηλικίες, αλλά αυτό το πρόβλημα αποκαλύπτεται στην εφηβεία. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζεται από τους δείκτες οστικού μεταβολισμού. Στα παιδιά με PKU η αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ) ήταν σημαντικά ελαττωμένη σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0.01$). Η μελέτη των McMurry et al έδειξε σημαντικά χαμηλότερη ΑΦ σε ασθενείς προσχολικής, σχολικής και μεγαλύτερους με PKU. Επίσης οι Hillman et al βρήκαν σημαντική μείωση τόσο στην ολική όσο στην οστική ΑΦ ($p < 0.001$) καθώς και στην οστεοκαλσίνη ($p < 0.05$).

Στην μελέτη μας βρήκαμε υψηλότερες τιμές ασβεστίου και μαγνησίου αίματος στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ οι McMurry et al και οι Hillman et al αναφέρουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα παρά την σωστή πρόσληψη.

Το πιο σημαντικό παθολογικό εύρημα της μελέτης μας ήταν η αυξημένη απέκκριση Ca στα ούρα (UCa/UCr) των ασθενών με PKU σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p < 0.001$).

Το κλάσμα UCa/UCr των ασθενών δεν σχετιζόταν με την ηλικία ή τις άλλες παραμέτρους που μελετήθηκαν.

Άλλο ένα σημαντικό εύρημα είναι η χαμηλότερη απέκκριση φωσφόρου στα ούρα (UCa/UCr) ($p < 0.001$) και η υψηλότερη σωληναριακή επαναρρόφηση του φωσφόρου. Αυτές οι παράμετροι δεν έχουν μελετηθεί αρκετά. Υπάρχει μόνο μία πρόσφατη μελέτη των Allen et al (1994) που ανέφερε φυσιολογικές τιμές UCa/UCr αλλά συμφωνούσε με την δική μας όσον αφορά τον φωσφόρο στα ούρα.

Οι χαμηλές τιμές OHPr στα ούρα ($p < 0.001$) και η χαμηλή ΑΦ των ασθενών μας δείχνουν μειωμένη δραστηριότητα οστικού σχηματισμού ή σύνθεσης.

Γεγονός είναι ότι η ήβη είναι μια καθοριστικής σημασίας περίοδος γιατί συνοδεύεται από ταχεία αύξηση του αναστήματος και της μετάλλωση των οστών.

Είναι φανερό από αυτά τα ευρήματα ότι η οστεοπενία είναι σύνηθες εύρημα στους

ασθενείς με PKU σε νεαρά ηλικία. Η μείωση στην ταχύτητα οστικής μετάλλωσης θα μπορούσε να έχει κλινικές συνέπειες όπως κατάγματα και οστεοπόρωση στην μετέπειτα ζωή. Έτσι, άτομα με PKU μπορεί να μη φθάσουν στην επιθυμητή οστική μετάλλωση (κορυφαία οστική πυκνότητα) και να είναι σε αυξημένο κίνδυνο για οστεοπόρωση. Πρόσφατα ο Greeves et al (1997) μελέτησαν 85 ασθενείς με PKU, ηλικίας 0.3-33 ετών, και βρήκαν σημαντικά περισσότερα κατάγματα μετά την ηλικία των 8 ετών σε σχέση με τους μάρτυρες, αλλά όχι στον συνολικό πληθυσμό των ασθενών. Αυτά τα αποτελέσματα συμπίπτουν με τα δικά μας και των McMurry et al (1992).

Πίνακας 8

Σύγκριση των διαφόρων μελετών για το μεταβολισμό των οστών σε ασθενείς με PKU

<i>Συγγ/φείς</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ηλικία</i>	<i>Μέθοδος</i>	<i>BD</i>	<i>Ca</i> <i>ορού</i>	<i>Mg</i> <i>ορού</i>	<i>A.Φ</i> <i>ορού</i>	<i>UCa/</i> <i>UCr</i>
<i>Carson</i> <i>1990</i>	11	19 - 34	CT scan	↓	-	-	-	-
<i>McMurry</i> <i>1992</i>	26	1 - 16	SPA	↓ (<i>>8 χρ</i>)	φ	↓	↓	-
<i>Allen</i> 1994	32	7.7± 2.2	DXA	↓	-	-	-	φ
<i>Hillman</i> <i>1996</i>	11	10.9± 4.2	DXA	↓	-	-	-	-
<i>Scwahn</i> <i>1998</i>	14		pQCT *	↓**				
<i>Al-Qadreh</i> <i>et al</i> 1998	48	2.5 – 17 (8.8±3.7)	SPA	↓ (<i>>8 χρ</i>)	↑	↑	↓	↑

* Peripheral quantitative computed tomography

** Πολύ έντονη σε ασθενείς που δεν έχουν κάνει δίαιτα (η διάγνωση έγινε σε μεγάλη ηλικία)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η κατάσταση των οστών σε παιδιά με PKU υπό θεραπεία. Η υπόθεσή μας ήταν ότι η μετάλλωση των οστών μπορεί να σχετίζεται με την διαιτητική πρόσληψη ή και την ίδια την νόσο.

Ασθενείς και μέθοδοι

Η μελέτη αφορούσε 48 παιδιά (20 αγόρια, 28 κορίτσια) με κλασική PKU, ηλικίας 2.5-17 ετών (8.8 ± 3.7). Έγινε εκτίμηση των εξής παραμέτρων:

1. Μέτρηση αναστήματος, βάρους και υπολογισμός της σταθερής απόκλισης από την μέση τιμή για την αντίστοιχη ηλικία και φύλο.
2. Υπολογίστηκε η μέση τιμή της Phe των τελευταίων 12 μηνών.
3. Μετά από 12ωρη νηστεία, σε πρωινό δείγμα αίματος και 3ωρη συλλογή ούρων, μετρήθηκαν **στον ορό**: ολικό Ca, ιονισμένο Ca, φωσφόρος, μαγνήσιο, αλκαλική φωσφατάση (ΑΦ), κρεατινίνη (Cr), 25-υδροξυβιταμίνη D και παραθορμόνη (c-PTH), ενώ **στα ούρα** υπολογίστηκαν οι σχέσεις: Ca/Cr, P/Cr, Mg/Cr και OH-Pi/Cr. Επίσης υπολογίστηκαν οι σχέσεις TmP/GFR και TmCa/GFR. Οι βιοχημικοί δείκτες συγκρίθηκαν με αυτούς της ομάδας μαρτύρων που αποτελείτο από 50 υγιή παιδιά, 22 αγόρια και 28 κορίτσια ηλικίας 3-15 ετών (9 ± 3.5).
4. Η οστική πυκνότητα (BD) μετρήθηκε με την μέθοδο της απλής απορρόφησης φωτονίων (SPA) στο περιφερειακό τριτημόριο της δεξιάς κερκίδας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε σταθερές αποκλίσεις (\pm SD) από την αντίστοιχη μέση τιμή φυσιολογικών παιδιών ίδιας ηλικίας και φύλου.

Αποτελέσματα

Η σωματική ανάπτυξη των ασθενών με PKU ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια. Το ύψος (\pm SD) κυμαινόταν από -1.5 μέχρι $+2.2$ (0.72 ± 1.05). Η πρόσληψη ασβεστίου από τους ασθενείς και μάρτυρες ήταν επαρκής (914 ± 202 mg/ημέρα).

Η BD στα παιδιά με PKU και στα φυσιολογικά παιδιά συσχετίζεται με την ηλικία ($r=0.58$, $p<0.001$). Η απώλεια οστικής μάζας στους ασθενείς με PKU ήταν σημαντική ($>-2SD$) σε 22/48 (46%) ($P<0.001$). Τα επίπεδα της Phe (συμμόρφωση στη δίαιτα) βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών ηλικίας >8 ετών σε σύγκριση με τους μικρότερους ασθενείς (14.0 ± 1.09 και 7.77 ± 1.14 αντίστοιχα $p<0.001$). Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο 3/22 ασθενείς ≤ 8 ετών είχαν μέσες τιμές Phe >10 mg/dl, εν αντιθέσει με 21/26 στην ομάδα >8 ετών.

Βρέθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση της BD με την ηλικία ($r=-0.59$, $p<0.001$) και τις μέσες τιμές Phe ($r=-0.49$, $p<0.007$), ενώ θετική συσχέτιση με το κλάσμα τεχνητό/φυσικό λεύκωμα (artificial/natural protein) ($r=0.43$, $p=0.01$). Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις της BD με τους διάφορους βιοχημικούς δείκτες. Η αποβολή Ca στα ούρα των ασθενών ήταν αυξημένη συγκριτικά με τα φυσιολογικά παιδιά (UCa/Ucr 0.46 ± 0.05 και 0.22 ± 0.01 αντίστοιχα, $p<0.001$), ενώ η UP/UCr ήταν χαμηλότερη ($p<0.001$). Σημαντικά αυξημένη ήταν η σωληναριακή επαναρρόφηση φωσφόρου (TmP/GFR) (7.43 ± 0.38 και 5.65 ± 0.18 αντίστοιχα, $p<0.001$) και χαμηλότερη αποβολή υδροξυπρολίνης (0.026 ± 0.003 και 0.086 ± 0.004 αντίστοιχα, $p<0.001$).

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους βιοχημικούς δείκτες μεταξύ των δύο φύλων, ούτε μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών ανάλογα με την ηλικία (<8, >8 ετών) εκτός από το φωσφόρο ορού που ήταν σημαντικά αυξημένο στους μικρότερους ασθενείς ($p=0.02$).

Η Phe είχε σημαντικά θετική συσχέτιση με την ηλικία ($r=0.60$, $p<0.001$), αρνητική με την BD ($r=-0.49$, $p<0.001$) και το κλάσμα τεχνητό/φυσικό προσλαμβανόμενο λεύκωμα (artificial/natural) ($r=-0.46$, $p<0.001$).

Είναι φανερό από αυτά τα ευρήματα ότι η οστεοπενία είναι σύνηθες εύρημα στους ασθενείς με PKU από μικρή ηλικία. Το γεγονός ότι η απώλεια της οστικής μάζας αρχίζει στη σχολική ηλικία τότε που οι ασθενείς έχουν λιγότερη συμμόρφωση στη δίαιτα συνηγορεί υπέρ της συνέχισης της ειδικής δίαιτας εφ' όρου ζωής. Η μείωση στην ταχύτητα οστικής μετάλλωσης θα μπορούσε να έχει κλινικές συνέπειες όπως κατάγματα και οστεοπόρωση στην μετέπειτα ζωή.

SUMMARY

Abbas A. Al-Qadreh, M.D.

BONE MINERAL STATUS IN CHILDREN WITH PHENYLKETONURIA

“Doctoral Thesis”

Objectives:

To assess the bone mineral status in children with PKU and to evaluate the factors that may be related to their bone mineralization.

Subjects and Methods:

Forty-eight children with classic PKU (20 males, 28 females), aged 2.5-17 years (mean 8.8 ± 3.7) were recruited for participation in the study. All patients were identified from the Greek Neonatal Screening Program and had been under surveillance, since infancy, at the Institute of Child Health in Athens. The adequacy of their nutrition was estimated from their actual intake. This was derived from the 2-3 day dietary record they sent with their Guthrie card every month and a more detailed record taken by the dietitian during their annual visit to the clinic. All had appropriate intake of calories, artificial and natural protein, carbohydrate, fat, calcium and magnesium for their weight, height and age.

The compliance with dietary treatment for each subject was evaluated by calculating the average of serum Phe levels (12 measurements) during the previous 12 months with the value of the day of study included. According to our follow-up program Phe blood levels were evaluated every 10-12 days during infancy and every subsequent month. Ratio of artificial/natural protein intake was calculated for every patient.

Patients remained on their usual diet, but fasted for 12 h the previous night. Venous blood samples and 3 h urine collections were obtained the following morning. Blood calcium (Ca), ionized Ca, magnesium (Mg), phosphorus (P), creatinine (Cr), alkaline phosphatase (ALP), parathyroid hormone (c-PTH) and 25-Hydroxyvitamin D (25-OHD) were measured by previously described methods. Urinary (U) Ca/Cr, UP/UCr, UMg/UCr, Urinary Hydroxyproline/UCr (UOH-Pr/UCr) were calculated in the collected over a period of 3 hour urine samples. Biochemical indices were compared to that of 50 healthy children

(control group), 22 boys and 28 girls, aged 3 - 15 years (mean 9 ± 3.5).

Bone density (BD) was measured in the distal third of the right forearm by single photon absorptiometry (SPA) using the Mosgård bone analyzer, type 1100 equipped with a ^{125}I source with photon peak. Individual scanning time was about 6 min with an irradiation dose less than 3 mREM. This method correlates well with bone ash weight in children and adults. BD, weight and height values were expressed as positive or negative standard deviation scores ($\pm\text{SD}$) with respect to age- and sex-matched controls, obtained from 360 Greek healthy children, aged 3-16 years.

Statistics

Statistical analysis was performed on the SPSS program. Descriptive statistics were used for measurements within the groups. Results were expressed as mean $\pm\text{SD}$ or SE. Significance of differences was evaluated by two-sided Student's t-tests. Simple linear regression analyses were used to evaluate association between variables. The Z score (units from the mean for the normal Greek children of the same age and sex) were calculated. The significance level was set at $p<0.05$.

Results

Anthropometric measurements were within normal range. Mean height ($\pm\text{SD}$) ranged between -1.5 and 2.2 . The pubertal status (Tanner stage) of patients was appropriate to age- and sex-matched controls. Daily calcium intake (mg/day) was sufficient for each patient's requirement (914 ± 202).

Bone mineralization

PKU children had reduced bone mineralization compared to controls. Severe osteopenia (below -2SD) was found in 22/48 (46%) of patients ($p<0.001$). Dividing patients into two age subgroups of < 8 and > 8 year. We found that the older group had more prominent bone loss ($p<0.001$) and higher mean Phe values ($p<0.001$) compared to the younger subjects. Comparing the data of patients according to sex, we found that girls had significantly lower BD than boys ($p<0.01$).

Linear regression analysis revealed a significant negative correlation of BD with age ($r=-0.59$, $p<0.001$) and mean Phe values ($r=-0.49$, $p<0.001$), whereas a positive correlation of BD to the ratio of artificial/natural protein intake was observed ($r=0.43$, $p<0.01$). No significant correlation found between BD and the studied biochemical indices.

Biochemical indices

Serum Ca and Mg were found to be significantly higher in children with PKU than in controls (2.51 ± 0.02 vs 2.47 ± 0.02 , $p=0.04$) and (0.94 ± 0.01 vs 0.86 ± 0.01 , $p<0.001$) respectively. However, ALP was significantly lower in patients with PKU (73.3 ± 4.9 vs 89.0 ± 3.6 , $p=0.01$) while there were no significant differences in PTH or 25-OHD.

Children with PKU compared to controls had increased UCa/UCr ratio (0.46 ± 0.05 vs 0.22 ± 0.01 , $P<0.001$), TmP/GFR (7.43 ± 0.38 vs 5.65 ± 0.18 , $p<0.001$), lower UP/UCr (1.54 ± 0.26 vs 2.58 ± 0.16 , $P<0.001$) and lower UOH-Pr/UCr (0.026 ± 0.003 vs 0.086 ± 0.004 , $P<0.001$).

Our data showed no significant differences in biochemical indices between the PKU subgroups according to sex and age, except for serum P which was higher in patients under 8 years of age compared to older group ($P=0.02$).

Compliance with dietary therapy

The mean values of blood Phe levels did not differ significantly between boys and girls, while it was significantly higher in patients of over 8 y. Only 3/22 PKU children aged <8 y had Phe value of >10 mg/dl, in contrast to 21/26 of the older group. Age was positively correlated with the Phe concentration ($r=0.60$, $p<0.001$) inversely with BD ($r=-0.49$, $p<0.001$) and the ratio of artificial/natural protein taken by patients ($r=-0.46$, $P<0.001$).

Discussion

For many years, the mental and physical development in patients with PKU has been the field of intensive research. Our data showed, as it has been previously reported from our group, that physical growth of PKU children and adolescents is normal. However, there are few reports on the long-term effects of this disorder or dietary treatment on bones and other

systems.

This study, using the SPA, showed a significant bone demineralization in PKU patients over the age of 8 years. The degree of bone loss correlated significantly with age and dietary compliance (mean Phe). These findings are in agreement with a previous report by McMurry et al in 1992 who studied 26 children using also SPA technique. They found that bone mineral content increased normally in preschool children. On the other hand, children aged over 8 years had significantly reduced bone mineral content, the cause of which was considered to be poor dietary control. By contrast, a recent study Allen et al, using DXA, studied 32 prepubertal children did not find correlation between bone mineral density (BMD) and Phe nor BMD and dietary intake. However, they reported significantly lower total and spinal BMD than controls ($P < 0.03$ and $P < 0.003$ respectively), despite the significantly higher calcium ($P < 0.001$) and magnesium ($P < 0.001$) daily intake by patients than controls. More recently, Hillman and colleagues who studied lumbar spine and low extremities by DXA supported the previous data. Measurements in 11 PKU patients, aged (10.9 ± 4.2), showed decreased bone mineral content ($P < 0.05$). Carson et al, using the lumbar spine CT reported a significant reduction in mineral content of trabecular bone in 4 out of 11 patients with PKU, aged 19 to 34 years. Also the authors found a significant correlation between bone mineral content and dietary assessment of calories, natural protein, calcium and copper.

One of the most important observations of this study and that of McMurry is the fact that strict dietary compliance giving desired blood Phe concentrations may promote normal bone mineralization. The reason that Allen et al failed to find a correlation between BMD and dietary compliance could be that they studied only prepubertal subjects, mean age 7.7 ± 2.3 , (girls < 10 and boys < 12 y). It should be noted that taking all reported data into account, including ours, it would appear that a problem with bone mineralization at all ages does indeed exist. This problem tends to escalate in adolescence probably due to poor dietary compliance. This hypothesis can be proved by our data as the older patients had higher Phe and the ratio of artificial/natural protein was inversely correlated with age. However, regardless of that our patients had normal pubertal status the contribution of

endocrine status should not be excluded.

In our PKU children ALP was significantly decreased compared to controls ($p=0.01$). McMurry et al [8] showed significantly lower total ALP in preschoolers, grade-schoolers and old subjects with PKU. More recently Hillman et al found a significant decrease in both total and bone specific ALP ($P<0.001$) and osteocalcin ($P<0.05$). Our data showed higher values of serum Ca and Mg in PKU subjects than controls whereas others have reported significantly decreased levels, despite adequate calcium intake. The most impressive abnormality found was the increased excretion of Ca in urine in PKU children vs controls (UCa/UCr 0.46 ± 0.05 Vs 0.22 ± 0.01 , $p<0.001$). UCa/UCr did not correlate with age or serum Phe concentrations. The other important findings in biochemical indices studied in urine is the lower urine phosphorus (UP/UCr) ($p<0.001$) and the higher tubular reabsorption of phosphorus. These parameters have not been studied sufficiently. There is only one recent study by Allen et al. who reported normal values of UCa/UCr but agreed with our data regarding phosphorus.

Recently, Greeves et al studied 85 PKU patients, aged 0.3-33 y, and found a higher incidence of reported fractures after the age of 8 years than in controls but not in the PKU population as a whole. These data support our data and that of McMurry. In this age group patients start to have poor compliance to diet. We would agree with McMurry suggestion that elevation of the plasma Phe concentration and the excretion with its metabolites lead to increased mineral loss in urine. Our data could support this hypothesis as 19/48 (40%) of patients had abnormal values for UCa/UCr (>0.40 mmol/mmol) according to our laboratory normal values. The combination of low OH-Pr and phosphorus in urine, decreased serum ALP in PKU patients indicates decreased bone formation activity.

The fact is that adolescence is a critical period because it is associated with rapid increase in height and bone mineralization. It is clear from the data that osteopenia is commonly found in PKU patients from early life. Therefore, subjects with PKU may not achieve the optimal bone mineral content and may be at risk of osteoporosis. The data reported herein indicate the recommendation that dietary Phe restriction should be

continued into adulthood.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen JR, Humphries IRJ, Waters DL et al. Decreased bone mineral density in children with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1994; 59; 419-22.
- Antonarakis S, Philips J and Kazazian H. Genetic diseases: diagnosis by restriction endonuclease analysis. *J of Pediatrics* 1982;100,845-9.
- Antonarakis S, Philips III J et al. Φ-globulin locus is linked to the parathyroid hormone (PTH) locus and lies between insulin and PTH loci in man. *Proc Nat Acad Sci USA*:1983;80:6615-9.
- Austin LA, Heath H. Calcitonin. Physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* 1981;304:269-278.
- Azen C, Koch R, Gross-Friedman E et al. Intellectual development in 12-year old children treated for PKU. *Am J Dis Child* 1991;145:35-37
- Berry HK. Normal radiographic findings in treated phenylketonuric children (Letter). *J Pediat* 1973;83:175-176.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. *Acta Pediatr Scand* 1954;43:64.
- Bickel H, Backmann C et al. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *European J Pediat* 1981;137,133-6.
- Bistarakis L, Voskaki I, Lambadaridis J, Sereti I, Sbyrakis S. Renal handling of phosphate in the first six months of life. *Arch Dis Child* 1986 Jul;61(7):677-681.
- Bronner F, et al. Development and regulation of calcium metabolism in healthy girls. *J Nutr.* 1998 Sep;128(9):1474-80.
- Bord S, Horner A, Hembry RM et al. Production of collagenase by human osteoclasts and osteoclasts in vivo. *Bone* 1996 Jul;19(1):35-40.
- Broadus AE. Mineral metabolism in : Felig P. et al. eds. *Endocrinology and metabolism*. New york: McGraw-Hill 1981:963-1079.
- British Guidelines (1993) Medical Research Council Working Party of Phenylketonuria Recommendations on the Dietary management of Phenylketonuria. *Arch Dis Child*
- Carson DJ, Greeves LG, Sweeny LE, Crone MD. Osteopenia in phenylketonuria. *Pediatr Radiol* 1990;20:598-599.
- Chesney RW, Shore RM. The invasive determination of bone mineral content by photon absorptiometry. *Am J Dis Chil* 1982;136:578
- Christiansen C, Rodbro P, Jensen H. Bone mineral content in the forearm measured by photon absorptiometry. *Scand J Clin Invest* 1975;35=323-330.
- Collins D, Jansani C, Fogelman I, Swaminathan R. Vitamin D and bone mineral

- density. *Osteoporos Int* 1998;8(2):110-114.
- Collins D, Woods A, Herd R, Blake G et al. Insulin-like growth factor-I and bone mineral density. *Bone* 1998 Jul;23(1):13-16.
 - Curtius H, Heintel D, Ghisla S et al. Biosynthesis of tetrahydrobiopterin in man. *J Inher Metab Dis* 1985;8 (suppl 1),28-33.
 - Danks D, Bartholome K, Claytone B et al. Malignant hyperphenylalaninemia - current status. *J Inher Metab Dis* 1978;1,49-53.
 - Delmas PD. What do we know about biochemical bone markers? *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991 Dec;5(4):817-830.
 - Eastoe J.E.: Hard tissue mineralization. *Calcified Tissue International* 1984, Vol 36, S2: S60-62.
 - Eisensmith RC, Woo SLC. Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Paediatric* 1996; 155 [Suppl 1]:S16-S19.
 - Endres W. Diet in phenylketonuria: how long? Policies under decision. *Ann Nutr Metab.* 1998; 42(2): 63-67.
 - Feinberg S and Fisch R. Roentgenologic findings in growing bone in phenylketonuria. *Radiology* 1962;78:394-398.
 - Farriaux JP. Prenatal diagnosis of genetic diseases. Indications, methods, legal and ethic aspects. Neonatal screening of Phenylketonuria and hypothyroidism. *Rev Prat.* 1997 Dec 1; 47(19): 2159-2168.
 - Feinberg S, Fisch R. Bone changes in untreated neonatal PKU patients: A new radiographic observation and interpretation. *J Pediat* 1972;81:540-543.
 - Fisch R, Feinberg S, Weinbery S, Day D. Bony changes of PKU neonates unrelated to phenylalanine levels. *J Inher Metab Dis* 1991;14:890-895.
 - Fisch R, Gravem H, Feinberg S. Growth and bone characteristics of phenylketonurics. Comparative analysis of treated and untreated phenylketonuric children. *Am J Dis Child* 1966;112:3-10.
 - Flannery DB, Hitchcock E, Mamunes P. Dietary management of PKU from birth using a phenylalanine free product. *J Pediat* 1983;103,247-9.
 - Folling A: Utskille of jenyropyrodnesyre in urinen son stoffskifteanomali i forbindelse med imbecillitet. *Nord Med Tidskr* 1934;8:1054.
 - Fusetti F et al. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implication for phenylketonuria. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3; 273(27):16962-16967.
 - Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1996;59 Supp 1:S2-S9.
 - Glastre C, Braillon P, David L et al. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children. *J Clin*

Endocrinol Metab 1990;70:1330-1333.

- Gormach DH (1987) Ham's Histology. Ninth edition, JB Lippincott Company, Philadelphia.
- Greeves LG, Carson DJ, Magee A, Patterson CC. Fracture and phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1997; 86:242-2.
- Greeves LG, Thomas PS, Carson DJ. Radiological assessment of the hand and wrist in phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. *Pediatr Radiol* 1995;25 (5):353-355.
- Griffiths P et al. Neuropsychological outcome of experimental manipulation of phenylalanine intake in treated phenylketonuria. *J Inher Metab Dis*. 1998 Feb; 21(1):29-33.
- Gunnes M. Bone mineral density in the cortical and trabecular distal forearm in the healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* 1994; 83: 463-7
- Guthrie R and Susi A. A simple phenylalanine method for the detection of phenylketonuria in large population of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32,338-43.
- Jerris GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia: position of metabolic error. *J Biol Chem* 1974;169:651.
- Jinks DC, Guthrie R and Naylor E. Simplified procedure for producing bacillus subtilis spores for the Guthrie phenylketonuria and the microbiological screening test. *J Clin Microb* 1985;21:826.
- Johnston CC, Miller JZ et al. Calcium supplementation and increase in bone mineral density in children. *N Eng J Med* 1992 Jul 9;327(2):82-87.
- Hansen MA, Overgaard K, Riis, Christiansen C. Role of peak bone mass and loss in postmenopausal osteoporosis: 12 year study. *BMJ* 1991;303;961-4.
- Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod*. 1998 May;25(2):101-7.
- Hillman L, Schlotzhauer C, Grasela J, et al. Decreased bone mineralization in children with phenylketonuria under treatment. *Eur J Paediatr* (1996) 155 [Supp 1]: S148-152.
- Hui SL, Joohnston CC, Mazess JR. Bone mass in children and young adults. *Growth* 1985; 49; 34-43.
- Holick MF (1989). Vitamin D: Biosynthesis, metabolism, and model of action. Page 902 in: *Endocrinology*, 2nd ed. Vol. 2 DeGroot LJ et al (editors). Grune & Stratton.
- Hurley DL, Tiegs RD, and Wahner (1987): Axial and appendicular bone mineral density in patients with long-term deficiency or excess of calcitonin. *N Eng J Med* 317:537-541.
- Kalerro Vaananen H. Pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1991;49:511-512.
- Kaufman S. The phenylalanine hydroxylation cofactor in phenylketonuria. *Biochem*

Med 1976;15:42.

- Keutmann HT, Sauer RM, Hendy GN. Complete amino acid sequence of parathyroid hormone. *Biochemistry* 1978;17:5723-9.
- Kindt E, Halvorsen S, Lie O. Does a marginal protein intake result in osteoporosis. *J Inher Metab Dis* 1987;10:195.
- Koch R, Azen C et al (1984). Paired comparisons between early treated PKU children and their matched sibling controls on intelligence and school achievement tests, results at eight years of age.
- Koch R, Azen C, Freidmann G. Care of the adults with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* (1996) 155 [Supp 1]:90-92.
- Koch R, Wenz E. Phenylketonuria. *Ann Rev Nutr* 1987;7:117-35.
- Koch R, Azen CG, Friedman EG. Preliminary report on the effects of diet discontinuation in PKU. *J Pediatr* 1982; 100:870.
- Koch R, Azen CG, Friedman EG, Fisher K, Baumann FC, Lin T. Care of the adult with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996, 155 [Supp 1]:S90-S92.
- Kronenberg HM. Parathyroid hormone and osteocalcin--when friends become strangers. *Endocrinology*. 1997 Aug;138(8):3083-4.
- Kruse K, Kracht U. Evaluation of serum osteocalcin as an index of altered bone metabolism. *Eur J Pediatr* 1986;145 227-33.
- Kruse K (1989). Endocrine control of calcium and bone metabolism. *Clinical Pediatric Endocrinology*, p 487-507, Brook CGD, Blackwell scientific publication.
- Landin L, Nilsson E.B (1981). Forearm bone mineral content in children. *Acta Paed Scand*, 70:919-923.
- Lane JD and Neuhoff V. (1980). Phenylketonuria, Clinical and experimental considerations revealed by the use of animal models. *Naturwiss* 67:227.
- Ledger GA, Burritt MF, Kao PC et al. Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age related increases in bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Nov; 80(11):3304-3310.
- Lee ET (1992). *Statistical methods for survival data analysis*. New York: John Wiley and sons.
- Lehmann EL (1975). *Nonparametrics: Statistical methods based on ranks*. San Francisco: Hilden-Day.
- Levy HL. Phenylketonuria. *Ped Rev* 1987;7:269-75.
- Λυρίτης Γ. Μεταβολικά νοσήματα των οστών, 1991.
- Λυρίτης ΠΓ. Οστική Πυκνομετρία. *Οστούν* 1991, 2(2):71-76.
- Malluch HH, Fauger M.C. (1986). *Atlas of mineralized bone histology*.

Basel:Karger.

- Manzke E, Chestnut CH, Wergedal J. Relationship between local and total bone mass in osteoporosis. *Metabolism* 1975;24:605-15.
- Martin TJ et al. Cell biology of bone. *Ballieres Clin Endocrinol Metab* 1988 Feb;2(1):1-29.
- Martin TJ, NgSK, Suda T. Bone cell physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18:833-58
- McBurine MA, Kronmal RA, Schuett VE et al. Physical growth of children with phenylketonuria. *Ann Hum Biol* 1991;18:94-9
- McCabe ER, Nord AM, Ernst A, McCabe L. Evaluation of a phenylalanine-free product for treatment of PKU. *Am J Dis Child* 1987;141:1327-9.
- McKusick VA: Mendelian Inheritance in Man. 10th Edition, The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London; 1992, .
- McMurry MP, Chan GM, Leonard CO and Ernst SL. Bone mineral status in children with Phenylketonuria: relation to nutritional intake and phenylalanine control. *Am J Clin Nutr* 1992;55,997-1004.
- McSheely Pm, Chambers TJ. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid release soluble factor that stimulates osteocalcic bone resorption. *Endocrinol* 1986;119:1654-9.
- Mihatsch WA, Muche R, Pohlandt F. The renal phosphate threshold decreases with increasing postmenstrual age in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 1996 Aug;40(2):300-303.
- Miyamoto M, Fitzpatrick T. Competitive inhibition of mammalian tyrosinase by phenylalanine and its relationship to hair pigmentation in PKU. *Nature* 1957;179:199.
- Missiou-Tsagaraki S, Schoupli K and Loumakou M. Phenylketonuria in Greece: 12 year's experience. *J. Mental Dificiency Research* 1988;32,271-287.
- Molgaard C, Thomson B, Michaelsen K. Influence of weight, age and puberty on bone size and bone mineral content in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* 1998 May;87(5):494-499.
- Morreels C, Fletcher B et al. The roentgenographic features of homocystinuria. *Radiology* 1968;90=1150-1158.
- Morrison S and Kerr D. Roentgenologic findings in a case of tyrosinosis. *Peditrics* 1989;83=599-600.
- Niedwieser H, Curtius H et al. Atypical phenylketonuria with defective biopterin metabolism monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin. *European J Pediatr* 1982;138,110-12.
- O'Flynn ME, Holtz NA. The diagnosis of phenylektonuria. A report from the

collaborative study of children treated for phenylketonuria. *Am J Dis Child* 1980;134:769

- Okano Y, Eisensmith RC et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 1991;324:1232-1238.
- Osterste SI, Gold RH. Osteoporosis and bone density measurement methods. *Clin Prthop* 1991; 271:149.
- Partington MW. The early symptoms of phenylketonuria. *Pediatrics* 1961;27:465
- Pozanski A. Diagnostic clues in the growing events at bones. *J Can Assoc Radiol* 1978;29=7-12.
- Pratt OE. Transport inhibition in the pathology of phenylketonuria and other inherited disease. *J Inherit Metab Dis* 1982;2:19
- Price WJ: Analytical atomic absorption spectrometry, Hyden and son, London, 1972.
- Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Eng J Med* 1991;318:818-828.
- Rosselot G et al. Cellular basis of bone tissue development. *Rev Med Chil.* 1996 Aug;124(8Suppl):15-20.
- Schanau E, Rauch F (1997). Markers of bone and collagen metabolism – problems and perspectives in pediatrics. *Hormone Research* 48:50-59.
- Schepetkin I. Osteoclastic bone resorption: normal and pathological. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 Dec 15;832:170-93.
- Schwahn B, Mokov E, Schneidhauer K et al. Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography. *Acta Paediatr* 1998 Jan;87(1): 61-63.
- Shedlovsky A, McDonald JD, Symula D. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics* 1993; 134:1205-1210.
- Smith BR, Cammings SR, Steiger P. A comparison of morphometric definitions of vertebral fracture. *J Bone Mineral Res* 1991; 6:25-34.
- Sutherland BS, Umbarger B, Berry H. The treatment of phenylketonuria, a decade of results. *Am J Dis Child* 1966;111:505-23.
- Swaiman KF. Phenylalanine and phenylacetate adversely affect developing mammalian brain neurons. *Neurology* 1984;34:1246
- Σούληνη Κλεοπάτρα. Κλασσική φαινυλκετονουρία: μοναδική θεραπεία μια «ειδική» δίαιτα. *Παιδιατρική*; 1987;50:295-301.
- Teegarden D, Proulx WR et al. Peak bone mass in young women. *J Bone Miner Res* 1995 May; 10 (5):711-715.

- Tenenbaum HC, Heersche J: Differentiation of osteoblast and formation of mineralized bone. *Calcified Tissue International* 1982, Vol 34, P:76-79.
- Thalassinou NC, Leese B, Lathan SC et al. Urinary excretion of phosphate in normal children. *Arch Dis Child* 1970;46:269-72.
- Thompson AJ, Smith I, and Youl BD: Neurological deterioration in adults with phenylketouria. *Lancet* 1990; 336:602-605
- Thompson AJ, Smith I, Kendall BE, Youl BD (1991) MRI changes in early treated patients with phenylketouria. *Lancet* 337:1224
- Tiesgs RD, Body JJ, Wahner Calcitonin secretion in postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med* 1985; 312: 1097-1100.
- Udenfriend S, Bessman S. Hydroxylation of phenylalanine and antipyrine in phenylpyruvic oligophrenia. *J Biol Chem* 1953; 203:961
- Villasana D, Butler IJ, Williams JC (1989) Neurologic deterioration in adult phenylketonuria. *J Inherited Metab Dis* 12:451-457
- Wallace HW, Moldare K, Meister A. Studies on conversion of phenylalanine to tyrosine in phenylpyruvic oligophrenia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:632.
- Weaver CM. Use of calcium tracers and biomarkers to determine calcium kinetics and bone turnover. *Bone* 1998 May;22(5 Suppl):103S-104S
- Winer BJ, Brown (1991). *Statistical principles in experimental design*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill.
- Woo SL. Molecular basis and population genetics of phenylketonuria. *Biochemistry* 1989;28,No 1, 1-7
- Woodring JH, Rosenbaum HD. Bone changes in phenylketonuria reassessed. *Am J Roentgenol* 1981;137:241.
- Yamamoto M, Seedor JG et al. Endogenous calcitonin attenuates parathyroid hormone-induced cancellous bone loss in the rat. *Endocrinology* 1995, 136:788-795
- Zimolo Z, Wesolowski G, Rodan AG: Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone. *J Clin Invest* 1995; 96:2277-2283.