

**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Московской области «Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М. Ф. Владимирского»**

На правах рукописи

ЛОКТИОНОВА АННА СЕРГЕЕВНА

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ДИАГНОСТИКА
ЦЕНТРАЛЬНОГО ГИПОГОНАДИЗМА У ЖЕНЩИН**

14.01.02 – Эндокринология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, доцент

Иловайская Ирэна Адольфовна

Научный консультант:

Доктор биологических наук, доцент

Нефедова Лидия Николаевна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Определение, классификация, эпидемиология центрального гипогонадизма у женщин.....	14
1.2 Нейроэндокринные аспекты центрального женского гипогонадизма ...	18
1.3 Генетическая основа центрального гипогонадизма	26
1.3.1. Нейроразвивающие гены	28
1.3.2 Нейроэндокринные гены.....	30
1.4 Диагностика центрального гипогонадизма у женщин: современное состояние проблемы	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Характеристика включенных в исследование пациентов	38
2.2 Методы обследования	45
2.2.1. Общеклиническое обследование	45
2.2.2 Лабораторные методы обследования	46
2.2.3 Анализ экспрессии мРНК репродуктивно заинтересованных генов	47
2.3 Дизайн исследования.....	50
2.4 Статистическая обработка данных.....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
3.1 Оценка клинических показателей	52
3.2 Характеристики гормональных профилей пациенток с центральным гипогонадизмом.....	53
3.3 Определение базальных уровней гонадотропинов, значимых для диагностики центрального гипогонадизма	58
3.4 Дополнительные гормональные маркеры центрального гипогонадизма у женщин	61
3.5 Диагностическая ценность стимуляционной пробы с аналогом гонадолиберина (трипторелин) в диагностике центрального гипогонадизма у женщин.....	63
3.6 Генетические исследования	70

3.7 Алгоритм персонализированной диагностики центрального гипогонадизма у женщин.....	74
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
ВЫВОДЫ	85
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Центральный гипогонадизм (гонадотропная недостаточность) – синдром, характеризующийся снижением уровней периферических половых стероидов, которое происходит вследствие нарушений функционирования центральных звеньев репродуктивной оси – гипоталамуса и гипофиза. Центральный гипогонадизм (ЦГ) патогенетически является гипопитуитаризмом – недостаточностью тропных функций гипофиза [42]. Частота гипопитуитаризма по данным разных источников составляет около 0,45 на 1000 человек, что по сравнению с наиболее частыми эндокринопатиями – сахарным диабетом и заболеваниями щитовидной железы, распространенность которых составляет примерно 30:1000 и 9,5:1000 соответственно [9, 34] – является невысокой. По результатам различных систематических обзоров, гипопитуитаризм является независимым фактором повышения риска смертности [104, 116]. Эти пациенты имеют сниженную работоспособность, а также низкое качество жизни, что в целом увеличивает количество затрат на здравоохранение [37]. Частота генетически обусловленного идиопатического ЦГ составляет примерно 0,03 на 1000 среди мужчин и всего 0,008 на 1000 среди женщин [109]. Низкая частота этого состояния среди женщин, возможно, объясняет малое количество исследований в этой области относительно диагностики и тактики ведения женского ЦГ.

На сегодняшний день одной из приоритетных социальных и медицинских проблем является сохранение репродуктивного потенциала мужчин и женщин фертильного возраста. По данным разных исследований, частота бесплодных браков в Российской Федерации составляет 17,2-24% [2], при этом до четверти случаев бесплодного брака обусловлены эндокринным фактором, а именно – отсутствием овуляции у женщин репродуктивного возраста [11, 58]. Овуляторная дисфункция клинически проявляется аменореей (как первичной, так и вторичной)

и характерна для широкого спектра эндокринных расстройств. Распространенность аменореи, не связанной с беременностью или грудным вскармливанием, составляет примерно 3-5% среди женщин репродуктивного возраста [78, 87]; расстройствами работы центральных звеньев гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси (ГГЯО) – гипоталамуса и гипофиза – обусловлены около трети случаев вторичной аменореи [13, 93]. Сочетание аменореи на фоне гипоэстрогемии с низкими либо нормальными уровнями гонадотропных гормонов, при исключении других причин аменореи – основные характеристики синдрома ЦГ у женщин.

Этиология центрального гипогонадизма гетерогенна. Основные причины центрального гипогонадизма можно условно разделить на 2 группы: 1) возникший вследствие органического поражения хиазмально-селлярной области (ХСО) и 2) возникший на фоне интактного состояния ХСО. Обнаружение органического поражения ХСО при радиологических методах исследования упрощает диагноз ЦГ при наличии гипоэстрогенной аменореи.

При отсутствии органических причин центральный гипогонадизм становится диагнозом исключения [42] и вызывает сложности, т.к. диагностические критерии этого состояния на сегодняшний день не утверждены. Диагностика ЦГ у женщин на данный момент основывается на определении базальных уровней гонадотропинов (лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, ЛГ и ФСГ) у женщин с аменореей на фоне низкого уровня эстрадиола; при этом диагностически значимыми считаются и низкие, и нормальные (в пределах референсных значений) уровни ЛГ и ФСГ в сочетании с низкими уровнями периферических половых стероидов [19]. В то же время, точные диагностически значимые уровни ЛГ и ФСГ, указывающие на наличие центральной формы гипогонадизма, на данный момент остаются неясными даже по данным современных клинических рекомендаций, где употребляются формулировки «низкие» и «низконормальные» уровни гонадотропинов [19, 50]. Более того, имеется большое количество лабораторных методов исследования содержания гормонов в сыворотке крови; также

референсные значения широко варьируют между различными лабораториями и методами определения – все эти факты усложняют диагностику центрального гипогонадизма.

ЦГ может быть обусловлен генетически. В 1991г впервые была обнаружена мутация гена *KAL1 (ANOS1)*, ассоциированная с синдромом Каллманна, частным случаем ЦГ [43], и с тех пор количество генов-кандидатов на роль генетической причины ЦГ с каждым годом увеличивается. На сегодняшний день выявлено около 80 генов, участвующих в развитии и функционировании гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси [48]: при секвенировании этих генов у пациентов с центральным гипогонадизмом без органического поражения ХСО примерно в 50% случаев обнаруживаются мутации [24, 109]. Однако, примерно половина случаев идиопатического ЦГ (без поражения ХСО) остается без выявленной генетической причины.

Одной из характерных черт гормонального профиля у женщин при центральном гипогонадизме является отсутствие пиков секреции ЛГ, присутствующих у здоровых женщин с нормальным менструальным циклом [96, 108]. В 2008 году было проведено исследование, в ходе которого женщинам с ЦГ проводилось многократное измерение уровней гонадотропинов в течение 4 часов [3]: при сравнении с 4-часовым гормональным профилем здоровых женщин было выявлено достоверное снижение частоты и амплитуды пиков гонадотропинов; указанный метод, обладая высокой диагностической ценностью, является длительным и трудоемким, что препятствует его применению в широкой практике.

В связи с отсутствием пиков секреции ЛГ при центральном гипогонадизме, можно говорить о дефекте импульсной секреции гонадотропинов при этом состоянии. В литературе описаны пробы для диагностики расстройства импульсной секреции – например, в исследовании, проведенном с участием мужчин с центральным гипогонадизмом, проводилась проба с внутримышечным введением 0,1 мг аналога гонадолиберина короткого действия: у 90% пациентов с ЦГ уровень ЛГ через 1 час после введения не превышал 4 МЕ/л [76]. На данный

момент протокол проведения этой пробы при диагностике ЦГ у женщин не утвержден, как и диагностически значимые стимулированные уровни гонадотропинов.

Резюмируя, можно заключить, что диагностика ЦГ без органического поражения ХСО на сегодняшний день является весьма трудной задачей. Учитывая медицинскую и социальную проблемы центрального гипогонадизма у женщин репродуктивного возраста, существует необходимость разработки алгоритма диагностики данного состояния.

Цель исследования

Разработать дифференцированный подход к диагностике центрального женского гипогонадизма и внедрить алгоритм персонализированной диагностики этого состояния.

Задачи исследования

1. Выявить значимые для диагностики центрального женского гипогонадизма показатели базальных уровней гонадотропинов.
2. Изучить особенности гормональных профилей пациенток с центральным гипогонадизмом.
3. Определить диагностическую ценность стимуляционной пробы с аналогом гонадолиберина (трипторелин) в диагностике центрального гипогонадизма у женщин.
4. Изучить показатели количественной экспрессии генов *GNRH1*, *GNRHR*, *PROK2*, *CHD7*, *WDR11* и *DUSP6* при центральном гипогонадизме у женщин, оценить диагностическую значимость уровней экспрессии этих генов.
5. Разработать алгоритм персонализированной диагностики центрального гипогонадизма у женщин.

Научная новизна

Впервые выявлено, что базальные уровни гонадотропинов имеют высокую диагностическую ценность для подтверждения диагноза центрального гипогонадизма у женщин.

Установлено, что для центрального гипогонадизма на фоне органического поражения хиазмально-селлярной области дополнительным гормональным критерием является снижение уровней андрогенов, а для центрального гипогонадизма на фоне интактного состояния хиазмально-селлярной области – снижение уровня пролактина.

Установлено, что при идиопатическом центральном гипогонадизме в ходе пробы с аналогом гонадотропин-рилизинг гормона короткого действия высокой диагностической ценностью обладает значение стимулированного уровня ЛГ.

Доказано, что при центральном гипогонадизме без органического поражения хиазмально-селлярной области по сравнению со здоровыми женщинами отмечается значимое повышение экспрессии мРНК генов PROK2, WDR11 и DUSP6, продукты которых участвуют в становлении и функционировании репродуктивной оси.

Впервые разработан и внедрен алгоритм персонализированной диагностики центрального гипогонадизма у женщин, включающий определение базальных уровней гонадотропинов, дополнительных гормональных критериев, стимулированных в ходе пробы с аналогом гонадотропин-рилизинг гормона уровней гонадотропинов, а также количественной экспрессии репродуктивно заинтересованных генов.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана научная концепция тактики обследования пациентов, которая делает возможным получение информации, необходимой для обоснованной

персонифицированной диагностики центрального гипогонадизма в каждом случае.

Решена научная задача использования данных гормонального обследования для постановки диагноза: доказано, что определенные базальные уровни гонадотропинов могут быть использованы как в диагностике центрального гипогонадизма, так и при дифференциальной диагностике его различных форм.

Выявлены дополнительные гормональные показатели (общий тестостерон и ДГЭАС для центрального гипогонадизма на фоне органического поражения хиазмально-селлярной области, уровень пролактина – для идиопатического центрального гипогонадизма), для обоснованной персонифицированной диагностики причин гипоэстрогенной аменореи у женщин репродуктивного возраста.

Доказано, что использование стимуляционной пробы с аналогом ГнРГ и количественного исследования геной экспрессии при обследовании позволяет повысить точность диагностики и решает задачу научного обоснования диагноза в сомнительных случаях.

Данные гормонального обследования, рекомендованные разработанным алгоритмом, являются специфичными и чувствительными ориентирами для того, чтобы заподозрить и далее подтвердить диагноз ЦГ. Алгоритм диагностики прост в применении, помогает определить последовательность применения диагностических методов, а также дополняет диагностические критерии центрального гипогонадизма и позволяет систематизировать обследование пациенток с гипоэстрогенной аменореей.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются пациентки с центральным гипогонадизмом на фоне органического поражения хиазмально-селлярной области (группа органического ЦГ) или без него (группа идиопатического ЦГ).

Предмет исследования – разработка алгоритма диагностики центрального гипогонадизма у женщин.

Методология и методы исследования

Методологической особенностью исследования является дифференцированный персонализированный подход к диагностике центрального гипогонадизма у женщин. Были использованы методы общеклинического обследования (осмотр, опрос), лабораторные методы: определение гормональных показателей, генетические исследования. Для обработки полученных результатов применялся статистический метод с использованием средств программ Microsoft Office Excel (пакет Office 365 от 2020г.) и GraphPad Prism версии 8.0.1. Полученные в ходе статистического анализа данные легли в основу разработанного алгоритма, позволяющего индивидуализировать подход к диагностике и дифференциальной диагностике женского центрального гипогонадизма.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что уровни лютеинизирующего гормона $<2,36$ МЕ/л и фолликулостимулирующего гормона $<5,08$ МЕ/л, исследованные хемилюминисцентным методом, свидетельствуют о наличии центрального гипогонадизма у женщин с гипоэстрогенной аменореей с высокими чувствительностью и специфичностью, что делает возможным использование их в качестве диагностических критериев этого заболевания.
2. Показано, что уровни лютеинизирующего гормона $<1,95$ МЕ/л и фолликулостимулирующего гормона $<4,22$ МЕ/л в сочетании с уровнями общего тестостерона $<0,69$ нмоль/л и дегидроэпиандростерон-сульфата <3 мкмоль/л с высокими чувствительностью и специфичностью указывают на наличие центрального гипогонадизма на фоне органического поражения

хиазмально-селлярной области и могут быть использованы как критерий установления этого диагноза у женщин с гипоэстрогенной аменореей.

3. Обосновано, что в сомнительных случаях, при уровнях лютеинизирующего гормона $>2,36$ МЕ/л и фолликулостимулирующего гормона $>5,08$ МЕ/л, но в пределах референсных значений, а также при отсутствии органического поражения хиазмально-селлярной области повысить точность диагностики идиопатического центрального гипогонадизма и научно обосновать диагноз могут стимуляционная проба с аналогом гонадотропин-рилизинг гормона короткого действия трипторелином, обладающая высокой прогностической ценностью, и метод количественной экспрессии генов *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6*.

Степень достоверности и обоснованность результатов исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования определяется достаточной выборкой (78 пациентов и 68 добровольцев контрольной группы), использованием современных лабораторных, инструментальных и статистических методов исследования и анализа.

Результаты работы доложены и обсуждены на конференциях «ISGE World Congress 2016» (Италия, Флоренция 2-5 марта 2016г.), 4th EYES (European Young Endocrine Scientists) Meeting (Россия, Москва, 22-24 сентября 2016г.), 19th European Congress of Endocrinology (Португалия, Лиссабон, 20-23 мая 2017г.), ISGE World Congress 2018 (Италия, Флоренция 7-10 марта 2018г.), Международный молодежный форум «Ломоносов 2019» (Россия, Москва, 10-13 апреля 2019г.), 22nd European Congress of Endocrinology (e-ECE 2020, online-конференция, 5-9 сентября 2020г.), ISGE World Congress 2020 (online-конференция 4-7 декабря 2020г.), 23rd European Congress of Endocrinology (e-ECE 2021, online-конференция, 22-26 мая 2021г.).

Апробация и внедрение результатов исследования

Проведение диссертационного исследования было одобрено независимым комитетом по этике ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского (протокол № 2 от 11.02.2020 г.). Апробация работы состоялась на совместной конференции научных и клинических подразделений ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского (протокол заседания ученого совета № 13 от 31.08.2021 г.).

Результаты работы внедрены и применяются в клинической работе для ведения пациенток с центральным гипогонадизмом в ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского» (акт внедрения от 13.09.2021г.). Кроме того, результаты исследования внедрены в учебный процесс и применяются при обучении слушателей на кафедре эндокринологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского» (акт внедрения от 30.07.2021г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации «Персонализированная диагностика центрального гипогонадизма у женщин» соответствуют паспорту специальности 14.01.02 – «Эндокринология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, а именно п. 3 «выявление молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к эндокринным болезням», п.4 «этиология и патогенез эндокринных заболеваний, клинические проявления, методы диагностики заболеваний эндокринной системы с использованием клинических, лабораторных, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика различных форм нарушения гормональной регуляции».

Личный вклад автора

Автор работы самостоятельно осуществила анализ российских и зарубежных источников литературы по теме диссертационной работы, сформулировала цель и задачи научного исследования. Автору принадлежит определяющая роль в выполнении протокола исследования, систематизации и обработке полученных данных, обосновании выводов и практических рекомендаций. Автором самостоятельно проанализированы и подготовлены к публикации основные полученные результаты работы. Также автор неоднократно представляла результаты работы на российских и международных конференциях.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 15 печатных работ, из них 5 – в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 2 патента на изобретение и 4 работы в изданиях, индексируемых в Scopus или Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы; иллюстрирована 28 рисунками, содержит 19 таблиц; список литературы включает 123 источника, из них 13 отечественных и 110 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Определение, классификация, эпидемиология центрального гипогонадизма у женщин

Центральный гипогонадизм (ЦГ) – синдром, в основе которого лежит нарушение продукции, секреции и/или биологического действия гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), являющегося главным гормональным регулятором гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси у человека. У женщин клинически это состояние проявляется либо задержкой/отсутствием пубертата в случае раннего манифеста, либо вторичной аменореей и бесплодием при развитии после менархе. Для женского ЦГ характерно сочетание аменореи на фоне гипоестрогемии с низкими либо нормальными уровнями гонадотропных гормонов, при исключении других причин. В литературе для обозначения данного состояния используются также термины «изолированная недостаточность гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ)» (Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency (IGD)); «гипогонадотропный гипогонадизм», ГГ (hypogonadotropic hypogonadism, HH). Учитывая тот факт, что при дисфункции гипоталамуса и гипофиза могут быть выявлены уровни гонадотропинов в пределах референсных значений при наличии дефекта их импульсной секреции, термин «центральный гипогонадизм», указывающий на расстройство функционирования центральных звеньев репродуктивной оси наиболее полно описывает патогенез этого синдрома.

ЦГ у женщин является важной социальной и медицинской проблемой ввиду большого количества бесплодных браков, обусловленных ановуляторным бесплодием. Частота встречаемости патологической аменореи, т.е. аменореи не связанной с беременностью, грудным вскармливанием и постменопаузой, в популяции составляет примерно 3-5%, при этом к наиболее частым причинам относят: синдром поликистозных яичников, гипоталамическую аменорею, гиперпролактинемию и недостаточность яичников [93]. Эта классификация согласуется с предложенными ВОЗ группами нарушения овуляции [74, 83]:

- группа 1: ановуляторное состояние (10% в структуре овуляторной дисфункции). Включают гипогонадотропный гипогонадизм, характеризующийся низкими уровнями эстрадиола и гонадотропинов;

- группа 2: расстройства овуляции (80%). Уровни ЛГ, ФСГ и эстрадиола в пределах нормы. Наиболее частая нозология такого типа – синдром поликистозных яичников (СПКЯ);

- группа 3: овуляторная дисфункция, вызванная яичниковой недостаточностью (10%). Уровни ЛГ и ФСГ составляют более 25 ЕД/л, уровень эстрадиола низкий [30, 92].

По этиологическому фактору условно можно выделить две основных формы ЦГ: генетически обусловленный и органически обусловленный (возникший в результате органического поражения хиазмально-селлярной области головного мозга). Характеристики этих форм ЦГ представлены в таблице 1 (стр. 16).

Распространенность генетически обусловленных врожденных форм ЦГ среди женщин составляет примерно 1:125 000 [109]; что касается приобретенных форм, нарушениями работы центральных звеньев репродуктивной оси (гипоталамуса и гипофиза) обусловлены до 35% вторичной аменореи [13]; на сегодняшний день накоплены данные о генетической предрасположенности к развитию ФГА [23]. Врожденный центральный (гипогонадотропный) гипогонадизм является редким заболеванием, и в Российской Федерации относится к орфанным [10].

Случаи ЦГ на фоне органических поражений хиазмально-селлярной области этиологически обусловлены физическим воздействием на клетки гипофиза. При необратимом разрушении 70-75% клеток аденогипофиза развивается та или иная недостаточность тропных функций; когда разрушено 90% и более, возникают признаки пангипопитуитаризма [4]. Также причиной может быть повреждение клеток гипоталамуса либо нарушение связи между двумя центральными звеньями репродуктивной оси – гипоталамусом и гипофизом.

Факторы этого разрушительного физического воздействия могут быть разделены на группы:

1) опухоли (аденомы гипофиза, краниофарингомы и другие опухоли центральной нервной системы, локализованные в ХСО);

2) хирургические вмешательства в этой области, причинами которых могут быть опухолевые процессы;

3) инфильтративные заболевания (например, гемохроматоз, саркоидоз, гистиоцитоз), с локализацией патологического процесса в области гипофиза и гипоталамуса;

4) облучение ХСО (телегамма- или рентгенотерапия), и другие редкие причины; например, травма головы или субарахноидальное кровоизлияние могут быть этиологическим фактором ЦГ [122].

Таблица 1

Этиологическая структура форм центрального гипогонадизма у женщин [8]

Формы ЦГ Характеристики	Генетически обусловленные		Органически обусловленные	
	Врожденные (СК ¹ , нЦГ ²)	Приобретенные (ФГА ³)	Манифест до пубертата	Манифест после пубертата
Спонтанное менархе	Отсутствует	Присутствует, в старшем возрасте по сравнению со здоровыми добровольцами [3]	Отсутствует	Присутствует
Картина ХСО ⁴ по данным визуализирующих методов исследования	Интактное состояние ХСО	Интактное состояние ХСО	Органическое поражение	Органическое поражение ХСО

¹ СК – синдром Каллманна

² нЦГ – нормосмическая форма центрального гипогонадизма

³ ФГА – функциональная гипоталамическая аменорея

⁴ ХСО – хиазмально-селлярная область

Большое количество пациентов со структурными поражениями ХСО имеют сочетанный дефицит тропных функций гипофиза – гипопитуитаризм [41]. Именно поэтому при наличии ЦГ рекомендуется проведение МРТ ХСО (особенно при наличии симптомов масс-эффекта опухоли – головная боль, дефекты полей зрения), и в случае наличия в этой области органической патологии – исследование для исключения нарушения тропных функций гипофиза.

Распространенность гипопитуитаризма (возможно, недооцененная) составляет около 45 случаев на 100 000, с частотой возникновения новых случаев примерно 4 на каждые 100 000 человек ежегодно [42]. При этом в одном из масштабных эпидемиологических исследований, включавшим суммарно почти 300 тыс. человек, было установлено, что частота гонадотропной недостаточности выше всех остальных составляющих гипопитуитаризма: дефицит ЛГ и/или ФСГ встречался в 87% случаев, в то время как недостаточность ТТГ, АКТГ, гормона роста, пролактина и АДГ имела распространенность 64%, 62%, 61%, 17% и 20% соответственно [97].

Опухолевые поражения хиазмально-селлярной области являются одной из частых причин органического ЦГ. В целом, среди всех причин, приводящих к развитию гипопитуитаризма, ведущую роль отводят аденомам гипофиза – до 40% в этиологической структуре, и около 27% – это вклад гормонально-неактивных опухолей [97]. Второй по частоте причиной развития гипопитуитаризма у взрослых называют внегипофизарные объемные образования – краниофарингиомы, менингиомы и пр. В настоящей же работе в этиологической структуре органического ЦГ превалируют краниофарингиомы – оперированные или нет. Причиной этого несоответствия служит факт того, что краниофарингиомы обычно развиваются в детском возрасте – пик заболеваемости 5-14 лет [6], поэтому по данным эпидемиологических исследований краниофарингиомы не имеют широкой представленности в этиологической структуре первичной заболеваемости гипопитуитаризмом среди взрослых.

В литературе отдельное внимание уделяется вопросам центрального гипогонадизма при наличии гормонально-активных опухолей гипофиза –

нарушению гонадотропной функции на фоне гиперпролактинемии, акромегалии, болезни Иценко-Кушинга [62, 119], когда помимо масс-эффекта опухоли репродуктивная ось претерпевает воздействие избыточного количества пролактина, гормона роста или кортизола соответственно – но эта проблема лежит за пределами интереса настоящей работы.

Среди пациенток с органическим ЦГ в данной работе присутствует 1 случай ЦГ после травматического повреждения мозга. По данным систематического обзора 2007 года [102] общая распространенность гипопитуитаризма после ЧМТ составляет 27,5%; доля нарушения тропных функций гипофиза в представленных в обзоре исследованиях колеблется от 15% до 68%.

1.2 Нейроэндокринные аспекты центрального женского гипогонадизма

Еще в 1955 г. Дж.Харрисом была предложена модель структуры гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси человека. В нее, кроме гипоталамуса, аденогипофиза, периферических половых желез включены также органы-мишени половых стероидов и экстрагипоталамические структуры центральной нервной системы – а именно, кора головного мозга, осуществляющая связь между внешней средой и нижележащими компонентами оси [55] (рисунок 1 на стр. 19).

В 1971 году была выделена химическая субстанция, опосредующая влияние гипоталамуса на гипофиз; это соединение получило название ЛГ-рилизинг гормон (или ЛГ-рилизинг фактор); на сегодняшний день мы знаем его как гонадотропин-рилизинг гормон, ГнРГ [101].

ГнРГ, вырабатываемый в аркуатных ядрах гипоталамуса, секретируется в гипофизарную портальную циркуляцию срединного возвышения. Затем с током крови по длинным портальным сосудам он поступает в переднюю долю гипофиза (аденогипофиз), где стимулирует гонадотрофы посредством активации располагающегося на их поверхности мембранного ГнРГ-рецептора 1 типа. Регуляция секреции ГнРГ происходит не только эндокринным, но и паракринным путем. Нейроны гипофиза так же, как и нейроны гипоталамуса секретируют

ГнРГ, но в меньшем количестве. При этом выброс ГнРГ гипофизом предшествует эпизоду секреции ЛГ им же [67].

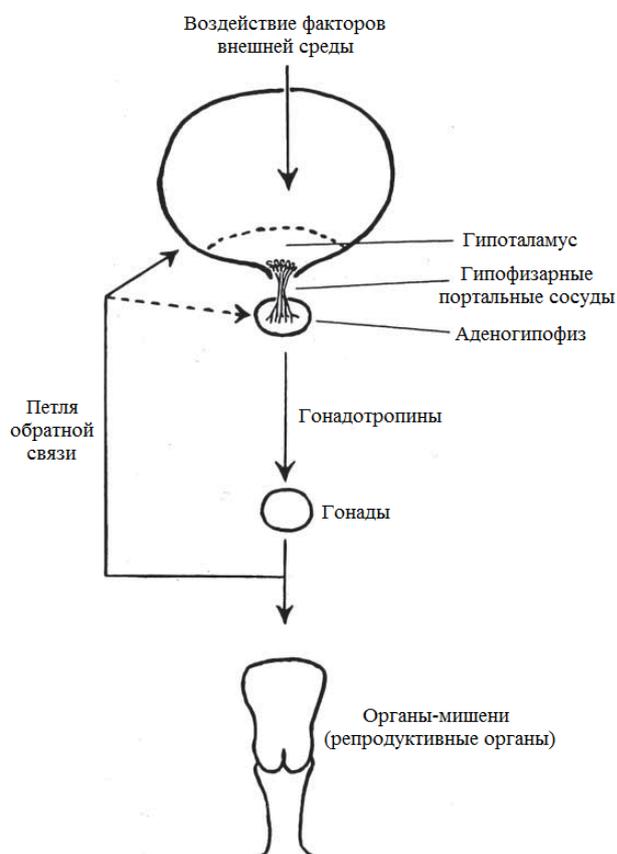


Рисунок 1 – Модель гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, предложенная Дж. Харрисом в 1955 г. для иллюстрации взаимосвязи между внешней средой и репродуктивными органами [91] (адаптировано).

За половое развитие и нормальную работу репродуктивной и менструальной функций у женщин отвечает пульсирующий паттерн секреции ГнРГ. Как уже сказано, ГнРГ посредством воздействия на гонадотрофы активирует синтез лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, которые являются гликопротеиновыми димерами. При увеличении частоты пиков секреции ГнРГ стимулируется синтез β -субъединицы ЛГ (ген *LHB*), с максимальной секрецией при частоте около 1 пика каждые 30 минут [52]. Напротив, снижение частоты пульсов секреции приводит к стимуляции синтеза β -

субъединицы ФСГ (ген *FSHB*), с максимумом при частоте пиков каждые 120 минут [51]. α -субъединица ЛГ и ФСГ является общей для этих гормонов, секретируется и при постоянной, и при пульсирующей секреции ГнРГ и не зависит от альтерации частоты пиков его секреции.

Таким образом, благодаря нормальной частоте и амплитуде пиков секреции ГнРГ в разные периоды менструального цикла секретируется различное количество гонадотропинов. Они же, в свою очередь, руководят фолликулогенезом и стероидогенезом в яичниках [108]. Дисрегуляция работы гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси (ГГЯО) выражается различными нарушениями менструального цикла, в том числе аменореей; как уже было упомянуто, расстройствами работы центральных звеньев гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси (ГГЯО) – гипоталамуса и гипофиза – обусловлены до трети случаев вторичной аменореи [13].

Пульсирующий характер секреции ГнРГ модулируется большим количеством нейромедиаторов; последние годы ознаменованы увеличением количества исследований этих процессов. Широко обсуждается влияние на работу ГГЯО таких субстанций, как кисспептин, нейрокинин В, динорфин, нейропептид Y, лептин, а также грелин, кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ), бета-эндорфин и аллопрегненолон.

Белок кисспептин был открыт в 1996 году; мРНК этого соединения была выделена из тканей неметастазирующей меланомы, тогда как в тканях метастазирующей опухоли мРНК кисспептина выявлено не было. В связи с этим фактом белок получил название «метастатин» [82]. В дальнейшем была открыта crucialная роль этого пептида в половом созревании и репродукции, что привело к его переименованию; свое современное название пептид получил в честь шоколадных конфет Kiss (поцелуй), фабрика по производству которых «The Hershey company» находилась в том же г. Херши, где и лаборатория. Позднее было показано, что этот белок секретируется определенными нейронами

гипоталамуса (Kiss-нейроны), и изучено его многогранное стимулирующее влияние на секрецию ГнРГ.

В 2003 году две независимые группы ученых одновременно выявили аутосомно-рецессивный тип наследования мутации гена *KISS1R* (ранее известный как *GPR54*), который приводит к развитию нормосмической формы центрального гипогонадизма (нЦГ) [103]. Белок *KISS1R* – рецептор, основным лигандом которого является кисспептин-1 (ранее также известный как кисспептин-54). Ген самого кисспептина (*KISS1*) является исключительно важным в работе репродуктивной оси, и мутации в нем описаны как одна из причин нЦГ [82].

На сегодняшний день эта лиганд-рецепторная пара является самым мощным известным активатором ГнРГ-нейронов. Кисспептин, воздействуя на свой рецептор на ГнРГ-нейронах, потенцирует и экспрессию, и секрецию ГнРГ [85]. В ходе исследований эта исключительная роль кисспептина в репродуктивной функции млекопитающих была показана и у животных [84], и у людей: на контрольной группе здоровых добровольцев-мужчин было продемонстрировано дозозависимое увеличение уровня ЛГ при введении им кисспептина-10, и, в меньшей степени – прирост уровней ФСГ и тестостерона [46]. Что примечательно, в исследовании влияния введения кисспептина на уровни половых гормонов у здоровых женщин было выявлено, что уровни гонадотропинов увеличивались только при введении кисспептина-10 в преовуляторную фазу цикла, и не изменялись при внутривенном и подкожном его введении в фолликулярную фазу [60]. Измерение ГнРГ в периферической крови напрямую является технически сложным ввиду его малого содержания, поэтому влияние кисспептина на выработку ГнРГ оценивалось опосредованно через повышение уровней гонадотропинов.

Кроме уже упомянутых влияний кисспептина, увеличение частоты его импульсной секреции дает старт половому созреванию у человека [32, 89].

Посредством иммуногистохимических исследований на животных было установлено, что около 75% располагающихся в аркуатных ядрах гипоталамуса Kiss-нейронов коэкспрессируют нейрокинин В и динорфин. Эта субпопуляция

нейронов была названа KNDy-нейронами [49]. Предполагается, что в процессе генерации пульсов ГнРГ, в котором кисспептин является активирующим посредником, исходящие из KNDy-нейронов импульсы нейрокина В и динорфина являются, соответственно, старт- и стоп- сигналом [72]; иными словами, нейрокин В и динорфин являются аутоинаптическими регуляторами секреции кисспептина, и в этой цепи взаимодействий нейрокин В является стимулятором, а динорфин – ингибитором.

Таким образом, Kiss-нейроны и выделяемые ими биологически активные субстанции представляют собой весьма значимые элементы управления ГнРГ-импульсами. В то же время, на сегодняшний день существует ряд открытых вопросов в этой области, например касающийся субпопуляции KNDy-нейронов и процессов аутоинаптического регулирования их работы у человека [71], т.к. ранее иммуногистохимические исследования проводились в основном на животных моделях.

Еще одним важным модификатором работы ГГЯО является лептин. Его можно рассматривать как посредника между энергетическим обменом и кисспептином, на который возложена основная часть регуляторных функций.

Лептин – это белок, продуцируемый в основном жировой тканью, но также его синтез обнаруживается в плаценте, желудке и скелетных мышцах [22]. Концентрация циркулирующего в периферической крови лептина имеет прямую связь с количеством жировой ткани в организме, и на гипоталамическом уровне лептин выступает в качестве маркера сытости [123]; это объясняет историю открытия его гена – учеными был предпринят поиск «гена ожирения» на модели мышей, и были найдены мутации генов *LEP* и *LEPR*, кодирующих лептин и его рецептор соответственно [31]. В то же время, у лептина имеется независимая от количества жировой ткани точка воздействия на репродуктивную систему: было показано, что ограничение количества пищи у мышей с ожирением, вызванным нокаутом гена лептина и/или его рецептора не улучшает их репродуктивную функцию [27], но введение рекомбинантного лептина таким животным

восстанавливает их фертильность [22]. На сегодняшний день известны механизмы этого влияния, и они приведены ниже.

После секреции лептина в кровоток он достигает гипоталамуса и действует на его уровне следующими способами: 1) подавляет активность NPY-нейронов (секретирующих нейропептид- Y), посредством чего снижает ингибирование KISS-нейронов нейропептидом Y и уменьшает тягу к приему пищи; 2) активирует синтез меланоцит-стимулирующего гормона (МСГ), функцией которого является подавление аппетита, POMC-нейронами и 3) прямо воздействует на субпопуляцию KISS-нейронов для дальнейшего усиления стимулирующего воздействия на синтез и секрецию ГнРГ [109]. Таким образом, исследованиями была подтверждена функциональная связь между лептином и кисспептином. Было показано, что введение лептина ведет к повышению экспрессии гена *KISS1* в гипоталамусе [33]. В то же время, при селективной делеции гена рецептора лептина в KISS-нейронах в эксперименте на мышах не выявлено значимого влияния на способность животных достигать половой зрелости и нормально реализовывать репродуктивную функцию [35]; этот факт подтверждает наличие иных путей влияния лептина на нормальный пубертат и фертильность, в том числе через нейропептид Y . На основании этих данных можно заключить, что кисспептин, лептин и нейропептид Y физиологически связаны между собой и составляют комплекс, активирующий секрецию ГнРГ. Таким образом, лептин способен воздействовать сразу на три популяции нейронов: NPY, KISS (KNDy) и POMC, при этом не имея прямого влияния на ГнРГ-нейроны.

С учетом вышеперечисленных фактов роль лептина в репродукции можно описать так:

- 1) в условиях низкого содержания жировой ткани в организме концентрация лептина также будет низкой – соответственно, снизится амплитуда стимула к высвобождению ГнРГ;
- 2) при оптимальном содержании жировой ткани и, соответственно, лептина секреция ГнРГ будет циклической, что приведет к физиологичным овуляторным менструальным циклам;

- 3) ожирение способно вызвать резистентность к лептину (показано для KNDy-нейронов), что будет негативно влиять на секрецию ГнРГ и, соответственно, снижать фертильность [123].

С учетом прямой взаимосвязи уровня лептина и количества жировой ткани не вызывает удивления факт наличия низких уровней лептина у женщин с функциональной гипоталамической аменореей (ФГА) на фоне снижения массы тела. Есть данные об успешных попытках терапии ФГА рекомбинантным лептином [29].

Небезынтересным игроком в нейроэндокринном равновесии репродуктивной оси является грелин – биологически активное вещество, проявляющее себя в этом поле как ингибитор: область его ответственности – это поддержание аменореи в случае недостаточной массы тела женщины до тех пор, пока ее масса тела не нормализуется. По этой причине у женщин, страдающих функциональной гипоталамической аменореей, которая является одним из частных случаев ЦГ, выявляются более высокие уровни грелина, чем у женщин с регулярным овуляторным менструальным циклом [115].

Один из релизинг-гормонов – кортикотропин-релизинг гормон (КРГ) – регулирует не только работу гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, но и ГГЯО. Стресс (физический и/или психологический) потенцирует повышение уровня КРГ в пределах центральной нервной системы. КРГ стимулирует синтез и секрецию адренкортикотропного гормона (АКТГ) кортикотрофами гипофиза, а также секрецию других проопиомеланокортин-ассоциированных пептидов (бета-эндорфин и бета-липотропный гормон); АКТГ, в свою очередь, стимулирует секреторную активность клеток коры надпочечников, что ведет в первую очередь к повышению уровня кортизола. Высокий уровень глюкокортикоидов в плазме крови ингибирует секрецию ГнРГ и, как следствие, и синтез гонадотропинов. Указанный механизм описывает стресс-ассоциированный вариант развития функциональной формы ЦГ – ФГА, и подтверждается данными большого количества исследований, в ходе которых подтвержден более высокий уровень

кортизола крови у женщин с гипоталамической аменореей по сравнению со здоровыми женщинами [77, 100, 110].

Среди нейроэндокринных факторов, каким-либо образом модулирующих работу репродуктивной оси, часто упоминается аллопрегненолон. Аллопрегненолон – производное прогестерона, которое вырабатывается в гонадах, коре надпочечников и центральной нервной системе. Экспериментальные исследования показывают повышение среднего уровня аллопрегненолона в период пубертата [38], что может указывать на значимую роль этого соединения в модерации процесса созревания гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Литературные данные об уровнях и характере пульсирующей секреции аллопрегненолона при гипоталамической аменорее весьма разнородны. В некоторых работах описывается снижение уровня этого нейростероида при ФГА [77], в других описывается повышение его средней концентрации у женщин с аменореей, сходное с повышением концентрации в лютеиновую фазу по сравнению с фолликулярной у женщин с сохранным менструальным циклом [45]. Лейтмотивом исследований уровней аллопрегненолона при ФГА является понятие о его пульсирующей и весьма разнородной секреции, что делает несколько сомнительной вероятность использования этого соединения в качестве диагностического маркера ЦГ.

Вышеупомянутые нейроэндокринные aberrации обычно рассматриваются в аспекте идиопатического ЦГ – формы с интактным состоянием гипоталамо-гипофизарной области. При наличии органического поражения ХСО – будь то аденома гипофиза, краниофарингиома, или последствия оперативного лечения в этой области – на первый план в патогенезе ЦГ выходит физическое, а не нейромедиаторное воздействие на гонадотрофы гипофиза.

В 2011 году группой ученых под руководством L.Caronia [23] было опубликовано исследование с участием 55 женщин страдающих ФГА, 160 пациенток с врожденным центральным гипогонадизмом и более чем 400 женщин с нормальным менструальным циклом; в этой работе было выявлено, что это функциональное нарушение работы репродуктивной оси имеет генетическую

основу – у 7 пациенток с ФГА были обнаружены гетерозиготные мутации генов, аберрации в которых являются причиной врожденного ЦГ. При этом у женщин контрольной группы, не имевших подобных мутаций, не возникало нарушений менструального цикла даже несмотря на интенсивные (той же интенсивности, что в группе ФГА) физические нагрузки (таблица 2).

Таблица 2

Частота патогенных мутаций в исследовании генетической основы ФГА у женщин, отнесенных к разным группам ([23], адаптировано).

Мутации	Пациентки с ФГА (n=55)	Пациентки с нЦГ (n=160)	Контроль 1* (n=375)	Контроль 2* (n=47)
<i>FGFR1</i>				
- <i>R756H</i>	1	0	0	0
- <i>G260E</i>	1	0	0	0
<i>PROKR2</i>				
- <i>R85H</i>	1	0	0	0
- <i>L173R</i>	1	5	0	0
<i>GNRHR</i>				
- <i>R262Q</i>	2	3	0	0
<i>KALI</i>				
- <i>V371I</i>	1	0	0	0

* - женщины с нормальным менструальным циклом, не занимающиеся физическими упражнениями; ** - женщины с нормальным менструальным циклом, занимающиеся физическими упражнениями более 5 часов в неделю.

Заметный прогресс последних лет в области исследования генетического базиса ЦГ имеет истоки в 1991 году, когда впервые была выявлена мутация, ответственная за развитие фенотипа синдрома Каллманна.

1.3 Генетическая основа центрального гипогонадизма

На сегодняшний день описано порядка 80 генов, мутации в которых могут проявляться фенотипом центрального гипогонадизма [48]. Точки приложения продуктов этих генов связаны со сложным онтогенезом ГнРГ-нейронов.

Всего в гипоталамусе располагается примерно 1500 нейронов, вырабатывающих ГнРГ [109]. Во время эмбриогенеза закладка ГнРГ-нейронов происходит в области назальной плакоды, а затем им предстоит мигрировать сквозь пластинку решетчатой кости, через развивающиеся обонятельные луковицы и полушария переднего мозга – в гипоталамус [57, 121]. Этот непростой путь модулируется в том числе продуктом гена *KALI* – белком под названием аносмин, который ассоциирован с нейрональной клеточной адгезией и аксональной миграцией. Именно с открытия ассоциации мутации в этом гене [43] начался период роста количества исследований в области генетической основы ЦГ.

С момента открытия мутации в гене *KALI* (именуемого также *ANOS1*) ЦГ считался заболеванием с моногенным типом наследования. Данные же последовавших за этим открытием двух десятилетий, ознаменованные открытием большого количества ассоциированных с ЦГ генов, меняют представление в пользу так называемого «олигогенного», когда у одного пациента можно выявить мутации сразу в нескольких ответственных за развитие ЦГ генах [21, 111]. По данным некоторых исследований, до 20% случаев врожденного ЦГ имеют олигогенную этиологию [117]. При этом гены демонстрируют некоторую специфичность: в то время как мутации одних ассоциированы с синдромом Каллманна, мутации в других приводят к развитию фенотипа с нормосмического ЦГ, и в то же время описаны гены, альтерации в которых обнаруживаются и при СК, и при нЦГ [109]. Учитывая эту особенность, можно разделить группы генов на т.н. «нейроразвивающие», которые ответственны за развитие и миграцию ГнРГ-нейронов (очевидно, что эта группа генов большей частью будет ассоциирована с фенотипом СК, сопровождающимся нарушением обоняния), и «нейроэндокринные» - crucialные для выработки ГнРГ и его адекватного воздействия на гонадотрофы гипофиза.

1.3.1. Нейроразвивающие гены

Первым из открытых нейроразвивающих генов был уже упомянутый выше *KAL1*. Его продукт белок аносмин экспрессируется, помимо центральной нервной системы, еще и в пищеварительной, дыхательной, мочеполовой, сердечно-сосудистой и опорно-двигательной системах [53]. Вследствие такой широкой представленности экспрессии гена *KAL1* фенотипические проявления синдрома Каллманна включают не только гипогонадотропный гипогонадизм, но и такие внерепродуктивные проявления как синкинезии (патологические зеркальные движения конечностей) или, например, агенезия почек.

После открытия ассоциации гена *KAL1* с СК количество описанных генов-кандидатов на роль причины врожденного ЦГ стало неуклонно расти. Проводилось большое количество исследований генотипов пациентов с недостаточностью ГнРГ, в результате чего были выявлены и охарактеризованы новые нейроразвивающие (и нейроэндокринные) гены. Один из первых – ген рецептора 1 фактора роста фибробластов, *FGFR1*: после выявления ассоциации его альтераций с фенотипом ЦГ, было описано большое количество патогенных мутаций в его экзонах [90]. Лигандами этого рецептора фактора роста фибробластов 1 типа (ФРФР1) являются более 20 факторов роста фибробластов (ФРФ), однако только ФРФ-8 и ФРФ-17 были описаны как лиганды, ответственные за нейрональную миграцию, соответственно также вовлеченные в патогенез ЦГ: мутации генов *FGF8* и *FGF17* также описаны у пациентов с врожденным ЦГ [39, 109]. Очевидно, что продукты генов *FGFR1* и его лиганда *FGF8* играют важную роль в процессе миграции ГнРГ-нейронов. Позднее при изучении белок-белковых взаимодействий было установлено участие еще ряда генов, продукты которых необходимы для развития ГнРГ-нейронов: *DUSP6*, *SPRY4*, *GLCE*, *FLRT3*, а также ген рецептора интерлейкинов *IL17RD* и лиганды этого рецептора [79].

Еще одна важная лиганд-рецепторная пара, гены которой относятся к нейроразвивающим – это *PROK2* и *PROKR2*. Ген *PROKR2* (альтернативное его

название *KAL3* – по аналогии с *KAL1* указывает на роль в развитии синдрома Каллманна) кодирует G-белок-ассоциированный рецептор, рецептор прокинетицина 2 типа; его лиганд, продукт гена *PROK2* (он же *KAL4*) кодирует белок прокинетицин-2. Взаимодействие этой пары запускает необходимый для нейрогенеза и миграции ольфакторных и ГнРГ-нейронов сигнальный киназный каскад, а также высвобождение ГнРГ нейронами гипоталамуса [94]. Примечательно также, что роль правильной работы этих двух генов *PROK2* и *PROKR2* в онтогенезе обонятельных нейронов иллюстрируется наличием такой нозологии, как врожденная anosmia без гонадотропной недостаточности – при которой также описаны их патогенные мутации [80].

В исследованиях с участием мышей были выявлены различные транскрипционные факторы, предположительно влияющие на миграцию нейронов. Один из них, кодируемый геном *WDR11* (WD Repeat Domain 11), во время онтогенеза центральной нервной системы широко экспрессируется в регионах, вовлеченных в развитие гипоталамических ГнРГ-нейронов, а позднее его экспрессия локализуется в основном в ольфакторных структурах, мозжечке и гиппокампе [64]. В 2010 году было описано несколько гетерозиготных миссенс-мутаций в важных для белок-белкового взаимодействия доменах гена *WDR11*, у пациентов как с синдромом Каллманна, так и с нормосмической формой ЦГ [64].

Еще один «нейроразвивающий» ген *CHD7* кодирует хромодомен-ДНК-хеликаза-связанный белок 7, который экспрессируется в различных тканях плода, включая головной мозг [21]. Мутации этого гена ассоциированы с редким аутосомно-доминантно наследуемым CHARGE-синдромом: Coloboma, Heart Anomalies, choanal atresia, Retardation, Genital and Ear anomalies: множественная колобома, пороки сердца, атрезия хоан, отставание развития, аномалии половых органов и уха [61]. ЦГ встречается более чем у половины пациентов, имеющих мутации *CHD7*, но только 6% пациентов с ЦГ (с anosmией или без нее) имеют мутации гена *CHD7* [63]. Следовательно, в то время как множественные мутации и большие делеции в гене *CHD7* характерны для классического фенотипа

CHARGE-синдрома, *CHD7*-ассоциированный ЦГ, по-видимому, является результатом точечных мутаций [17].

Суммарно, порядка не менее 50 генов, описанных в литературе на данный момент в качестве причины ЦГ, можно отнести к нейроразвивающим. Среди них, кроме уже перечисленных, гены, участвующие в процессах межклеточного взаимодействия, ответственные за аксональный рост и за миграцию клеток нервного гребня, а также различные транскрипционные факторы [48].

1.3.2 Нейроэндокринные гены

К нейроэндокринным принято относить те гены, продукты которых участвуют в процессе биологического действия ГнРГ. Поэтому ген самого ГнРГ (*GNRH1*) и рецептора к нему (*GNRHR*) являются, очевидно, самыми перспективными кандидатами на роль генетической причины некоторых случаев ЦГ. Действительно, у ряда пациентов с врожденным ЦГ были выявлены мутации в гене *GNRHR* с различными паттернами наследования — аутосомно-рецессивным моногенным, а также олигогенным [25]. Патогенные варианты гена *GNRH1*, также приводящие к фенотипу нЦГ, встречаются намного реже; впервые мутации этого гена были обнаружены в крупном исследовании с участием более чем 300 пациентов с нормосмической формой врожденного гипогонадотропного гипогонадизма [26].

Среди ответственных за ЦГ нейроэндокринных генов присутствует большое количество кодирующих лиганд-рецепторные пары. Одной из таких пар как раз является *KISS1/KISS1R* – белок кисспептина 1 (метастатин) и его рецептора, роль которых была подробно рассмотрена в разделе 1.2, посвященном нейроэндокринной регуляции функционирования репродуктивной оси. На сегодняшний день имеется достаточно большое количество работ, не оставляющих сомнений в ассоциации генетических альтераций генов *KISS1* и *KISS1R* и гипогонадотропного гипогонадизма [118].

Ген лептина, являющегося важнейшим функциональным посредником между энергетическим обменом и репродуктивной осью, а также его рецептора – *LEP* и *LEPR* – составляют еще одну лиганд-рецепторную пару нейроэндокринных генов. Патогенные мутации этих генов являются первопричиной очень небольшого количества случаев ассоциированного с морбидным ожирением центрального гипогонадизма: в масштабном исследовании с участием 300 человек с гипогонадизмом и ожирением на фоне гиперфагии мутации гена *LEPR* были выявлены всего в 3% случаев [40].

Один из тахикининов, нейрокинин В, нейроэндокринная роль которого уже также была описана ранее, кодируется геном *TAC3*; этот ген, как и ген рецептора нейрокина В – *TACR3*, экспрессируется в дугообразном ядре гипоталамуса, а именно в *KNDy*-нейронах, совместно с кисспептином и динорфином. Впервые связь мутаций в генах *TAC3* и *TACR3* с аутосомно-рецессивным вариантом наследования гипогонадотропного гипогонадизма была описана в 2009 году [117], и позже подтверждены другими исследованиями. Мутации этих генов ассоциированы с нормосмическими формами гипогонадотропного гипогонадизма, что подчеркивает отсутствие влияния продуктов этих генов на миграцию и дифференцировку ГнРГ-нейронов и ольфакторных нейронов, и описываются в качестве причины обратимых случаев гипогонадизма [47].

К группе нейроэндокринных, хоть и не имеющих прямого отношения к процессу синтеза и секреции ГнРГ, генов-виновников развития ЦГ можно отнести гены *LHB* и *FSHB*, кодирующие, соответственно, β -субъединицы ЛГ и ФСГ [69]. Отнести их к этой группе будет правомочно в связи с их участием в обеспечении биологического действия ГнРГ – его воздействие на организм опосредуется эффектами ЛГ и ФСГ. Инактивирующие мутации этих генов с аутосомно-рецессивным типом наследования описаны в качестве редких этиологических факторов ЦГ [73]. При таком генезе развития ЦГ могут отмечаться значительно различающиеся изменения уровней гонадотропинов: очень низкий уровень гонадотропина, ген β -субъединицы которого затронут мутацией, и нормальный уровень второго гонадотропина – с интактной β -субъединицей. У женщин,

имеющих мутации гена *LHB*, может отмечаться своевременное наступление пубертата, но позже – манифестировать вторичная аменорея и ановуляторное бесплодие [73]. При наличии же у женщины мутации гена *FSHB* описывают отсутствие полового созревания и первичную аменорею [70], при этом не фиксируется эффекта от терапии аналогом ГнРГ в пульсирующем режиме, но отмечается рост фолликулов в ответ на введение рекомбинантного ФСГ [66].

Несмотря на большое количество генов, ассоциации мутаций в которых с развитием ЦГ на сегодняшний день описаны, примерно до половины случаев ЦГ без органического поражения ХСО все же не имеет установленной генетической причины. Тот факт, что генетическую причину удастся выявить не в каждом случае ЦГ, может быть объяснен двояко. Во-первых, несмотря на заметный прогресс в этой области, нам известны еще не все гены, обуславливающие дисфункцию репродуктивной оси. А во-вторых, есть вероятность наличия эпигенетической регуляции функций уже известных генов: например, различный уровень метилирования регуляторных областей уже известных генов, или изменения их экспрессии.

1.4 Диагностика центрального гипогонадизма у женщин: современное состояние проблемы

ЦГ у женщин – не только отсутствие менструации и бесплодие; отсутствие в организме физиологического уровня периферических половых стероидов отрицательно сказывается на состоянии липидного обмена, сердечно-сосудистой системы, костной ткани, эмоциональном состоянии, выраженно снижая качество жизни женщины [78], и даже влияет на продолжительность жизни: наличие некомпенсированной гонадотропной недостаточности является независимым фактором риска смертности [105]. В связи с этим своевременная диагностика ЦГ и начало терапии являются крайне важными для сохранения репродуктивного потенциала и качества жизни трудоспособных женщин репродуктивного возраста.

Основным клиническим признаком гипогонадизма у женщин, чаще всего являющимся причиной визита к врачу, являются нарушения менструального цикла. Характеристики нормального менструального цикла представлены в таблице 3.

Таблица 3

Характеристики нормального менструального цикла ([81], адаптировано).

Клинические признаки менструального цикла	Описательные термины	Пределы нормы (5%-95%)
Длительность менструального цикла (дни)	Частые	<24
	Нормальные	24-38
	Редкие	>38
Вариабельность циклов за 12 мес (дни)	Отсутствует	—
	Регулярно	± 2-20 дней
	Нерегулярные	>20 дней
Длительность кровотечения (дни)	Длительное	>8,0
	Нормальное	4,5-8,0
	Короткое	<4,5
Ежемесячная кровопотеря (мл)	Много	>80
	Нормально	5-80
	Мало	<5

Рекомендации Европейского эндокринологического общества, посвященные диагностике и лечению ФГА, рекомендуют инициировать диагностический поиск этого вида ЦГ при наличии менструального цикла, превышающего по длительности 45 дней, или при отсутствии менструаций в течение 3 и более месяцев [50]; рекомендации по диагностике и лечению гипопитуитаризма дополняют этот пункт обязательным исключением беременности [42]. Также оба эти документа единогласно с Европейским Консенсусом по врожденному гипогонадотропному гипогонадизму [19] постулируют, что идиопатический ЦГ – ФГА или врожденный ГГ – являются диагнозами исключения и должны быть установлены после исключения органических причин, таких как, например, опухоли ХСО. Соответственно, при

подозрении на ЦГ рекомендуется проведение магнитно-резонансной томографии этой области головного мозга.

Лабораторная диагностика ЦГ базируется на определении уровней гонадотропинов у женщин с гипоестрогенной аменореей. При наличии сочетания низкого уровня эстрадиола и сниженных уровней ЛГ и ФСГ диагноз ЦГ становится вероятным [98]. Однако, понятие «сниженные уровни гонадотропинов» практически не раскрывается в рекомендациях крупных авторитетных сообществ. В источнике 2003 года [120] концентрации гонадотропинов описываются как дифференциально-диагностический признак между гипер- и гипогонадотропными формами гипогонадизма, и приводятся следующие значения: гипергонадотропным гипогонадизм считается при ЛГ > 25 МЕ/л и ФСГ > 40 МЕ/л, гипогонадотропным – при уровнях обоих гонадотропинов менее 5 МЕ/л. Здесь же описаны диагностически значимые уровни гонадотропинов при диагностике гипогонадизма у детей: у девочек уровни ЛГ $0,6 \pm 0,6$ МЕ/л и ФСГ $1,3 \pm 1,4$ МЕ/л свидетельствуют о наличии гипогонадотропного гипогонадизма [120]. В большинстве источников встречается значение <5 МЕ/л для обоих уровней гонадотропинов, либо формулировка «низкие и низконормальные уровни» [19, 50], что, разумеется, не является конкретным диагностическим критерием, особенно с учетом большого количества лабораторий, многие из которых самостоятельно разрабатывают референсные значения исследуемых показателей, используя исследования с участием от нескольких десятков до нескольких сотен здоровых добровольцев [18]. Соответственно, существует потребность в разработке четких диагностически значимых критериев «низких» уровней гонадотропинов для диагностики ЦГ.

Одной из характеристик гормонального профиля у женщин при ЦГ является отсутствие пиков секреции ЛГ, присутствующих у здоровых женщин с нормальным менструальным циклом; указанная особенность напрямую связана с расстройством высшего уровня регуляции репродуктивной оси – пульсирующей секреции ГнРГ [96, 108]. Исходя из этого факта, многократное исследование

уровней гонадотропинов сыворотки крови за определенный промежуток времени (от 2 часов и более, учитывая нормальную частоту пиков ЛГ 1/час) является перспективным способом точной диагностики ЦГ. В исследовании 2008 г [3] было проведено многократное исследование уровней ЛГ и ФСГ 6 пациенткам с нормогонадотропной гипоэстрогенной аменореей и 6 здоровым женщинам: взятие крови осуществлялось каждые 10 минут в течение 4 часов. По результатам было выявлено достоверное снижение количества и амплитуды пиков гонадотропинов, в большей степени ЛГ. Таким образом, этот метод является достаточно информативным и позволяет достоверно выявить нарушения гипофизарно-гипоталамической регуляции репродуктивной функции, даже при исходно нормальных базальных уровнях гонадотропинов, но является трудоемким и длительным.

Учитывая отсутствие пиков секреции гонадотропинов при центральном гипогонадизме, можно предположить отсутствие ответа от гипофиза на стимулирующие влияния ГнРГ. Это можно подтвердить посредством стимуляционных проб с использованием аналогов гонадолиберина. В исследовании, проведенном с участием мужчин с центральным гипогонадизмом, проводилась проба с внутримышечным введением 0.1 мг аналога гонадолиберина короткого действия (трипторелина): у 90% пациентов с ЦГ уровень ЛГ через 1 час после введения не превышал 4 МЕ/л [76]. Трипторелин – соединение, которое чаще всего упоминается в контексте диагностики и лечения центрального преждевременного полового созревания у детей [44, 68]. Описано проведение такой пробы с подкожным введением короткодействующей формы этого препарата – раствора 0,1 мг трипторелина в сочетании с исследованием уровней гонадотропинов непосредственно перед введением препарата, и затем через 3 и 24 часа. При уровне ЛГ через 3 часа выше 7 или 8 МЕ/л (в зависимости от метода анализа) диагностируют преждевременное половое созревание центрального генеза [44]. У взрослых пролонгированные формы трипторелина используют для терапии эндометриоза [15]. Что касается использования этого соединения для оценки функциональных резервов гипофиза, на сегодняшний день методика

подобной диагностической пробы описана в отечественных и зарубежных источниках, но нет утвержденного протокола ее проведения и референсных значений для интерпретации результатов. Например, в клинических рекомендациях «Акушерство и гинекология» под ред. академика РАМН В.И.Кулакова [7] описано проведение пробы с трипторелином для дифференциальной диагностики гипоталамических и гипофизарных форм аменореи: после внутривенного введения 0,1 мг трипторелина на 30-45 минуте уровни ЛГ и ФСГ увеличиваются в 3 и более раза по сравнению с исходными при гипоталамическом уровне поражения и менее чем в 3 раза – при гипофизарном. В работе 2008г. Иловой И.А. и др. [3] пациенткам с центральным гипогонадизмом идиопатического и органического генеза проводилась проба с короткодействующим аналогом ГнРГ по той же методике, которая была выбрана для исследования в ходе настоящей работы, а именно – оценка базальных и стимулированных (через 4 часа после подкожного введения 0,1 мг трипторелина) уровней гонадотропинов. По результатам этой работы прирост ЛГ менее чем на 1400% имел чувствительность 87% и специфичность 74% для диагностики ЦГ.

Еще одно крупное эпидемиологическое исследование [97] описывает пробу с аналогом ГнРГ в качестве диагностики и женского, и мужского центрального гипогонадизма. В этой работе ЦГ у женщин считался подтвержденным при отсутствии более чем четырехкратного по сравнению с базальным уровнем пика ЛГ. В то же время, в этом исследовании не указан протокол проведения стимуляционной пробы.

Таким образом, проба с трипторелином имеет диагностический потенциал в аспекте выявления гонадотропной недостаточности. Описания проведения этого теста значительно разнятся в рассмотренных источниках.

Считалось, что ЦГ является необратимым состоянием. В течение последних примерно 10 лет появляются сведения о том, что около 10-20% подобных случаев могут иметь обратное развитие под действием терапии, даже у пациентов с обнаруженными мутациями репродуктивно заинтересованных генов, а также пациентов с синдромом Каллманна и неопределяемыми обонятельными

луковицами [36, 88, 107]. Учитывая обратимость гипогонадизма под действием терапии, восстановление фертильной функции и улучшение качества жизни пациентов, становится очевидной необходимостью своевременной диагностики и старта лечения ЦГ.

Резюмируя, можно заключить, что диагностика ЦГ без органического поражения ХСО на сегодняшний день является весьма трудной задачей. Учитывая медицинскую и социальную проблемы центрального гипогонадизма у женщин репродуктивного возраста, существует необходимость разработки алгоритма диагностики данного состояния.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика включенных в исследование пациентов

В данной работе представлены результаты обследования 146 женщин, наблюдавшихся в отделении терапевтической эндокринологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, которые были распределены на следующие группы:

группа 1 (идиопатический центральный гипогонадизм, далее «идиопатический ЦГ»): 46 пациенток с центральным гипогонадизмом без органических поражений хиазмально-селлярной области в возрасте от 18 до 45 лет (Me 23 [Q21; Q29]);

группа 2 (центральный гипогонадизм вследствие органических патологий, далее «органический ЦГ»): 32 пациентки с центральным гипогонадизмом на фоне органических поражений хиазмально-селлярной области в возрасте от 18 до 45 лет (Me 29 [Q23; Q37]);

группа 3 (контрольная, далее «контроль»): 68 практически здоровых женщин с регулярным овуляторным менструальным циклом в возрасте от 19 до 45 лет (Me 23 [Q23; Q27]).

В промежуток времени с 2015 до 2020г. в указанном подразделении было обследовано 136 пациенток с гипоестрогенной аменореей; у 51 пациентки диагностированы такие причины гипоестрогенной аменореи, как гиперпролактинемия и преждевременная недостаточность яичников; 7 пациенток не согласились на участие в исследовании; в финальную выборку пациенток вошли 78 женщин (46 – ЦГ без органического поражения и 32 – на фоне органического поражения хиазмально-селлярной области).

Критерии включения в группы идиопатического ЦГ и органического ЦГ (группы пациентов 1 и 2):

1. Наличие информированного добровольного согласия на участие в исследовании

2. Возраст от 18 до 45 лет, женский пол
3. Аменорея на фоне гипоэстрогемии: первичная или вторичная (более 6 месяцев)
4. Отсутствие органического поражения органов мочеполовой системы по данным УЗИ малого таза
5. Уровни гонадотропных гормонов (ЛГ и ФСГ) в плазме крови в пределах или ниже референсных значений
6. Наличие МРТ-исследования гипоталамо-гипофизарной области головного мозга с контрастированием
7. Компенсация других видов тропной недостаточности (при наличии)
8. Отсутствие сопутствующей тяжелой соматической патологии.

Процесс формирования финальной выборки пациенток представлен на рисунке 2.

Критерии включения в группу контроля (группу 3):

1. Наличие информированного добровольного согласия на участие в исследовании
2. Возраст от 18 до 45 лет
3. Регулярный овуляторный менструальный цикл
4. Отсутствие приема комбинированных оральных контрацептивов и других гормональных препаратов не менее 12 месяцев до включения
5. Отсутствие сопутствующей тяжелой соматической патологии

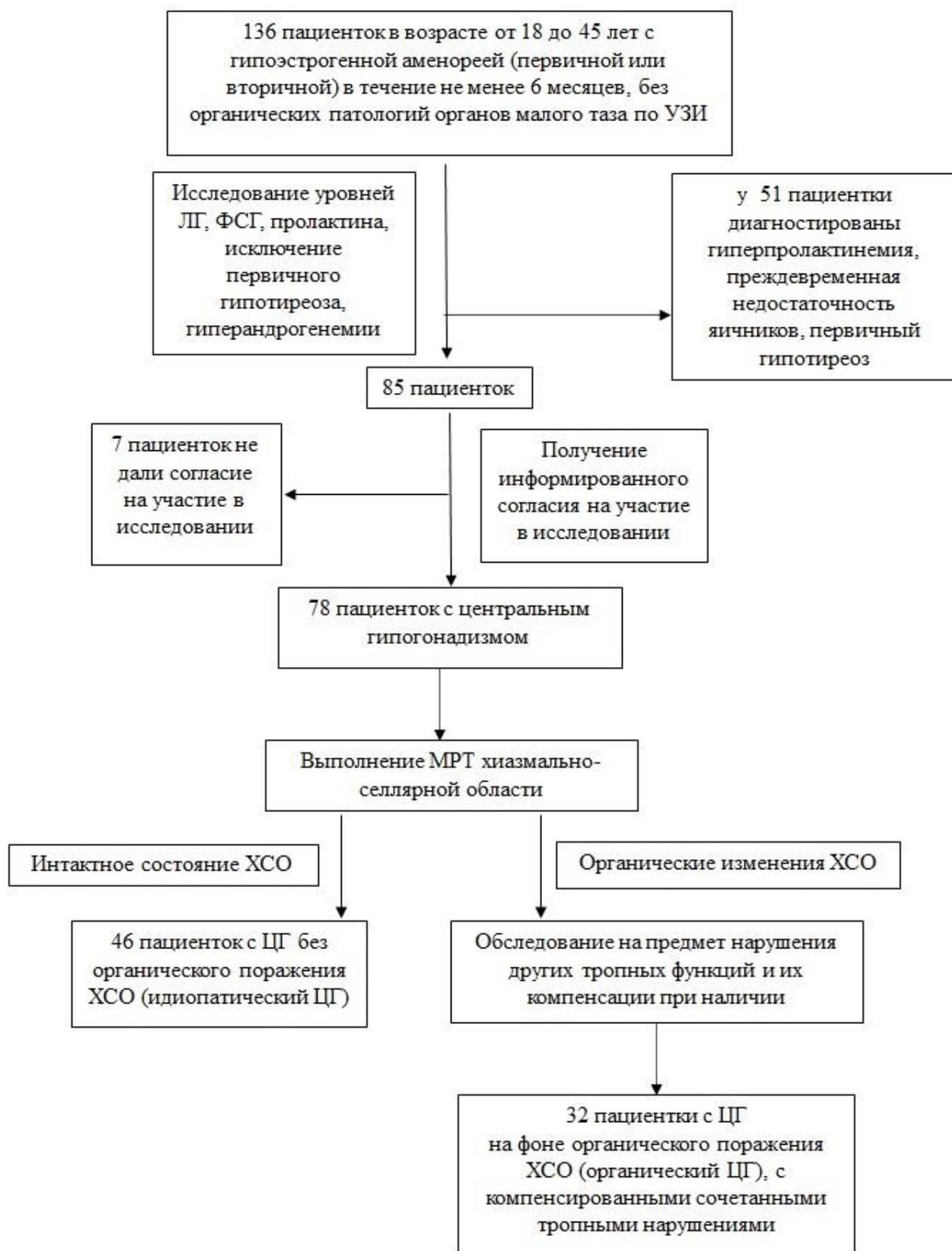


Рисунок 2 – Алгоритм формирования выборки пациентов.

Критерии невключения в исследования:

1. Наличие любой гормонально-активной опухоли на момент включения в исследование
2. Наличие сопутствующей тяжелой соматической патологии
3. ИМТ $\leq 17,5$ кг/м² [54]
4. Гиперпролактинемия
5. Гиперандрогенемия
6. Гипергонадотропный гипогонадизм

Общая характеристика включенных в исследование женщин представлена в таблице 4 (стр. 42). Данные представлены в виде «медиана [интерквартильный размах Q25; Q75]».

Почти в половине случаев среди пациенток группы органического ЦГ (15/32, 47%) причиной ЦГ являлись краниофарингиомы – в 13 случаях из 15 оперированные, в 2 – без оперативного лечения. Еще у 10 пациенток (10/32, 31%) причиной явились гормонально-неактивные аденомы гипофиза – в 9 случаях оперированные и в одном – без оперативного лечения на момент проведения исследования. В оставшихся 7 случаях причинами органического ЦГ были: врожденные аномалии (гипоплазия аденогипофиза/первично пустое турецкое седло по данным МРТ) – 6 случаев (6/32, 19%), а также черепно-мозговая травма в детском возрасте – 1 случай (1/32, 3%). Анализ структурных причин органического ЦГ представлен в таблице 5 (стр. 43). Среди 32 пациенток с органическим ЦГ у 26 (26/32, 81%) отмечен сочетанный гипопитуитаризм: вторичный гипотиреоз и/или вторичный гипокортицизм; их уровни Т4своб указывали на компенсированный гипотиреоз, клинические признаки надпочечниковой недостаточности на фоне терапии препаратами гидрокортизона отсутствовали, т.е. гипопитуитаризм был компенсирован.

Характеристика включенных в исследование групп пациенток.

Показатель диапазон значений, Me [Q1;Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1) n=46	Органический ЦГ (группа 2) n=32	Контроль (группа 3) n=68	Достоверность различий
Характеристики			Соматически здоровы, регулярный овуляторный МЦ	
Первичная/вторичная аменорея (n) %	10/36 27,7/ 72,3	11/20 55/45	НП	
Возраст (годы)	18 - 45 23 [21; 29]	18 - 45 29,5 [23; 39]	19 - 45 23 [23; 27]	$p_{k-w}=0,0492^*$ $p_{1,2}=0,0244$ $p_{2,3}=0,0498$ $p_{1,3}=0,3521$
ИМТ, (кг/м ²)	17,6 – 25 20 [19; 21,2]	18,5 - 37 23,9 [20; 27,5]	17,6 – 31 21 [19; 23]	$p_{k-w}=0,0019^*$ $p_{1,2}=0,0006^+$ $p_{2,3}=0,0158^+$ $p_{1,3}=0,0852$

* $p < 0,05$, статистически значимые различия при сравнении трех независимых групп методом Краскела-Уоллеса

+ $p < 0,0167$, статистически значимые различия при апостериорных сравнениях критерием Манна-Уитни

НП – не применимо

Этиологическая структура центрального гипогонадизма на фоне органических поражений хиазмально-селлярной области среди участниц исследования.

Причина органического поражения ХСО		Кол-во пациенток	ИМТ в этой подгруппе, кг/м ² Me [Q1; Q3]	Возраст в этой подгруппе, годы Me [Q1; Q3]
Оперативное лечение	Краниофарингиомы	13	22 [20; 27]	23 [20; 34]
	Аденомы гипофиза	9	27,6 [26; 30]	39,5 [34; 45]
Объемные образования ХСО (не оперированные)	Краниофарингиома	2	17,2 и 20,5 кг/м ²	29 и 29 лет
	Гормонально-неактивная аденома гипофиза	1	20	18
Врожденные аномалии	Гипоплазия гипофиза/первично пустое турецкое седло	6	23 [20,5; 25,6]	24,5 [21,7; 25,7]
Травмы	ЧМТ, ушиб мозга в результате ДТП в возрасте 11 лет	1	35,5	26

24 пациенткам с ЦГ без органического поражения, 11 пациенткам группы органического поражения и 18 здоровым женщинам была проведена проба с подкожным введением трипторелина для определения функционального резерва гипофиза (таблица 6, стр. 44).

Характеристика групп пациенток, которым была проведена проба с трипторелином

Показатель Диапазон значений, Me [Q1; Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1) n=24	Органический ЦГ (группа 2) n=11	Контроль (группа 3) n=18	Достоверность различий
Первичная/вторичная аменорея (n) %	4/20 17/83	6/5 55/45	НП	
Возраст (годы)	18 – 37 22 [21; 27]	22 – 45 29 [25; 32]	23 – 38 25,5 [24; 27]	$p_{k-w}=0,0035^*$ $p_{1,2}=0,0052^+$ $p_{2,3}=0,2672$ $p_{1,3}=0,0055^+$
ИМТ, (кг/м ²)	17,6 – 25 20 [18,7; 21]	18 – 34,3 22 [19,2; 28,8]	17,9 – 31 23 [21; 24,1]	$p_{k-w}=0,0287^*$ $p_{1,2}=0,1140$ $p_{2,3}=0,8439$ $p_{1,3}=0,0057^+$

* $p < 0,05$, статистически значимые различия при сравнении трех независимых групп методом Краскела-Уоллеса

+ $p < 0,0167$, статистически значимые различия при апостериорных сравнениях критерием Манна-Уитни

НП – не применимо

15 женщинам из группы пациентов идиопатического ЦГ и 20 здоровым женщинам из группы контроля было проведено исследование мРНК репродуктивно заинтересованных генов, а также структурный анализ этих генов; сопоставимость групп участниц этой части исследования представлена в таблице 7 (стр. 45).

Характеристика групп пациенток, которым было проведено исследование мРНК

Показатель Диапазон значений, Me [Q1; Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1) n=15	Контроль (группа 3) n=21	Достоверность различий
Первичная/вторичная аменорея	6/9	НП	НП
Возраст (годы)	18 – 45 22 [18,5; 23]	19 – 38 22 [21; 25,5]	p _{1,3} =0,5090
ИМТ, (кг/м ²)	17,6 – 22,8 19 [18,2; 20]	17,6 – 31 20 [19,3; 21,6]	p _{1,3} =0,1425

Женщинам из группы органического ЦГ не проводилось исследование на предмет нарушений экспрессии нейроразвивающих и нейроэндокринных генов.

2.2 Методы обследования

2.2.1. Общеклиническое обследование

Пациенткам проводилось клиническое обследование, включающее в себя осмотр, измерение артериального давления, вычисление индекса массы тела, сбор анамнеза.

Артериальное давление измерялось в положении сидя, на правой руке, после 10-минутного отдыха, трижды с интервалом в 5 минут, затем подсчитывалось среднее арифметическое этих измерений. Измерение массы тела проводилось утром, натощак, без обуви в легкой одежде. Затем проводился расчет индекса массы тела (ИМТ) по стандартной формуле:

$$\text{ИМТ} = \frac{\text{Вес (кг)}}{\text{Рост (м}^2\text{)}}$$

2.2.2 Лабораторные методы обследования

Участницам проводилось исследование сывороточных уровней следующих гормонов: лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), пролактина (ПРЛ), эстрадиола (Е2), тестостерона (Т), дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭАС), глобулина связывающего половые гормоны (ГСПГ), тироксина свободного (Т4св.) и тиреотропного гормона (ТТГ). Указанные показатели измерялись хемилюминесцентным иммунным анализом с использованием парамагнитных частиц на автоматическом иммунохимическом анализаторе Beckman Coulter, Inc. UniCell DxI 800, USA. Референсные значения уровней гормонов, согласно сопроводительной документации анализатора, были следующие:

- ЛГ: 2,12 – 10,89 МЕ/л;
- ФСГ: 4,54 – 22,51 МЕ/л;
- Пролактин: 93,28 – 655,08 мМЕ/л;
- Эстрадиол: 99,0 – 448,0 пмоль/л;
- Тестостерон: 0,45 – 2,91 нмоль/л;
- ДГЭАС: 0,49 – 10,6 мкмоль/л;
- ГСПГ: 18,2 – 135,5 нмоль/л;
- Т4 свободный: 7 – 17,66 пмоль/л;
- ТТГ: 0,4 – 4 мкМЕ/мл.

Женщинам, составившим группу контроля, исследование гонадотропинов, половых стероидов, пролактина, ГСПГ проводилось на 3-7 день менструального цикла.

В ходе исследования 53 женщинам (35 пациенткам – 11 из группы органического, 24 из группы идиопатического ЦГ и 18 субъектам группы контроля) была проведена диагностическая проба с подкожным введением

аналога ГнРГ (трипторелин, препарат «Диферелин» 0,1 мг) для оценки функционального гонадотропного резерва центральных отделов гипоталамо-гипофизарного звена репродуктивной системы. Проведение пробы было одобрено решением врачебной комиссии.

Методика проведения пробы с аналогом гонадолиберина:

1. взятие крови из кубитальной вены для анализа на ЛГ и ФСГ;
2. подкожное введение 1 мл раствора, содержащего 0,1 мг трипторелина (в подкожно-жировую клетчатку околопупочной области передней брюшной стенки);
3. через 240 минут (4 часа) после введения трипторелина повторное взятие крови из кубитальной вены для анализа уровней стимулированных ЛГ и ФСГ.

Помимо базальных и стимулированных (через 240 минут после подкожного введения трипторелина) уровней гонадотропинов, оценили относительный прирост их стимулированных уровней, расчет проводили следующим образом:

$$\text{Относительный прирост ЛГ} = \frac{\text{Стимулированный уровень ЛГ (МЕ/л)}}{\text{Базальный уровень ЛГ (МЕ/л)}}$$

$$\text{Относительный прирост ФСГ} = \frac{\text{Стимулированный уровень ФСГ (МЕ/л)}}{\text{Базальный уровень ФСГ (МЕ/л)}}$$

А также оценивали прирост гонадотропинов в процентах; расчет проводился следующим образом:

$$\text{Прирост ЛГ (\%)} = \frac{\text{Стимулированный уровень ЛГ (МЕ/л)} - \text{Базальный уровень ЛГ (МЕ/л)}}{100\%}$$

$$\text{Прирост ФСГ (\%)} = \frac{\text{Стимулированный уровень ФСГ (МЕ/л)} - \text{Базальный уровень ФСГ (МЕ/л)}}{100\%}$$

2.2.3 Анализ экспрессии мРНК репродуктивно заинтересованных генов

15 пациенткам из группы идиопатического ЦГ и 21 здоровой женщине группы контроля было проведено количественное исследование мРНК генов

GNRH1, *GNRHR*, *PROK2*, *DUSP6*, *WDR11*, *CHD7*, участвующих в становлении и функционировании репродуктивной оси. Экспрессионный анализ проводился на базе лаборатории кафедры генетики биологического факультета ФГОУ ВПО МГУ имени М.В.Ломоносова.

Вышеперечисленные гены экспрессируются в месте их прямого функционирования – в головном мозге. Однако, в соответствии с информацией, опубликованной в базах данных по геному человека (например, <http://www.genecards.org/>), большое количество генов, ответственных за развитие фенотипа ЦГ, в том числе исследуемых в рамках данной работы, экспрессируются и в лейкоцитах периферической крови пациентов (табл. 8)[1].

Таблица 8

Экспрессия исследуемых генов-кандидатов ЦГ на уровне транскрипции в тканях человека по данным GeneCards ([1], с изменениями).

Ген	Экспрессия на уровне мРНК		
	Кровь (лейкоциты)	Гипоталамус-гипофиз	Репродуктивная система (яичники)
<i>PROK2</i>	+	+	+
<i>GNRH1/ GNRHR</i>	+/+	+/+	+/+
<i>CHD7</i>	+	+	+
<i>WDR11</i>	+	+	+
<i>DUSP6</i>	+	+	+

Для анализа использовались лейкоциты венозной крови пациенток. Венозную кровь забирали из подкожной кубитальной вены в одноразовую вакуумную систему типа “BD Vacutainer” (сиреневая крышка) с антикоагулянтом (6% ЭДТА). Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови, которые осаждали при центрифугировании 30–40 мин при 1000 g в градиенте плотности фиколла [20] с плотностью раствора 1.077 г/см³ (“ПанЭко”, Россия). Лейкоцитарное кольцо отбирали в пробирку с 10 мл буфера DPBS (“ПанЭко”, Россия). РНК выделяли при помощи набора ExtractRNA (“Евроген”, Россия),

согласно протоколу фирмы. Качество выделенной РНК оценивали визуально с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Уровни транскрипции исследуемых генов определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System производства Bio-Rad (США). В качестве референсных использовали гены *ACTB*, *UBC*, *RPLP0*. Список праймеров приведен в таблице 9. Обработку результатов ПЦР проводили с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6.541.1028). Распределение данных относительных уровней мРНК генов в контрольной группе и у пациенток было непараметрическим.

Таблица 9

Список праймеров, использованных для РВ-ПЦР

	Последовательность (5'-3')	Последовательность (3'-5')
Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>ACTB</i>	CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT
<i>UBC</i>	CCCAGTATCAGCAGAAGGAA	ATCGCCGAGAAGGGACTACTT
<i>RPLP0</i>	CACTGAGATCAGGGACATGTTG	CTTCACATGGGGCAATGG
<i>GNRH1</i>	CAACGCTTCGAATGCACCA	GAGGTAGCTGTCCTAAGTGA
<i>GNRHR</i>	AACTACAATGAATCAGTCCA	TCACAGAGAAAAATATCCATAG
<i>PROK2</i>	TGCATCACACTTGCCCATGT	GGCACAATCACAAGTAAGACT
<i>DUSP6</i>	TCACTGGAGCCAAAACCTG	TAGGCATCGTTCATCGACAG
<i>CHD7</i>	CAACAGCCATCTTTTCAGCA	CATATCCGGCACTGGTTTCT
<i>WDR11</i>	GGGATGTTGCCCTACACAGT	GTTTGGGCAGTAATGGAATCA

Учитывая наличие литературных данных о генетической основе идиопатического центрального гипогонадизма, был проведен поиск мутаций в перечисленных генах посредством методов аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) и SSCP-анализа. Для ПЦР была использована готовая смесь qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). К смеси добавляли по 20 пмоль праймеров и 270 нг кДНК. Объем смеси составлял 25 мкл. Реакцию ставили в амплификаторе MiniOpticon Real-Time PCR System. Программа амплификации

включала начальную стадию денатурации при температуре 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов: денатурация, отжиг праймеров и элонгации (95°C, 30 с; 55°C, 1 мин; 72°C, 1 мин). SSCP-анализ проводили по стандартной методике [56].

2.3 Дизайн исследования

Дизайн исследования был одобрен на заседании независимого этического комитета ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского», протокол №2 от 13.02.2020г. Тип исследования: одномоментное обсервационное.

В ходе работы было обследовано 78 пациенток, наблюдавшихся с диагнозом «центральный гипогонадизм» в отделении терапевтической эндокринологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского в промежуток с 2015 по 2020г., и 68 женщин контрольной группы.

К пациенткам, включенным в группы, были применены следующие методы обследования.

1. Клинические:

- сбор анамнеза, общий осмотр, измерение массы тела и роста; расчет индекса массы тела;
- измерение артериального давления, частоты сердечных сокращений.

2. Лабораторные:

- гормональное обследование: анализ крови на ЛГ, ФСГ, эстрадиол, пролактин, тестостерон, ДГЭАС, ГСПГ, ТТГ и свободный тироксин.

3. Генетическое обследование:

- анализ экспрессии репродуктивно заинтересованных генов *GNRH1*, *GNRHR*, *PROK2*, *DUSP6*, *WDR11* и *CHD7* методом ПЦР в реальном времени
- мутационный анализ генов *GNRH1*, *GNRHR*, *PROK2*, *DUSP6*, *WDR11* и *CHD7* с использованием методик АС-ПЦР и SSCP

Также 24 пациенткам группы идиопатического ЦГ (группы 1), 11 пациенткам группы органического ЦГ (группа 2) и 18 пациенткам группы контроля (группа 3) была проведена проба с аналогом гонадолиберина короткого действия трипторелином.

2.4 Статистическая обработка данных

Данные были внесены в электронную таблицу Microsoft Office Excel; статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью средств Microsoft Office Excel (пакет Office 365 от 2020г.) и пакета программы GraphPad Prism версии 8.0.1 с использованием непараметрических методов статистики. Непараметрические методы использовались вследствие отсутствия нормального распределения количественных значений выборок в соответствии с критерием Шапиро-Уилкса в модуле описательной статистики.

Для определения статистической значимости различий переменных двух независимых групп использовался U-тест Манна-Уитни, при сравнении трёх независимых групп – метод Краскела-Уоллиса. Для оценки качества моделей и выбора модели с наилучшей прогностической силой, анализа чувствительности и специфичности диагностически значимых порогов отсечения показателей использовался ROC-анализ.

Результаты обработки непараметрических данных представлены в виде «медиана [интерквартильный размах Q25; Q75]».

За критический уровень значимости при проверке гипотез был принят $p < 0,05$. При апостериорных попарных сравнениях с помощью критерия Манна-Уитни использовалась поправка Бонферрони, критический уровень значимости был принят $p = 0,05/3 = 0,01667$.

Построение графиков «Box and Whiskers» с обозначением Q25-Q75, медианы в виде продольной линии и минимальных/максимальных значений, выпадающих значений – проводилось в программе GraphPad Prism версии 8.0.1.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Оценка клинических показателей

Проведено сравнение клинических показателей между группами участниц исследования: возраста, ИМТ. Результат сравнения представлен в таблице 10.

Таблица 10

Анализ возраста и росто-весовых показателей пациенток и контрольной группы

Показатель диапазон значений, Ме [Q1;Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1)	Органический ЦГ (группа 2)	Контроль (группа 3)	Достоверность различий между группами
Возраст, годы	18 – 45 23 [21; 29]	18 – 45 29 [23; 49]	19 – 45 23 [23; 27]	$p_{k-w}=0,0492^*$ $p_{1,2}=0,0244$ $p_{2,3}=0,0498$ $p_{1,3}=0,3521$
ИМТ кг/м ²	17,6 – 25 20 [19; 21,2]	18,5 – 37 23,95 [20,05; 27,45]	17,6 – 31 21 [19; 23]	$p_{k-w}=0,0019^*$ $p_{1,2}=0,0006^+$ $p_{2,3}=0,0158^+$ $p_{1,3}=0,0852$

* $p < 0,05$, статистически значимые различия при сравнении трех независимых групп методом Краскела-Уоллеса

+ $p < 0,0167$, статистически значимые различия при апостериорных сравнениях критерием Манна-Уитни

Группы пациенток и контроля не имели статистически значимых различий по возрасту (см. таблица 10). Однако, выявлено достоверное различие по показателю ИМТ при сравнениях с участием группы органического ЦГ: у пациенток с центральным гипогонадизмом, обусловленным органическим поражением хиазмально-селлярной области, ИМТ достоверно выше, чем в группе

идиопатического ЦГ и в контрольной группе. В группе пациенток с органически обусловленным центральным гипогонадизмом доля пациенток с ИМТ 25 кг/м² и более, то есть имеющих избыточную массу тела, составила более трети – 12/32 (37,5%).

3.2 Характеристики гормональных профилей пациенток с центральным гипогонадизмом

Всем пациенткам и субъектам контрольной группы было проведено исследование уровней гонадотропинов (ЛГ, ФСГ), эстрадиола, тестостерона, ДГЭАС и ГСПГ; также были исследованы уровни пролактина, ТТГ и свободного тироксина для исключения гиперпролактинемии и гипотиреоза. Здоровым женщинам гормональное обследование проводилось в раннюю фолликулярную фазу (3-7 день менструального цикла).

При выполнении исследований уровней некоторых гормонов (конкретно, следующих: ЛГ, тестостерона, ДГЭАС, ТТГ) в некоторых случаях показатели выходили за пределы чувствительности метода определения, а именно были ниже предела. Пределы чувствительности для указанных показателей:

- ЛГ <0,1 МЕ/л
- Тестостерон <0,1 нмоль/л
- ДГЭАС <0,1 мкмоль/л
- ТТГ <0,01 мкЕд/мл

В подобных случаях прибегали к округлению значений в меньшую сторону до абсолютных: для ЛГ – 0,09 МЕ/л (применено для 5 пациенток группы идиопатического ЦГ и для 12 пациенток группы органического ЦГ), тестостерон – 0,09 нмоль/л (применено для 6 пациенток группы органического ЦГ), ДГЭАС – 0,09 мкмоль/л (применено для 4 пациенток группы органического ЦГ) и ТТГ – 0,009 мкЕд/мл (применено для 4 пациенток группы органического ЦГ).

Результаты представлены в таблице 11. В таблицу 11 вошли данные, рассчитанные с использованием округленных абсолютных показателей.

Таблица 11

Сравнение показателей базальных уровней гормонов между всеми группами участниц исследования

Показатель диапазон значений, Ме [Q1;Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1) (n=46)	Органический ЦГ (группа 2) (n=32)	Контроль (группа 3) (n=68)	Достоверность различий между группами
ЛГ (МЕ/л)	0,09 – 7,4 0,735 [0,213; 1,46]	0,09 – 3,7 0,25 [0,09; 1,05]	1,2 – 12,92 4,9 [3,47; 7,23]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,0277$ $p_{1,3} < 0,0001^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
ФСГ (МЕ/л)	0,05 – 8,7 3,73 [0,825; 5,16]	0,1 – 5,1 1,1 [0,675; 1,725]	3 – 11,51 6,14 [5,18; 7,22]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,0017^+$ $p_{1,3} < 0,0001^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
Эстрадиол (пмоль/л)	18 – 449 72 [40; 88,4]	12 – 372 50 [34,5; 77,75]	52 – 616 171,5 [114,25; 230,3]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,2377$ $p_{1,3} < 0,0001^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
Тестостерон (нмоль/л)	0,3 – 2,97 1 [0,7; 1,52]	0,09 – 1,7 0,1 [0,09; 0,6]	0,4 – 2,6 1,1 [0,81; 1,49]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} < 0,0001^+$ $p_{1,3} = 0,7611$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
ДГЭА-С (мкмоль/л)	1,46 – 11,48 6,57 [3,515; 7,685]	0,09 – 8,49 0,173 [0,09; 1,525]	1,3 – 15,61 5,95 [4,63; 7,11]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} < 0,0001^+$ $p_{1,3} = 0,7661$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
ГСПГ (нмоль/л)	22 – 243 78,9 [43,65; 104,3]	18,8 – 235,7 67,05 [44; 88,1]	21,8 – 128,4 72,2 [52; 87,96]	$p_{k-w} = 0,7455$

Пролактин (мМЕ/л)	52,2 – 516 175 [111,5; 233,5]	26 – 589 233 [123,25; 420]	60 – 657 266 [205,5; 397,25]	$p_{k-w}=0,0003^*$ $p_{1,2}=0,0502$ $p_{1,3}<0,0001^+$ $p_{2,3}=0,4030$
Т4 св. (пмоль/л)	8,39 – 19,6 12,48 [11,5; 14,15]	7,6 – 19 12,1 [9,86; 13,3]	8,4 – 17 12,9 [11,7; 14]	$p_{k-w}=0,1578$
ТТГ (мкЕд/мл)	0,77 – 4,7 1,75 [1,195; 2,57]	0,009 – 5,07 0,8945 [0,058; 1,54]	0,4 – 5,5 1,5 [0,9; 2,48]	$p_{k-w}=0,0015^*$ $p_{1,2}=0,0005^+$ $p_{1,3}=0,1456$ $p_{2,3}=0,0058^+$

* $p<0,05$, статистически значимые различия при сравнении трех независимых групп методом Краскела-Уоллеса

+ $p<0,0167$, статистически значимые различия при апостериорных сравнениях критерием Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони

Обращают на себя внимание сниженные уровни гонадотропинов у пациенток обеих групп по сравнению с группой контроля, а также значимо более низкие их уровни у пациенток группы органического ЦГ по сравнению с группой идиопатического ЦГ (рисунки 3 и 4 на стр. 56). В группу органического ЦГ вошли женщины, у которых гипогонадизм обусловлен органическим поражением гипофиза – т.е. пострадало количество и/или качество гонадотрофов. Эта значительная разница дает основание полагать, что различия генеза центрального женского гипогонадизма (вследствие наличия органического поражения ХСО и без такового) вносят вклад в гормональные профили; таким образом, уровни гормонов потенциально могут быть использованы для выявления того или иного генеза ЦГ у женщин.

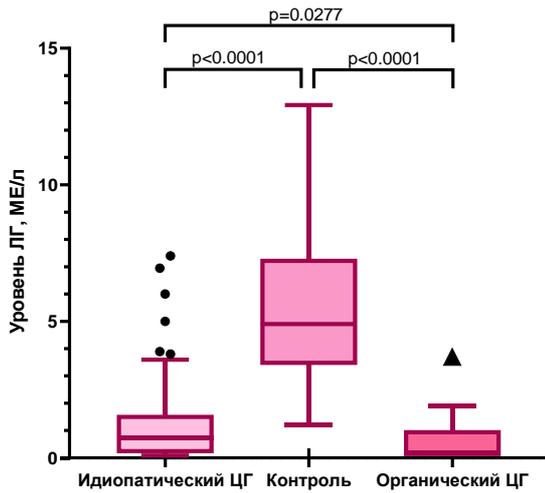


Рисунок 3 – Уровни ЛГ у обследованных женщин

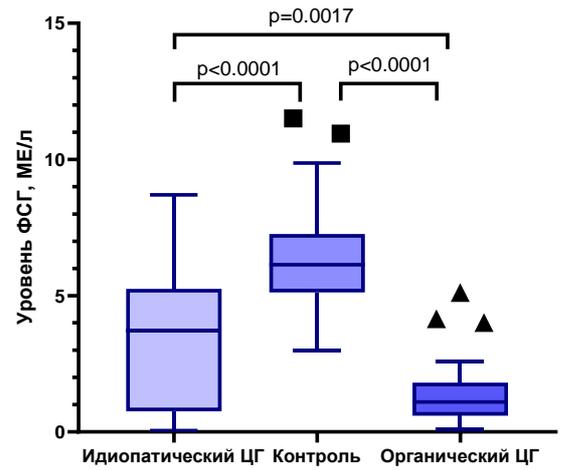


Рисунок 4 – Уровни ФСГ у обследованных женщин

Кроме того, были выявлены статистически значимые различия в уровнях тестостерона и ДГЭАС между группой органического ЦГ и контролем, и в уровне пролактина – между группой идиопатического ЦГ и контролем (рисунки 5, 6, 7).

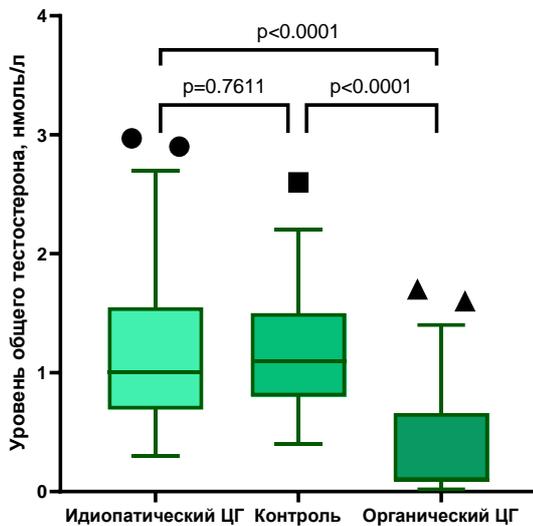


Рисунок 5 – Уровни общего тестостерона у обследованных женщин

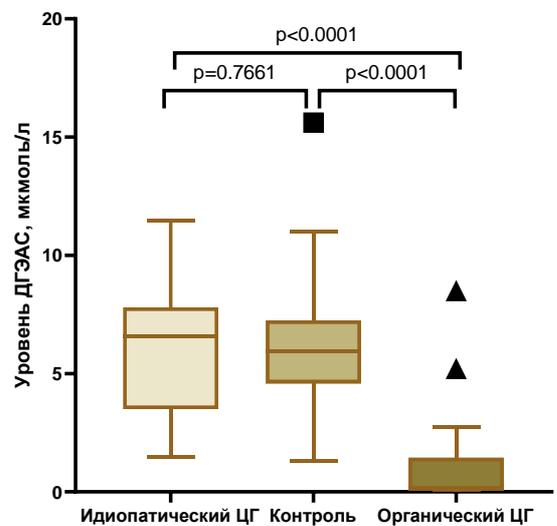


Рисунок 6 – Уровни дегидроэпиандростерон-сульфата у обследованных женщин

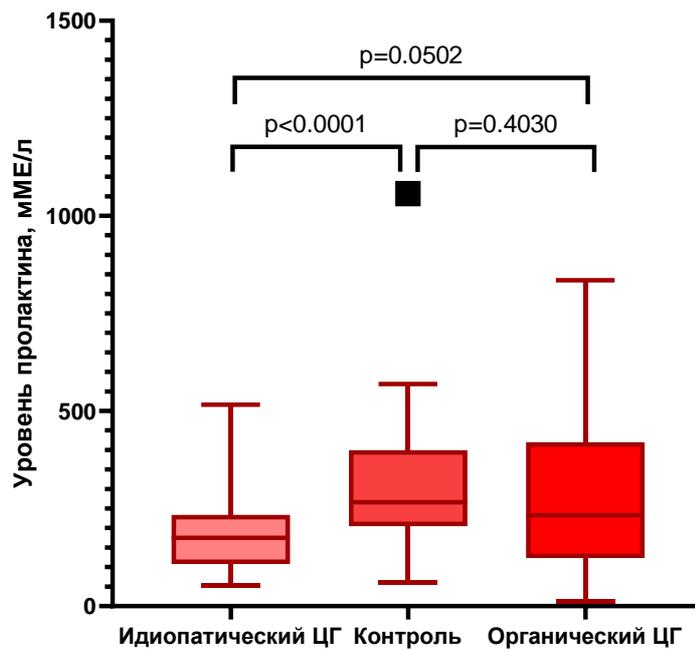


Рисунок 7 – Уровни пролактина у обследованных женщин

Также был проведен анализ уровней ТТГ: в группе органического ЦГ этот показатель закономерно статистически ниже, чем в группах идиопатического ЦГ и контроля: ранее было отмечено, что у пациенток группы органического ЦГ фиксировались другие компоненты гипопитуитаризма, помимо ЦГ – в том числе центральный (или вторичный) гипотиреоз. Отсутствие же достоверных различий в уровнях свободного тироксина между всеми группами подтверждает адекватную компенсацию вторичного гипотиреоза в группе пациенток органического ЦГ (рисунки 8 и 9 на стр. 58).

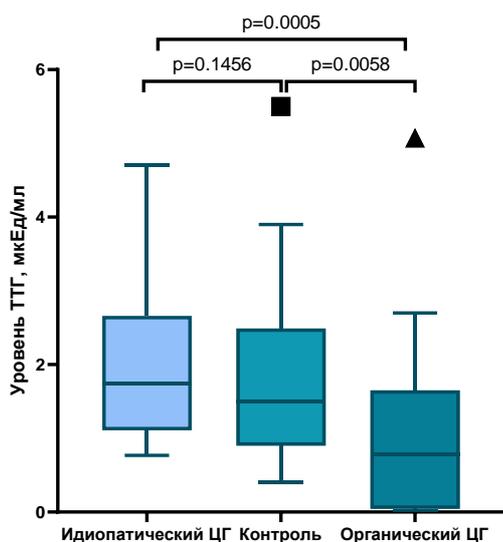


Рисунок 8 – Уровни ТТГ в группах обследованных женщин

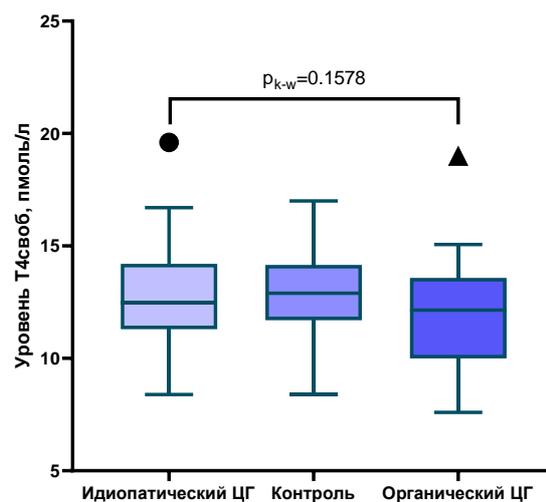


Рисунок 9 – Уровни Т4своб в группах обследованных женщин

3.3 Определение базальных уровней гонадотропинов, значимых для диагностики центрального гипогонадизма

Для определения диагностически значимых отрезных точек уровней гонадотропинов для подтверждения центрального генеза гипогонадизма при отсутствии органического поражения хиазмально-селлярной области был проведен ROC-анализ уровней ЛГ групп идиопатического ЦГ и контроля, результаты которого представлены ниже в таблице 12 и на рисунках 10 и 11.

Таблица 12

Отрезные диагностические точки уровней гонадотропинов для определения центрального генеза гипогонадизма без органического поражения ХСО

Значение	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC ROC-curve
ЛГ <2,36 МЕ/л	82,61%	94,12%	p<0,0001	0,9167
ФСГ <5,08 МЕ/л	73,91%	80,88%	p<0,0001	0,8216

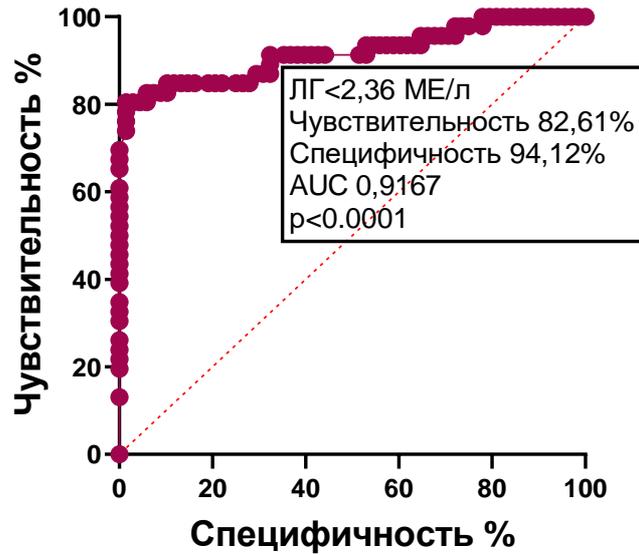


Рисунок 10 – Определение диагностически значимого для ЦГ уровня ЛГ

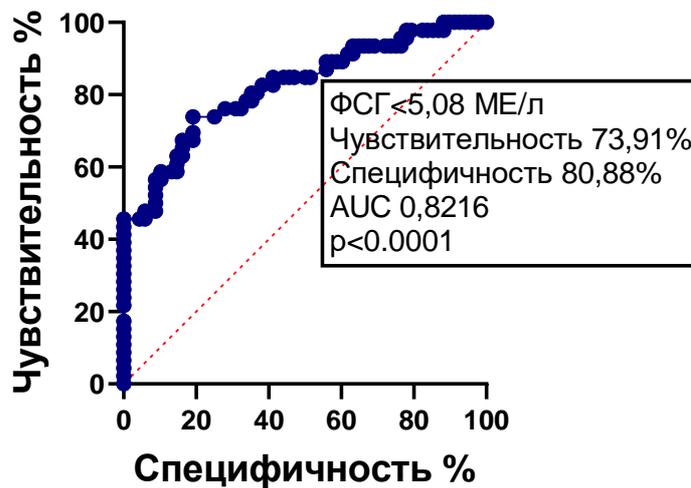


Рисунок 11 – Определение диагностически значимого для ЦГ уровня ФСГ

Таким образом, уровни ЛГ менее 2,36 МЕ/л и ФСГ менее 5,08 МЕ/л указывают на наличие центрального гипогонадизма у женщин с гипоэстрогенной аменореей и отсутствием органических поражений хиазмально-селлярной области по данным МРТ с достаточно высокими чувствительностью и специфичностью.

При выполнении аналогичного анализа по сравнению уровней гонадотропинов между группами органического ЦГ и контролем получены следующие данные: ЛГ менее 1,95 МЕ/л и ФСГ менее 4,22 МЕ/л указывают на

центральный генез гипогонадизма вследствие органического поражения с чувствительностью и специфичностью более 89% (таблица 13, рисунки 12 и 13)

Таблица 13

Отрезные диагностические точки уровней гонадотропинов для определения центрального генеза гипогонадизма вследствие органического поражения ХСО

Значение	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC ROC-curve
ЛГ <1,95 МЕ/л	96,77%	97,06%	p<0,0001	0,9867
ФСГ <4,22 МЕ/л	96,77%	89,71%	p<0,0001	0,9865

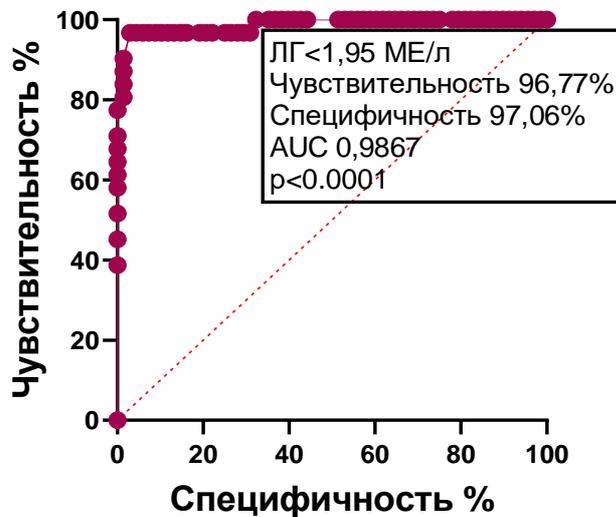


Рисунок 12 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня ЛГ

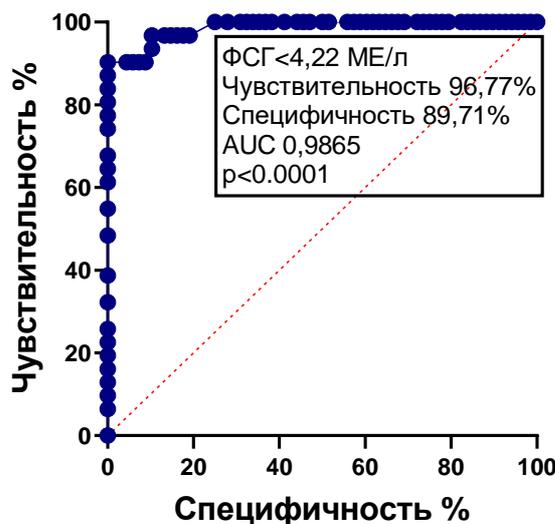


Рисунок 13 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня ФСГ.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что уровень ЛГ менее 2,36 МЕ/л и ФСГ менее 5,08 МЕ/л указывают на центральный генез гипоэстрогенной аменореи, а в случае снижения ЛГ менее 1,95 МЕ/л и ФСГ менее 4,22 МЕ/л с большой вероятностью центральный гипогонадизм мог возникнуть вследствие органического поражения хиазмально-селлярной области.

3.4 Дополнительные гормональные маркеры центрального гипогонадизма у женщин

Принимая во внимание выявленные достоверно более низкие уровни пролактина у пациенток группы идиопатического ЦГ, предположено наличие прогностической ценности уровня пролактина в диагностике этого состояния; проведен ROC-анализ, по данным которого уровень пролактина менее 204,5 мМЕ/л показал чувствительность 69,77% и специфичность 76,09% для определения центрального генеза гипогонадизма (рисунок 14).

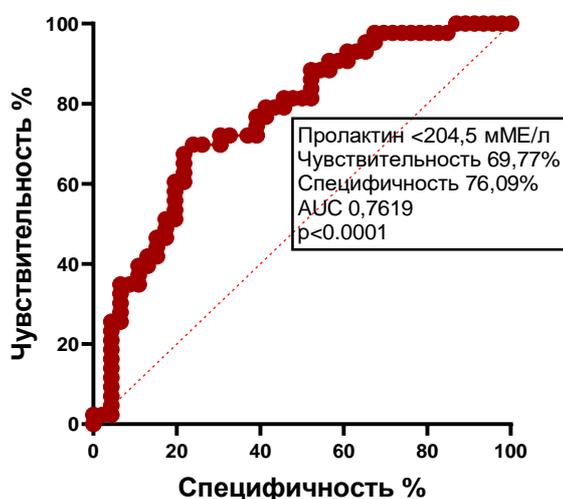


Рисунок 14 - Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня пролактина

У 6 из 32 пациенток с органическим ЦГ (19%) фиксировался уровень тестостерона ниже предела чувствительности метода анализа (<0,1 нмоль/л); из этих 6 пациенток – у 4 уровень ДГЭАС был также неопределяемым (<0,1

мкмоль/л), что говорит о выраженной гипоандрогемии у этих пациенток. У остальных пациенток уровень общего тестостерона находился в пределах 0,1 до 1,7 нмоль/л; медиана составила 0,1 нмоль/л (Q1;Q3 – [0,09; 0,6]) при референсных значениях 0,45–2,91 нмоль/л; уровни ДГЭАС составили от 0,11 до 8,49 с медианой 0,173 мкмоль/л ([0,09; 1,525]) при референсных значениях 0,49–10,6 мкмоль/л, т.е. более чем у половины пациенток фиксировались уровни андрогенов ниже референсного значения. При проведении ROC-анализа для установления прогностической ценности определения уровней андрогенов в диагностике органического ЦГ, было выявлено что уровни общего тестостерона <0,69 нмоль/л и ДГЭАС <3 нмоль/л обладают высокой чувствительностью и специфичностью (таблица 14 и рисунки 15 и 16 на стр. 63).

Таблица 14

Отрезные диагностические точки уровней общего тестостерона и ДГЭАС для определения центрального генеза гипогонадизма вследствие органического поражения ХСО

Значение	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC ROC-curve
Общ. тестостерон <0,69 нмоль/л	80,00%	85,19%	p<0,0001	0,8616
ДГЭАС <3 мкмоль/л	88,89%	90,48%	p<0,0001	0,9246

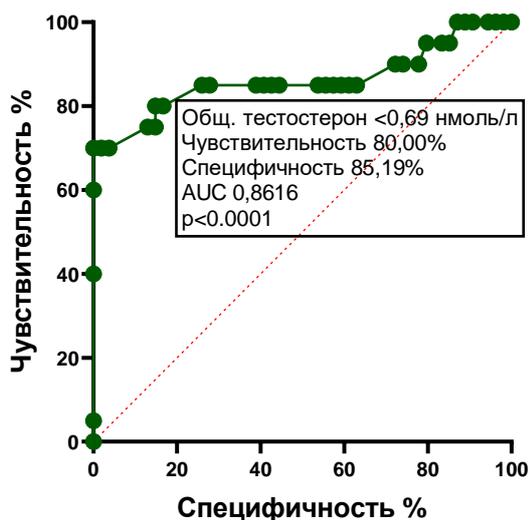


Рисунок 15 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня общего тестостерона

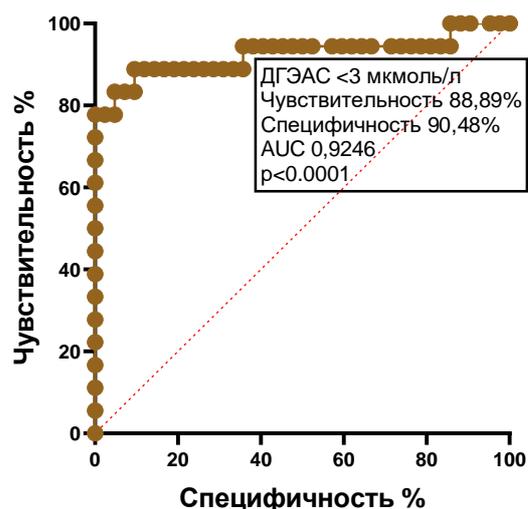


Рисунок 16 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня дегидроэпиандростерон-сульфата

Таким образом, дополнительными гормональными маркерами органического ЦГ являются уровни общего тестостерона менее $0,69 \text{ нмоль/л}$ и ДГЭАС менее 3 мкмоль/л , идиопатического ЦГ – уровень пролактина менее 204 мМЕ/л .

3.5 Диагностическая ценность стимуляционной пробы с аналогом гонадолиберина (трипторелин) в диагностике центрального гипогонадизма у женщин

24 пациенткам из группы идиопатического ЦГ, 11 пациенткам группы органического ЦГ и 18 здоровым женщинам контрольной группы была проведена проба с аналогом ГнРГ короткого действия трипторелином. Субъектам контрольной группы проба проводилась в раннюю фолликулярную фазу (на 3-7 день менструального цикла).

В подгруппе органического ЦГ в 3 случаях из 11 было зафиксировано снижение уровня ЛГ, и в 2 из 11 – снижение уровня ФСГ после введения

трипторелина. Процентный прирост уровней гонадотропинов в этих случаях обозначен как отрицательный. Основные результаты проб представлены в таблице 15.

Таблица 15

Результаты пробы с трипторелином

Показатель диапазон значений, Ме [Q1;Q3]	Идиопатический ЦГ (группа 1) (n=24)	Органический ЦГ (группа 2) (n=11)	Контроль (группа 3) (n=18)	Достоверность различий
ЛГ базальный (МЕ/л)	0,1 – 7,4 2,36 [0,935; 3,4]	0,1 – 1,9 0,6 [0,15; 1,2]	1,8 – 9,66 5,4 [4; 6,54]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,0081^+$ $p_{1,3} = 0,0004^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
ЛГ стимулированный (МЕ/л)	0,41 – 93,3 26,9 [10,35; 33,98]	0,09 – 35,5 1,6 [0,55; 9,45]	24,73 – 101,97 63,2 [42,25; 84,73]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,0014^+$ $p_{1,3} < 0,0001^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
Относительный прирост уровня ЛГ	1,92 – 49,9 11,05 [8,97; 15,15]	0,15 – 100 5,33 [0,92; 17,15]	4,53 – 25,5 12,2 [9,76; 17,5]	$p_{k-w} = 0,1301$
Прирост уровня ЛГ (%)	92 – 4889 1005 [773; 1723]	-850 – 9900 433 [-8,35; 1615]	353 – 2449 1122 [876; 1654]	$p_{k-w} = 0,1386$
ФСГ базальный (МЕ/л)	0,19 – 9,3 5,8 [2,9; 6,57]	0,3 – 6,1 1,7 [0,9; 4,85]	3 – 11,51 7,73 [6,45; 8,6]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} = 0,0267$ $p_{1,3} = 0,0011^+$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
ФСГ стимулированный (МЕ/л)	3,2 – 43,73 22,45 [9,1; 27,08]	0,5 – 12,4 3,2 [1,35; 9,35]	13,6 – 60,4 27,57 [21,6; 36,66]	$p_{k-w} < 0,0001^*$ $p_{1,2} < 0,0001^+$ $p_{1,3} = 0,0431$ $p_{2,3} < 0,0001^+$
Относительный прирост уровня ФСГ	0,81 – 18,26 4,02 [3,28; 6,15]	0,21 – 27,3 1,88 [1,14; 2,415]	2,08 – 5,52 4,11 [3,41; 4,83]	$p_{k-w} = 0,0061^*$ $p_{1,2} = 0,0023^+$ $p_{1,3} = 0,5882$ $p_{2,3} = 0,0058^+$

Прирост уровня ФСГ (%)	81 – 1726 301 [215,25; 498]	-78,7 – 2633 88 [13,5; 769]	108 – 451,5 311 [241; 383]	$p_{k-w}=0,3613^*$
---------------------------	--------------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------

* $p < 0,05$, статистически значимые различия при сравнении трех независимых групп методом Краскела-Уоллеса

+ $p < 0,0167$, статистически значимые различия при апостериорных сравнениях критерием Манна-Уитни

Также, как и при описанном в главе 3.2 сравнении всех групп участниц исследования, были выявлены достоверно более низкие базальные уровни гонадотропинов у пациенток по сравнению с контрольной группой. Что является важным для изучаемой стимуляционной пробы, были выявлены значимые различия между стимулированными уровнями ЛГ и ФСГ (рисунки 17 и 18), за исключением сравнения по стимулированному ФСГ между группами идиопатического ЦГ и контроля. В то же время не было выявлено различий в процентном уровне прироста ЛГ и ФСГ и в относительном приросте ЛГ. Относительный прирост уровня ФСГ в группе органического поражения был достоверно ниже, чем в группе контроля и группе идиопатического ЦГ.

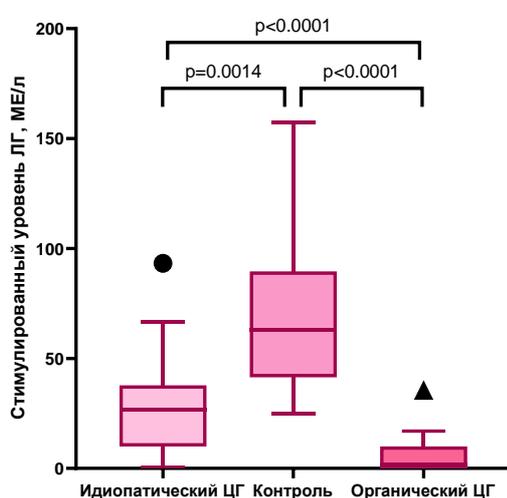


Рисунок 17 – Стимулированные уровни ЛГ в группах обследованных женщин

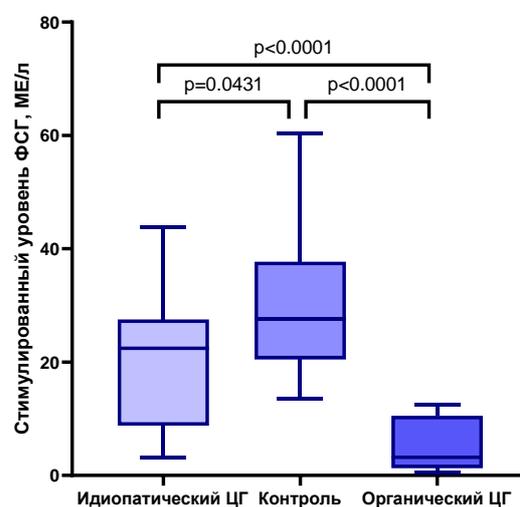


Рисунок 18 – Стимулированные уровни ФСГ в группах обследованных женщин

Был проведен ROC-анализ стимулированных уровней гонадотропинов с целью выявления диагностически значимых для определения центрального генеза гипогонадизма при отсутствии органического поражения ХСО. Результаты представлены в таблице 16 и рисунках 19 и 20.

Таблица 16

Определение диагностически значимых стимулированных уровней гонадотропинов при идиопатическом ЦГ

Значение	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC ROC-curve
Стимулированный уровень ЛГ <35,3 МЕ/л	75,0%	94,4%	p<0,0001	0,8704
Стимулированный уровень ФСГ <24,8 МЕ/л	61,9%	61,11%	p=0,0425	0,6905

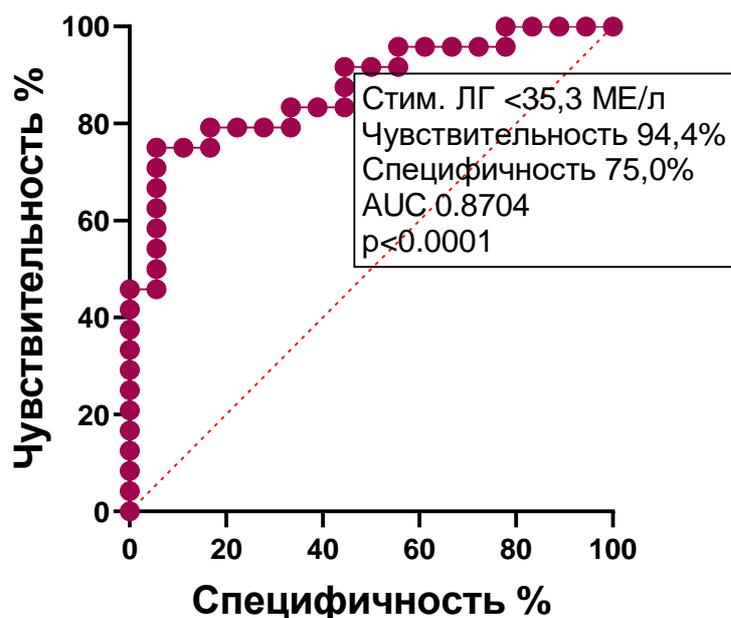


Рисунок 19 - Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня стимулированного ЛГ

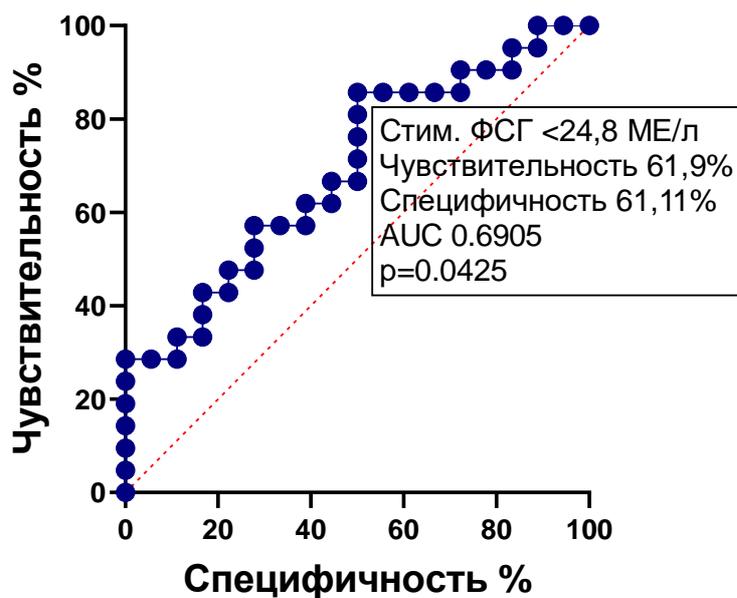


Рисунок 20 – Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня стимулированного ФСГ

Как можно увидеть, определенный в ходе пробы с трипторелином стимулированный уровень ФСГ, по которому не было выявлено достоверной разницы между группами идиопатического ЦГ и контрольной, обладает незначимой чувствительностью и специфичностью для диагностики центрального генеза идиопатического гипогонадизма, и не может быть использован для диагностики этого состояния. Что касается органического центрального гипогонадизма, абсолютные значения стимулированных уровней гонадотропинов имели статистически значимые отличия между пациентками и контролем, показали очень высокую чувствительность и специфичность в диагностике центрального генеза этого состояния, что проиллюстрировано в таблице 17 и на рисунках 21 и 22 (стр. 68).

Определение диагностически значимых стимулированных уровней
гонадотропинов при органическом ЦГ

Значение	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC ROC-curve
Стимулированный уровень ЛГ <20,9 МЕ/л	90,91%	100,0%	p<0,0001	0,9949
Стимулированный уровень ФСГ <13,0 МЕ/л	100%	100%	p<0,0001	1,0

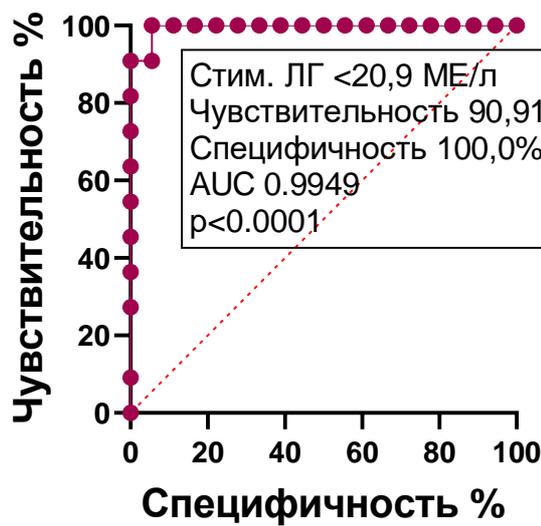


Рисунок 21 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня стимулированного ЛГ

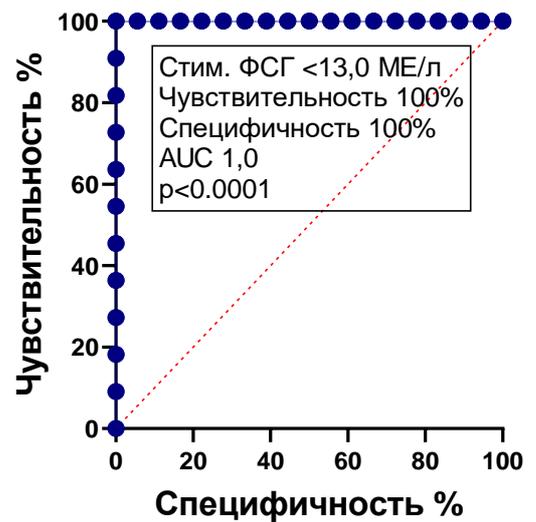


Рисунок 22 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ уровня стимулированного ФСГ

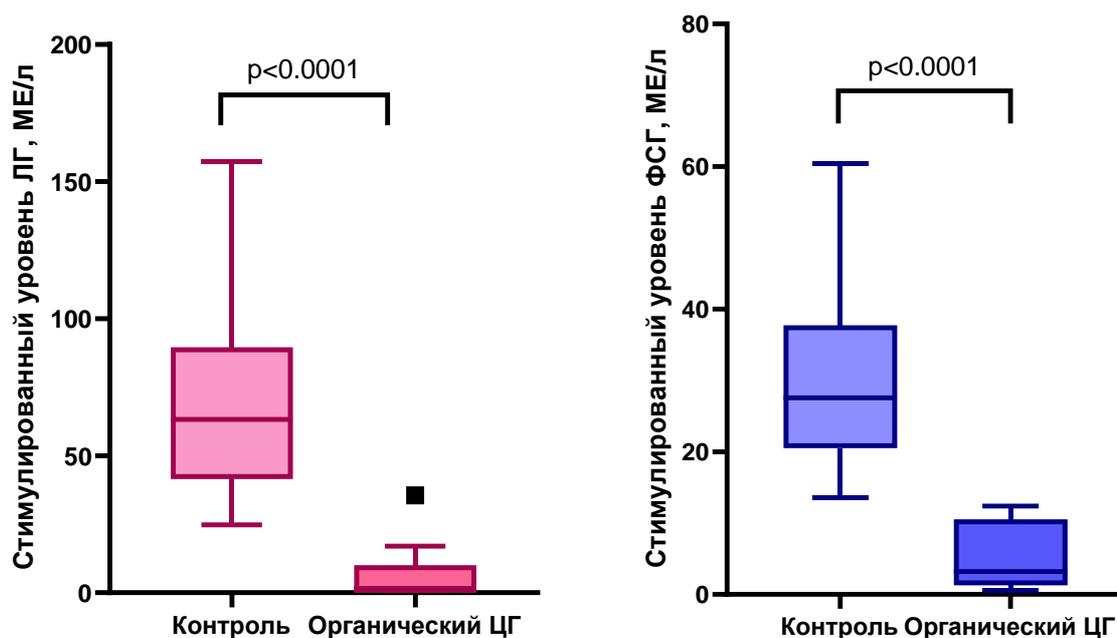


Рисунок 23 - Стимулированные уровни гонадотропинов – сравнение групп органического ЦГ и контроля

При анализе стимулированных уровней ЛГ в группе органического ЦГ выявлен один выброс значений (уровень 35,5 МЕ/л, рисунок 23), который был зафиксирован в случае пациентки с гипопитуитаризмом на фоне синдрома первично пустого турецкого седла. При исключении из ROC-анализа этого значения пороговый диагностический стимулированный уровень ЛГ не изменился (20,9 МЕ/л), но возросла его чувствительность (до 100%).

Значения относительного и процентного прироста показателей гонадотропинов не показали статистически значимых различий между группами пациенток и контроля, за исключением относительного прироста ФСГ в группе органического ЦГ. В ходе ROC-анализа выявлено, что относительный прирост ФСГ менее 2,67 говорит в пользу ЦГ при органическом поражении ХСО с чувствительностью 81,82% и специфичностью 94,12% (рисунок 24).

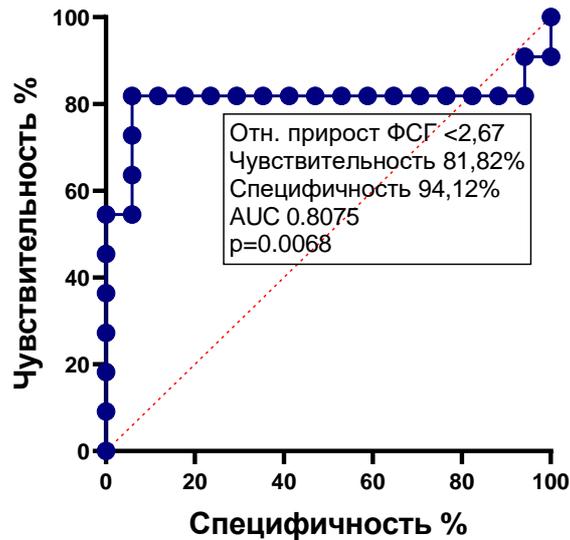


Рисунок 24 – Определение диагностически значимого для органического ЦГ значения относительного прироста ФСГ

Таким образом, в ходе пробы с трипторелином диагностическую значимость для определения центрального генеза идиопатического ЦГ имеет стимулированный уровень ЛГ (менее 35,3 МЕ/л), и он может использоваться изолированно, без исследования стимулированного уровня ФСГ. Что же касается ЦГ на фоне органического поражения, стимулированные уровни обоих гонадотропинов показали очень высокие чувствительность и специфичность для диагностики этого состояния (ЛГ менее 20,9 МЕ/л и ФСГ менее 13 МЕ/л). Кроме того, относительный прирост ФСГ менее 2,67 показал высокую чувствительность и специфичность для диагностики ЦГ на фоне органического поражения. Процентный прирост гонадотропинов в результате пробы не показал достоверных различий между группами пациенток и контрольной группой, в связи с чем анализ для выявления пороговых значений по этому показателю не проводился.

3.6 Генетические исследования

15 пациенткам группы ИЦГ и 21 женщине из группы контроля (группа №3) было проведено исследование количества мРНК генов *GNRH1*, *GNRHR*, *PROK2*,

DUSP6, *WDR11*, *CHD7*, участвующих в становлении и функционировании репродуктивной оси, а также проведен структурный анализ этих генов с целью поиска мажорных мутаций. При структурном анализе методами АС-ПЦР и SSCP не было выявлено мутаций ни в одном из исследованных генов.

Результаты измерения количественной экспрессии мРНК исследуемых генов представлены в таблице 18.

Таблица 18

Результаты сравнительного анализа экспрессии репродуктивно заинтересованных генов

Экспрессия генов Диапазон значений, Ме [Q1; Q3]	Идиопатический ЦГ n=15	Контроль n=21	Достоверность различий
<i>GNRHR</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	0,068 – 3,61 0,6422 [0,207; 1,672]	0,415 – 1,968 0,865 [0,699; 1,294]	p=0,4463
<i>GNRH1</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	0,0113 – 1,544 0,471 [0,153; 1,006]	0,12 – 0,734 0,354 [0,284; 0,454]	p=0,6501
<i>PROK2</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	0,656 – 113,44 11,29 [6,26; 21,67]	3,41 – 10,62 6,08 [4,62; 9,12]	p=0,0486*
<i>CHD7</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	0,03 – 9,06 1,78 [0,9; 2,81]	0,747 – 2,417 1,315 [1,15; 1,973]	p=0,6820
<i>WDR11</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	0,931 – 156,5 2,54 [1,983; 3,03]	1,07 – 2,73 1,96 [1,6; 2,21]	p=0,0330*
<i>DUSP6</i> (*10 ⁻³ усл.ед.)	5,81 – 56,74 17,22 [12,51; 33,23]	6,34 – 16,54 12,12 [9,78; 14,15]	p=0,0364*

* p<0,05, статистически значимые различия при сравнении критерием Манна-Уитни

В ходе анализа показателей количественной экспрессии были выявлены значимые различия в уровнях *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6* – экспрессия этих нейроразвивающих генов, в соответствии с полученными данными, была достоверно выше у пациенток по сравнению с группой контроля. Таким образом,

повышение уровня экспрессии этих генов может указывать на наличие центрального гипогонадизма. Для количественной оценки уровней экспрессии, говорящих в пользу ЦГ, был проведен ROC-анализ полученных для *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6* уровней; результаты представлены в таблице 19 и рисунках 25-27.

Таблица 19

Результаты ROC-анализа количественной экспрессии

Значение экспрессии	Чувствительность	Специфичность	Значимость	AUC	ROC-curve
<i>PROK2</i> > 9,356*10 ⁻³	60,0%	82,35%	p=0,0474	0,7059	
<i>WDR11</i> > 2,224*10 ⁻³	66,67%	75%	p=0,0328	0,7250	
<i>DUSP6</i> > 14,78*10 ⁻³	60,0%	83,33%	p=0,0360	0,7148	

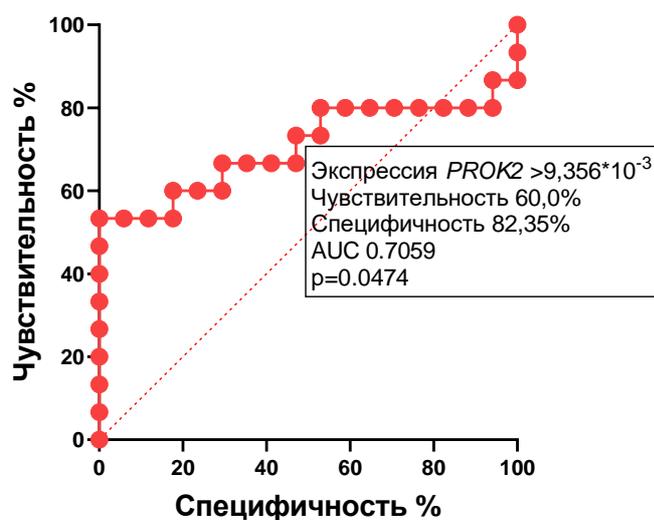


Рисунок 25 – Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня количественной экспрессии *PROK2*

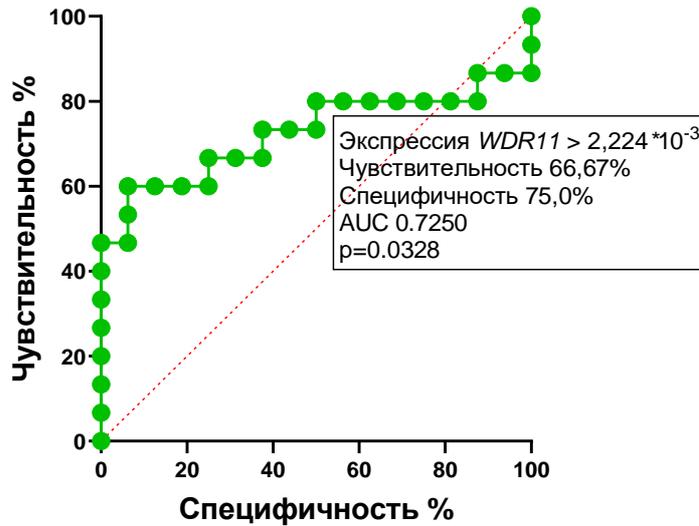


Рисунок 26 - Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня количественной экспрессии *WDR11*

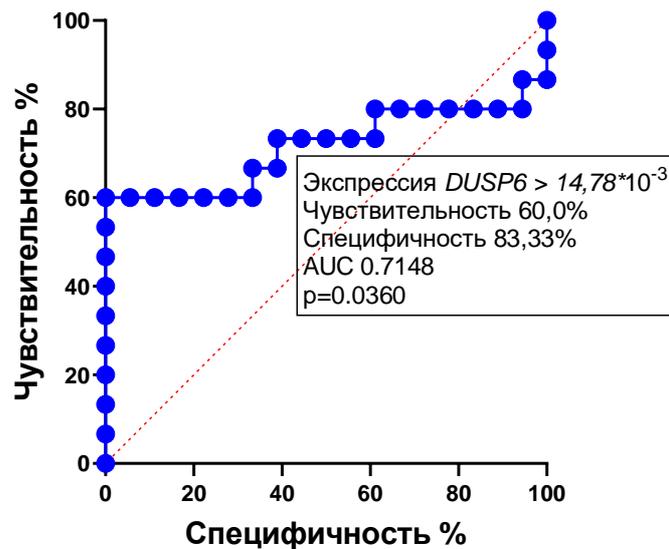


Рисунок 27 - Определение диагностически значимого для идиопатического ЦГ уровня количественной экспрессии *DUSP6*

Таким образом, были выявлены пороговые значения экспрессии генов *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6*, имеющие диагностическую значимость для определения центрального генеза женского гипогонадизма. В то же время, чувствительность и специфичность этих отрезных точек варьирует в пределах 60-83% и площади под ROC-кривыми составляют от 0,7059 до 0,7250 – что говорит

об их невысокой диагностической ценности при использовании изолированно; однако, эти показатели могут использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия ЦГ в совокупности с нормальными или низкими показателями гонадотропинов на фоне гипоестрогенной аменореи.

3.7 Алгоритм персонализированной диагностики центрального гипогонадизма у женщин

Полученные в ходе работы данные позволяют обосновать алгоритм комплексной персонализированной диагностики центрального гипогонадизма у женщин, основанный на значении базальных уровней гонадотропинов, результатах стимуляционной пробы с аналогом ГнРГ трипторелином и определения количественной экспрессии мРНК нейроразвивающих генов.

Применение алгоритма персонализированной диагностики:

1. У пациенток с гипоестрогенной аменореей после исключения гиперпролактинемии, гиперандрогенемии, первичного гипотиреоза и гинекологических заболеваний рекомендован контроль базальных уровней следующих гормонов: ЛГ, ФСГ, общего тестостерона и ДГЭАС посредством хемилюминисцентного иммунного анализа.
2. Гипоестрогенная аменорея в сочетании с ЛГ < 2,36 МЕ/л и ФСГ < 5,08 МЕ/л дает основание с высокой чувствительностью и специфичностью диагностировать центральный гипогонадизм, что является показанием к проведению МРТ хиазмально-селлярной области.
3. Гипоестрогенная аменорея в сочетании с уровнями общего тестостерона < 0,69 нмоль/л, ДГЭАС < 3 мкмоль/л, ЛГ < 1,95 МЕ/л и ФСГ < 4,22 МЕ/л с большой вероятностью указывает на наличие ЦГ на фоне органического поражения ХСО, в связи с чем показано исключение недостаточности других тропных функций гипофиза до или одновременно с проведением МРТ ХСО.

4. Органическое поражение ХСО подтверждает диагноз ЦГ и является показанием к исключению недостаточности других тропных функций; при их отсутствии диагностируется изолированный центральный гипогонадизм на фоне органического поражения, при наличии – парциальный или пангипопитуитаризм.
5. Гипоэстрогенная аменорея в сочетании с сомнительными значениями гонадотропинов (ЛГ более 2,36 МЕ/л, ФСГ более 5,08 МЕ/л, но в пределах референсных значений) дает основания предположить наличие у пациентки ЦГ; для уточнения диагноза в этом случае показано проведение стимуляционной пробы с аналогом ГнРГ (трипторелин) и экспрессионного анализа. При уровне стимулированного ЛГ менее 35,3 МЕ/л и значениях экспрессии $PROK2 > 9,356 \cdot 10^{-3}$ усл.ед., $WDR11 > 2,224 \cdot 10^{-3}$ усл.ед. и $DUSP6 > 14,78 \cdot 10^{-3}$ МЕ/л диагноз ЦГ высоковероятен, что является показанием к проведению МРТ ХСО. При уровне стимулированного ЛГ более 35,3 МЕ/л центральный генез гипогонадизма маловероятен, и для проведения МРТ показаний нет.
6. Отсутствие органического поражения делает вероятным диагноз идиопатического центрального гипогонадизма, для подтверждения которого рекомендована проба с п/к введением 0,1 мг аГнРГ (трипторелин) и исследование экспрессии мРНК генов *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6*: при значении стимулированного уровня ЛГ в результате пробы менее 35,3 МЕ/л и значениях экспрессии $PROK2 > 9,356 \cdot 10^{-3}$ усл.ед., $WDR11 > 2,224 \cdot 10^{-3}$ усл.ед. и $DUSP6 > 14,78 \cdot 10^{-3}$ диагноз идиопатического ЦГ можно считать подтвержденным.

Алгоритм персонализированной диагностики представлен на рисунке 28 (стр. 76).

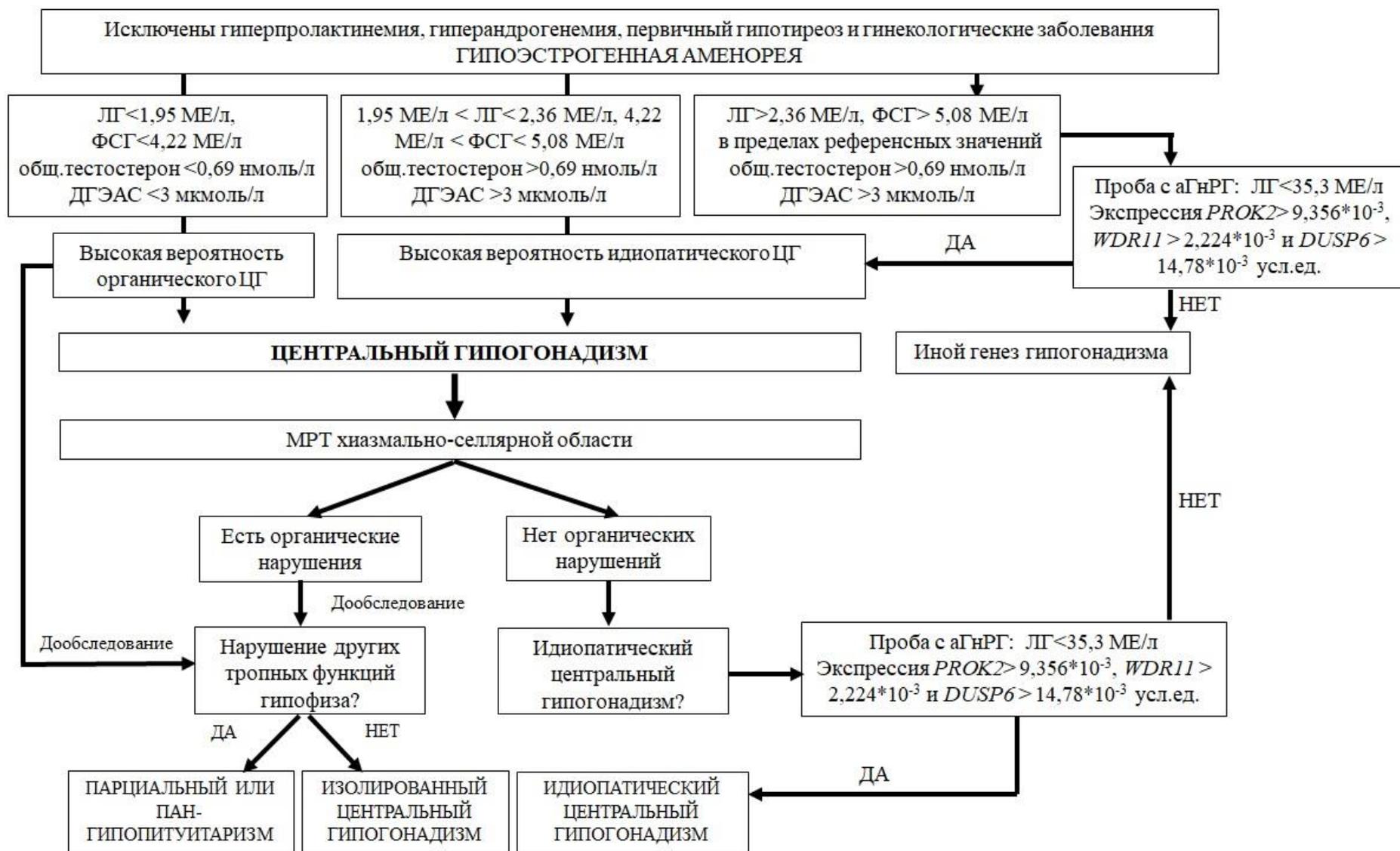


Рисунок 28 – Алгоритм диагностики центрального гипогонадизма у женщин

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В первой части исследования проведена оценка роста-весовых показателей пациенток. Было выявлено, что у пациенток с центральным гипогонадизмом, обусловленным органическим поражением хиазмально-селлярной области, ИМТ достоверно выше, чем в группе ЦГ на фоне интактной ХСО и в контрольной группе. Стоит отметить, что в этой группе пациенток у подавляющего большинства женщин (27/32, 84%) помимо центрального гипогонадизма наблюдались другие виды гипофизарной недостаточности, компенсированные на момент включения в исследование. По данным некоторых исследований [5], наличие сопутствующей центральному гипогонадизму гипофизарной недостаточности способствует повышению массы тела и снижению уровней андрогенов: в ходе анализа гормональных показателей в рамках данной диссертационной работы также была показана гипоандрогемия в группе пациенток органического ЦГ по сравнению с группами контроля и идиопатического ЦГ.

Вторая часть исследования была посвящена оценке гормональных профилей пациенток с ЦГ и определению диагностической ценности базальных уровней гонадотропинов при женском центральном гипогонадизме. Были выявлены достоверные различия в уровнях гонадотропинов между группами пациенток и контроля, а также между пациентками с ЦГ на фоне органического поражения и без такового – при органическом поражении уровни ЛГ и ФСГ достоверно ниже. На основании этих различий стало возможным определение уровней ЛГ и ФСГ, имеющих высокую прогностическую ценность в диагностике ЦГ на фоне органического поражения или без него.

Наличие гипоэстрогенной аменореи было критерием включения пациенток в исследование – при анализе базальных уровней периферических половых стероидов подтверждены достоверно более низкие уровни эстрадиола у пациенток обеих групп по сравнению с контролем и отсутствие различий по этому признаку между группами пациенток. Однако, выявлено достоверное

различие в уровне тестостерона: в группе органического ЦГ уровни этого гормона были значимо ниже, чем в группах идиопатического ЦГ и контрольной. Те же самые характеристики присущи уровню ДГЭАС – отсутствие различий между группой идиопатического ЦГ и контроля, и достоверно более низкие уровни у пациенток группы органического ЦГ.

С одной стороны, гиперандрогенемия являлась критерием исключения при наборе пациенток в исследование; с другой, отсутствие различий в уровне общего тестостерона и ДГЭАС у пациенток в группе идиопатического ЦГ по сравнению с контролем может быть дополнительным фактором, указывающим на центральную этиологию гипоэстрогенной аменореи. Одной из наиболее частых причин гиперандрогенемии у женщин является синдром поликистозных яичников (СПКЯ) [112]. Несмотря на то, что СПКЯ имеет высокую распространенность – от 5 до 20% женщин репродуктивного возраста по разным данным [16, 113], этот синдром является диагнозом исключения. Клинически проявления дисрегуляции репродуктивной оси при СПКЯ сходны с ЦГ: ановуляция, олиго- и аменорея. Кроме того, описаны УЗ-признаки СПКЯ – увеличение объема яичников и количества фолликулов в них – при ультразвуковом исследовании органов малого таза у пациенток с ЦГ [75, 106]. В такой ситуации отсутствие гиперандрогенемии (и клинической, и биохимической) у пациенток с ановуляцией может указывать на наличие у них ЦГ.

Что касается сниженных уровней тестостерона и ДГЭАС в группе органического ЦГ – учитывая патогенез синдрома, низкие уровни периферических половых стероидов являются вполне предсказуемыми в отсутствие стимулирующего влияния гонадотропинов. В литературе вопрос гипоандрогенемии при ЦГ освещен весьма узко: опубликована работа шведских ученых 2018г. [86], где изучался андрогенный статус пациенток с гипопитуитаризмом – выборка была сформирована на основе базы данных пациенток, получавших заместительную терапию препаратами гормона роста. По данным этой работы, более чем у половины пациенток с диагностированным на основании критериев рекомендаций Европейского эндокринологического

общества от 2016г. [42] центральным гипогонадизмом, фиксировались неопределяемые уровни общего тестостерона (у 62% пациенток) и сниженные уровни ДГЭАС (у 53%) и андростендиона (51%). При этом по результатам субанализа этого же исследования – наибольший процентный состав женщин с гипоандрогемией наблюдался в подгруппах пациенток с пангипопитуитаризмом (94%) и с сочетанной АКТГ- и гонадотропной недостаточностью (93%), что указывает на роль кортикотропной оси в поддержании андрогенного статуса женщин. В настоящем исследовании в группу органического ЦГ также были включены женщины с сочетанным компенсированным гипопитуитаризмом, что подтверждено отсутствием достоверных различий по уровню свободного тироксина между группами и отсутствием клинических признаков гипокортицизма, но, очевидно, само по себе наличие сочетанной тропной недостаточности вносит вклад в фиксируемые уровни периферических половых стероидов. Ввиду этого факта, а также учитывая нормальные уровни андрогенов у пациенток с идиопатическим ЦГ, гипоандрогемию можно рассматривать как один из маркеров органического гипофизарного повреждения и рекомендовать при ее выявлении у женщин с центральной гипозэстрогенной аменореей исследование на предмет исключения недостаточности других тропных функций. В ходе работы выявлено, что уровни общего тестостерона менее 0,69 нмоль/л и ДГЭАС менее 3 мкмоль/л могут быть использованы в качестве дополнительного критерия диагностики ЦГ на фоне органического поражения, и выявление таких уровней андрогенов у женщин с гипозэстрогенной аменореей на фоне низких уровней гонадотропинов является поводом для исключения недостаточности других тропных функций гипофиза.

В том же шведском исследовании 2018г. [86] было выявлено, что среди обследованных пациенток доля получавших заместительную терапию половыми стероидами была ниже, чем доля получавших восполнение дефицита других тропных функций – 74% против 100%, что косвенно может указывать на неоптимальную диагностику ЦГ у таких женщин и неназначение им необходимой терапии. Также рассматривалась необходимость назначения женщинам с ЦГ и

гипоандрогемией терапии препаратами ДГЭАС и тестостерона. В Российской Федерации на данный момент отсутствуют препараты, которые можно было бы применять в качестве заместительной андрогенной терапии у женщин.

В рамках первого этапа работы у всех участниц исследования были также проанализированы уровни пролактина для исключения гиперпролактинемии. Выявлены статистически значимо более низкие уровни пролактина у пациенток группы идиопатического ЦГ, при этом между группами органического ЦГ и контролем различий по этому показателю не выявлено. Синтез и секреция пролактина находятся под влиянием большого количества биологически активных веществ: в частности, дофамин является ингибитором синтеза пролактина, а к числу активаторов можно отнести ГнРГ, тиролиберин, эстрогены, серотонин, окситоцин, вазопрессин и другие соединения [12]. Соответственно, с учетом нарушения паттерна секреции ГнРГ и низких уровней эстрогенов у женщин при идиопатическом ЦГ лактотрофы гипофиза не получают достаточного активирующего влияния, что и выражается снижением синтеза пролактина. Более того, есть данные о повышенной допаминэргической активности у женщин с ЦГ, что может приводить к подавлению синтеза пролактина – в исследованиях было показано отсутствие пациенток с ФГА повышения пролактина в ответ на введение антагониста дофамина метоклопрамида [95]. В настоящем исследовании было предположено наличие прогностической ценности уровня пролактина в диагностике ЦГ без органического поражения, однако проведенный ROC-анализ показал, что уровень пролактина менее 204,5 мМЕ/л имеет невысокую прогностическую ценность: чувствительность 69,77% и специфичность 76,09% (AUC ROC-curve 0,7619). Помимо этого, уровень 204,5 является нормальным согласно референсным значениям большинства лабораторий. В этой связи уровень пролактина как единственный критерий для диагностики ЦГ использован быть не может. Однако, как дополнительный критерий центрального генеза гипогонадизма, тенденция к низкой концентрации пролактина имеет ценность.

В случае органического ЦГ не фиксируется достоверных отличий от контроля по уровню пролактина. Патогенез ЦГ на фоне органических поражений,

очевидно, отличается от такового при идиопатической форме, и сопряжен не столько с нарушением паттерна секреции ГнРГ, сколько с физическим воздействием на гонадотрофы, что может сопровождаться наличием достаточного количества функционирующих лактотрофов. По данным некоторых исследований, нормальный уровень пролактина даже может быть расценен как маркер сохранности достаточного количества клеток аденогипофиза, и гипопролактинемия в случае наличия органической патологии ХСО указывает на обширное поражение гипофиза и более тяжелую степень гипопитуитаризма [114]. В то же время органические изменения ХСО сами по себе могут быть причиной повышения пролактина в результате сдавления ножки гипофиза и затруднения поступления ингибитора дофамина к лактотрофам [14]. И, наконец, отсутствие стимулирующего влияния на синтез пролактина, характерное для идиопатического ЦГ, присуще также и органическому ЦГ. Таким образом, в случае органического поражения ХСО отсутствие адекватного стимулирующего влияния на лактотрофы компенсируется недостаточностью влияния ингибирующего, и в результате фиксируется уровень пролактина не отличающийся от такового у здоровых женщин.

Отдельно был рассмотрен вопрос определения прогностической ценности для диагностики разных форм ЦГ стимуляционной пробы с аналогом ГнРГ трипторелином. В литературном обзоре указано, что методика проведения этой пробы разнится между проанализированными источниками. В ходе настоящей работы было проведено исследование базальных и стимулированных введением 0,1 мг трипторелина уровней гонадотропинов. Исследование стимулированных уровней проводилось через 4 часа после подкожного введения трипторелина. Указанная методика обладает удобством – для ее выполнения не требуются специализированное оборудование или длительные инвазивные вмешательства, поэтому она может быть выполнена в любом учреждении с оборудованным процедурным кабинетом (в том числе и амбулаторно). Также проведение пробы по описанной методике требует небольших затрат времени со стороны медицинского персонала. Показанием к проведению пробы является

необходимость подтверждения центрального генеза гипогонадизма при следующих условиях: а) в случае получения сомнительных результатов исследования уровней гонадотропинов – ЛГ более 2,36 МЕ/л и ФСГ более 5,08 МЕ/л (но не выше референсных пределов метода) у пациенток с подозрением на ЦГ и б) для верификации диагноза идиопатического ЦГ на фоне интактного состояния хиазмально-селлярной области по результатам МРТ. При указанных условиях диагноз ЦГ является диагнозом исключения, поэтому наличие дополнительного диагностического критерия в виде стимуляционного теста облегчает задачу диагностики этого редкого состояния.

Для подтверждения идиопатического генеза гипогонадизма в отсутствие органического поражения ХСО наряду со стимуляционным тестом может быть использовано исследование количественной экспрессии генов, ответственных за развитие и функционирование репродуктивной оси.

Как уже было упомянуто, несмотря на большое количество описанных в качестве этиологического фактора мутаций генов, до половины случаев идиопатического ЦГ остаются без выясненной генетической причины. В этой связи различными научными коллективами ведутся работы по поиску эпигенетических факторов, ответственных за развитие ЦГ. Группа ученых в Китае провела исследование роли таких регуляторных элементов, как микроРНК, в развитии мужского гипогонадизма с поздним началом (*late-onset hypogonadism in male, LON*). В 2016 году было опубликовано исследование с участием 36 мужчин с диагностированным LON и 36 здоровых мужчин, в результате чего выявлены различия экспрессии 239 микроРНК, 16 из которых являются потенциальными маркерами этого заболевания [28]. Однако, есть сомнения в том, что данные регуляторные микроРНК коррелируют именно с LON: в группе пациентов было достоверно больше мужчин, страдающих ожирением, и указанные маркеры могут быть характерны и для этого состояния [99]. В 2019г. было опубликовано финское исследование с участием 24 пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом, целью которого являлось установление роли описанных ранее в качестве ассоциированных с гипогонадизмом микроРНК

в этиологии этого состояния [59]. Выводы, которые ученые делают по результатам секвенирования микроРНК, говорят против ассоциации полиморфизмов этих регуляторных элементов с развитием гипогонадотропного гипогонадизма. Группой ученых из Японии [65] был проведен поиск полиморфизмов гена *SMCHD1*, кодирующего эпигенетический регулятор, который контролирует метилирование ДНК нескольких геномных локусов, у пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом без установленной причины (n=31) и у пациентов с гипопитуитаризмом (n=43); более ранние исследования показали, что *SMCHD1* участвует в регуляции нескольких моноаллельно экспрессируемых генов. Патогенные мутации этого гена приводят к развитию фенотипа синдрома Босма, одним из проявлений которого является гипогонадотропный гипогонадизм. В случае лишь одного из пациентов в ходе этого исследования был выявлен 1 редкий патогенный полиморфизм гена *SMCHD1*. У этого пациента был выявлен более низкий уровень метилирования областей – мишеней метилирования продуктов гена *SMCHD1*.

В ходе настоящей работы был проведен анализ экспрессии нейроэндокринных генов *GNRH1*, *GNRHR* и нейроразвивающих *DUSP6*, *WDR11*, *CHD7*, *PROK2* мРНК которых обнаруживается в лейкоцитах периферической крови. Экспрессионный анализ выполнялся только пациенткам группы ЦГ без органического поражения ХСО. Причиной этому было отсутствие необходимости поиска генетической предрасположенности к развитию ЦГ у женщин, имеющих установленную органическую причину этого состояния. В ходе работы было выявлено, что достоверные различия между пациентками и контролем имеются в экспрессии нейроразвивающих генов *WDR11*, *DUSP6* и *PROK2*. В то же время, чувствительность и специфичность полученных в ходе ROC-анализа уровней экспрессии невысоки, что позволяет использовать метод количественной экспрессии только как вспомогательный для подтверждения идиопатического ЦГ, в сочетании со стимуляционным тестом с аналогом ГнРГ. Резюмируя вышеизложенное, описанный метод анализа экспрессии является результатом поиска эпигенетических механизмов регуляции развития и работы гипоталамо-

гипофизарно-яичниковой оси и имеет потенциал использования в качестве диагностических тестов.

Таким образом, в ходе диссертационной работы получены новые данные, имеющие теоретическое и практическое значение; благодаря этим данным, стало возможно обосновать алгоритм диагностики ЦГ разного генеза у женщин. Одним из важных практических аспектов алгоритма является то, что он позволит избежать проведения МРТ при отсутствии подтверждения центрального генеза гипогонадизма путем проведения функциональных проб и генетического исследования. У пациенток, гормональный профиль которых характеризуется гипоэстрогенией на фоне нормальных уровней пролактина, ТТГ, общего тестостерона, ДГЭАС, при наличии сомнительных (низконормальных и нормальных) уровней ЛГ и ФСГ необходимо выполнить пробу с аналогом ГнРГ и исследование экспрессии генов: в случае если стимулированный уровень ЛГ составляет более 35,3 МЕ/л и нет отклонений экспрессии генов *PROK2*, *WDR11* и *DUSP6* – диагноз центрального гипогонадизма крайне маловероятен, поэтому не требуется такое дорогостоящее исследование как МРТ.

ВЫВОДЫ

1. У женщин с гипоэстрогенной аменореей (после исключения гиперпролактинемии, первичного гипогонадизма, гиперандрогенемии) диагностически значимыми для центрального гипогонадизма являются уровни лютеинизирующего гормона $<2,36$ МЕ/л (чувствительность 82,61%, специфичность 73,91%, $p<0,0001$) и фолликулостимулирующего гормона $<5,08$ МЕ/л (чувствительность 73,91%, специфичность 80,88%, $p<0,0001$). Уровни лютеинизирующего гормона $<1,95$ МЕ/л (чувствительность 96,77%, специфичность 97,06%, $p<0,0001$) и фолликулостимулирующего гормона $<4,22$ МЕ/л (чувствительность 96,77%, специфичность 89,71%, $p<0,0001$) указывают на наличие органической причины центрального гипогонадизма.
2. Дополнительными статистически значимыми гормональными маркерами центрального гипогонадизма на фоне органического поражения хиазмально-селлярной области являются уровни общего тестостерона $<0,69$ нмоль/л (чувствительность 80%, специфичность 85,19%, $p<0,0001$) и дегидроэпиандростерон-сульфата <3 мкмоль/л (чувствительность 88,89%, специфичность 90,48%, $p<0,0001$), при интактном состоянии хиазмально-селлярной области – уровень пролактина менее 204 мМЕ/л (чувствительность 69,77%, специфичность 76,09%, $p<0,0001$).
3. Стимулированный в ходе пробы с трипторелином уровень лютеинизирующего гормона $<35,3$ МЕ/л с чувствительностью 94,4% и специфичностью 75% ($p<0,0001$) говорит о наличии центрального гипогонадизма. Стимулированные уровни лютеинизирующего гормона $<20,9$ МЕ/л (чувствительность 90,91%, специфичность 100%, $p<0,0001$) и фолликулостимулирующего гормона <13 МЕ/л (чувствительность 100%, специфичность 100%, $p<0,0001$) указывают на наличие органической причины центрального гипогонадизма.
4. У пациенток с центральным гипогонадизмом по сравнению со здоровыми женщинами отмечается статистически значимое повышение

количественной экспрессии генов *PROK2* ($p=0,0474$), *WDR11* ($p=0,0328$) и *DUSP6* ($p=0,0360$).

5. Разработан алгоритм персонализированной диагностики женского центрального гипогонадизма, включающий оценку базальных уровней гонадотропинов и андрогенов у женщин на фоне гипоэстрогенной аменореи (при исключении гиперпролактинемии, гипергонадотропного гипогонадизма, первичного гипотиреоза и органических заболеваний репродуктивных органов), оценку результатов стимуляционной пробы с аналогом гонадолиберина и количественной экспрессии перечня генов при сомнительных результатах исследования базальных уровней гонадотропинов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для подтверждения диагноза центрального гипогонадизма у пациенток с гипоэстрогенной аменореей после исключения гиперпролактинемии и первичного гипотиреоза целесообразно использовать такой диагностический критерий, как снижение базальных уровней лютеинизирующего гормона $<2,36$ МЕ/л, фолликулостимулирующего гормона $< 5,08$ МЕ/л.
2. После установления диагноза центрального гипогонадизма при помощи вышеуказанного критерия рекомендуется проведение магнитно-резонансной томографии хиазмально-селлярной области: при наличии органического поражения подтверждается диагноз центрального гипогонадизма на фоне органического поражения гипоталамо-гипофизарной области и рекомендуется исключение недостаточности других тропных функций гипофиза.
3. При интактном состоянии гипоталамо-гипофизарной области рекомендуется подтверждение идиопатического центрального гипогонадизма при помощи стимуляционного теста с трипторелином и генетического исследования: при значении стимулированного уровня лютеинизирующего гормона менее $35,3$ МЕ/л в сочетании с уровнями экспрессии генов $PROK2 > 9,36 \cdot 10^{-3}$, $WDR11 > 2,22 \cdot 10^{-3}$ и $DUSP6 > 14,78 \cdot 10^{-3}$ в усл.ед. диагноз идиопатического центрального гипогонадизма может считаться подтвержденным.
4. При выявлении уровней ЛГ $<1,95$ МЕ/л, ФСГ $<4,22$ МЕ/л в сочетании с уровнем общего тестостерона менее $0,69$ нмоль/л и ДГЭАС менее 3 мкмоль/л показано исключение недостаточности других тропных функций гипофиза до или одновременно с проведением магнитно-резонансной томографии хиазмально-селлярной области.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДГ	– антидиуретический гормон
АКТГ	– адренкортикотропный гормон
АС-ПЦР	– аллель-специфичная полимеразная цепная реакция
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГГЯО	– гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось
ГнРГ	– гонадотропин-рилизинг гормон
ГСПГ	– глобулин связывающий половые гормоны
ДГЭАС	– дегидроэпиандростерон-сульфат
Е2	– эстрадиол
ИМТ	– индекс массы тела
КРГ	– кортикотропин-рилизинг гормон
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
МРТ	– магнитно-резонансная томография
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
миРНК	– малые интерферирующие РНК
нЦГ	– нормосмический центральный гипогонадизм
ПРЛ	– пролактин
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	– полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СК	– синдром Каллманна
СПКЯ	– синдром поликистозных яичников
Т	– тестостерон
ТТГ	– тиреотропный гормон
Т4своб	– свободный тироксин
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ФГА	– функциональная гипоталамическая аменорея
ФРФ	– фактор роста фибробластов

ФРФР1	– фактор роста фибробластов 1 типа
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ХСО	– хиазмально-селлярная область
ЧМТ	– черепно-мозговая травма
ЦГ	– центральный гипогонадизм
АСТВ	– Actin Beta
ANOS1	– Anosmin 1
AUC	– area under curve
CHARGE	– Coloboma, Heart Anomalies, choanal atresia, Retardation, Genital and Ear anomalies
CHD7	– Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7
DPBS	– фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко
DUSP6	– Dual Specificity Phosphatase 6
ECE	– European society of endocrinology
FGFR1	– Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FGF	– Fibroblast Growth Factor
FLRT3	– Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 3
FSHB	– Follicle Stimulating Hormone Subunit Beta
GLCE	– Glucuronic Acid Epimerase
GnRH	– Gonadotropin-releasing hormone
GNRH1	– Gonadotropin Releasing Hormone 1
GNRHR	– Gonadotropin Releasing Hormone Receptor
GPR54	– KISS1 Receptor
HH	– hypogonadotropic hypogonadism
IGD	– isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency
IL17RD	– Interleukin 17 Receptor D

KAL1	– Anosmin 1
KISS1	– KiSS-1 Metastasis Suppressor
KISS1R	– KISS1 Receptor
KNDy	– Kisspeptin, neurokinin B and dynorphin
LEP	– Leptin
LEPR	– Leptin Receptor
LHB	– Luteinizing Hormone Subunit Beta
LOH	– late-onset hypogonadism
NPY	– нейропептид Y
POMK	– проопиомеланокортин
PROK2	– Prokineticin 2
PROKR2	– Prokineticin Receptor 2
ROC	– receiver operating characteristic, рабочая характеристика приёмника
RPLP0	– Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
SMCHD1	– Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1
SPRY4	– Sprouty RTK Signaling Antagonist 4
SSCP	– Single Strand Conformation Polymorphism
TAC3	– Tachykinin Precursor
TACR3	– Tachykinin Receptor 3
UBC	– Ubiquitin C
WDR11	– WD Repeat Domain 11

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Енева Н. Г. Проблема женского бесплодия: поиск генетических маркеров / Н.Г. Енева, Л.Н. Нефедова, А.С. Локтионова и др. // Журнал общей биологии. – 2017. – Т.78, № 2. – С. 3-13.
2. «Женское бесплодие (современные подходы к диагностике и лечению)» Клинические рекомендации (протокол лечения) / Москва, 2019.
3. Иловайская И. А. Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы при центральном гипогонадизме у женщин / И.А. Иловайская, В.Ю. Зекцер, Д.С. Михайлова и др. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2008. – Т. 7, №. 5. – С. 22-28.
4. Иловайская И. А. Этиология приобретенного гипопитуитаризма у взрослых // Доктор. Ру. – 2010. – № 7(58). – С. 15–21.
5. Иловайская И. А. Факторы усугубления признаков преждевременного старения у женщин с центральным гипогонадизмом // Клиническая геронтология. – 2019. – №25 (5-6). – С. 37-41.
6. Ильина Е. Ю. Краниофарингиомы у детей и подростков: диагностика и лечение / Е. Ю. Ильина, Н. А. Стребкова, Э. С. Кузнецова, В. А. Петеркова // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – № 6(10). – С. 67-70.
7. Кулаков В. И. Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология / под ред. В. И. Кулакова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. С. 444.
8. Локтионова А. С. Этиопатогенетические аспекты центрального (гипогонадотропного) женского гипогонадизма / А. С. Локтионова, И. А. Иловайская // Медицинский вестник Юга России. – 2019. – № 4. – С. 15-27.
9. Мельниченко Г. А. Йододефицитные заболевания щитовидной железы в Российской Федерации: современное состояние проблемы. Аналитический обзор публикаций и данных официальной государственной статистики (Росстат) / Г. А. Мельниченко, Е. А. Трошина, Н. М. Платонова и др. // Consilium medicum. – 2019. – № 4(21). – С. 14-20.

10. Министерство Здравоохранения Российской Федерации. Перечень редких (орфанных) заболеваний: [Сайт]. URL: <https://minzdrav.gov.ru/documents/9641-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>.
11. Назаренко Т. А. Стимуляция функции яичников / Т. А. Назаренко. М.: МЕДпресс-информ, 2008.
12. Романцова Т. И. Репродукция и энергетический баланс: интегративная роль пролактина // Ожирение и метаболизм. – 2014. – № 1. – С. 5-17.
13. Чернуха Г. Е. Патологические особенности развития функциональной гипоталамической аменореи у пациенток с нервной анорексией/ Г. Е. Чернуха, Д. В. Гусев, Г. И. Табеева, В. Ю. Прилуцкая // Гинекология. – 2018. – Т. 20, №1. – С. 16-22.
14. Alexandraki K. I. Management of hypopituitarism / K. I. Alexandraki, A. B. Grossman // Journal of clinical medicine. – 2019. – № 12(8). – P. 2153.
15. Andreeva E. Triptorelin for the treatment of adenomyosis: A multicenter observational study of 465 women in Russia. / E. A. Andreeva, Y. S. Absatarova // International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. – 2020. – V. 151, № 3. – P. 347–354.
16. Azziz R. Polycystic ovary syndrome. / R. Azziz, E. Carmina, Z. Chen et al. // Nature reviews. Disease primers. – 2016. – V.2, №1 – С. 1-18.
17. Balasubramanian R. Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency / R. Balasubramanian, J.H. Choi, L. Francescatto et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – V 111, №50. – P. 17953–17958.
18. Beckman ACCESS Immunoassay Systems Access: [Сайт]. URL: https://www.beckmancoulter.com/download/phxA83734N-RU_RU.
19. Boehm U. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism-pathogenesis, diagnosis and treatment / U. Boehm, P. M. Bouloux, M. T. Dattani et al. // Nature Reviews Endocrinology. – 2015. – V.11, № 9. – P. 547–564.

20. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. // *Tissue antigens*. – 1974. – V. 4, № 4. – P. 269–274.
21. Cangiano B. Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism: peculiarities and phenotype of an oligogenic disease / B. Cangiano, D. S. Swee, R. Quinton et al. // *Human genetics*. – 2021. – № 140. – P. 77-111
22. Caprio M. Leptin in reproduction / M. Caprio, E. Fabbrini, A. M. Isidori et al. // *Trends in endocrinology and metabolism*. – 2001. – V. 12, № 2. – P. 65–72.
23. Caronia L. M. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea / L. M. Caronia, C. Martin, C. K. Welt et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – V. 364, № 3. – C. 215–225.
24. Cassatella D. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures / D. Cassatella, S. R. Howard, J. S. Acierno et al. // *European journal of endocrinology*. – 2018. – V. 178, № 4. – P. 377–388.
25. Cerrato F. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism / F. Cerrato, J. Shagoury, M. Kralickova et al. // *European Journal of Endocrinology*. – 2006. – V. 155, № 1. – P. S3.
26. Chan Y.-M. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism / Y. M. Chan, A. de Guillebon, M. Lang-Muritano et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106, № 28. – P. 11703–11708.
27. Chehab F. F. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin / F. F. Chehab, M. E. Lim, R. Lu // *Nature genetics*. – 1996. – V. 12, № 3. – P. 318–320.
28. Chen Y. The plasma miR-125a, miR-361 and miR-133a are promising novel biomarkers for Late-Onset Hypogonadism / Y. P. Chen, J. Wang, K. Zhao et al. // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6, № 1. – C. 1–10.

29. Chou S. H. Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea / S. H. Chou, J. P. Chamberland, X. Liu et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108, № 16. – C. 6585–6590.
30. Christin-Maitre S. Diagnosis and treatment options for hypogonadotropic hypogonadism in adolescents, men and women—Review of an expert meeting / S. Christin-Maitre, M. Zitzmann, C. Lambalk et al. // *European Gynecology and Obstetrics*. – 2020. – V. 2, № 2. – P. 82-89
31. Coleman D. L. A historical perspective on leptin // *Nature medicine*. – 2010. – V. 16, № 10. – P. 1097–1099.
32. Cortés M. E. The Role of Kisspeptin in the Onset of Puberty and in the Ovulatory Mechanism: A Mini-review. / M. E. Cortés, B. Carrera, H. Rioseco et al. // *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. – 2015. – V. 28, № 5. – C. 286–291.
33. Cravo R. M. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models / R. M. Cravo, L. O. Margatho, S. Osborne-Lawrence et al. // *Neuroscience*. – 2011. – V. 173. – P. 37–56.
34. Dedov I. I. Diabetes mellitus in Russian Federation: Prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the federal diabetes register, status 2017 / I. I. Dedov, M. V. Shestakova, O. K. Vikulova et al. // *Diabetes Mellitus*. – 2018. – V. 21, № 3. – P. 144–159.
35. Donato J. J. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction / Jr. J. Donato, R. M. Cravo, R. Frazão et al. // *Neuroendocrinology*. – 2011. – V. 93, № 1. – P. 9–18.
36. Dwyer A. A. Management of Endocrine Disease: Reversible hypogonadotropic hypogonadism / A. A. Dwyer, T. Raivio, N. Pitteloud // *European journal of endocrinology*. – 2016. – V. 174, № 6. – P. R267-74.
37. Ehrnborg C. Cost of illness in adult patients with hypopituitarism / C. Ehrnborg, L. Hakkaart-Van Roijen, B. Jonsson et al. // *Pharmacoeconomics*. – 2000. – V. 17, № 6. – P. 621–628.

38. Fadalti M. Changes of serum allopregnanolone levels in the first 2 years of life and during pubertal development / M. Fadalti, F. Petraglia, S. Luisi et al. // *Pediatric research*. – 1999. – V. 46, № 3. – P. 323–327.
39. Falardeau J. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice / J. Falardeau, W. C. Chung, A. Beenken et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2008. – V. 118, № 8. – P. 2822–2831.
40. Farooqi I. S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor / I. S. Farooqi, T. Wangensteen, S. Collins et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – V. 356, № 3. – P. 237–247.
41. Ferreira L. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism / L. Ferreira, G. Silveira, A. C. Latronico // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2013. – V. 98, № 5. – P. 1781–1788.
42. Fleseriu M. Hormonal replacement in hypopituitarism in adults: An endocrine society clinical practice guideline / M. Fleseriu, I. A. Hashim, N. Karavitaki et al. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2016. – V. 101, № 11. – P. 3888–3921.
43. Franco B. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules / B. Franco, S. Guioli, A. Pragliola et al. // *Nature*. – 1991. – V. 353, № 6344. – P. 529–536.
44. Freire A. V. High diagnostic accuracy of subcutaneous Triptorelin test compared with GnRH test for diagnosing central precocious puberty in girls / A. V. Freire, M. E. Escobar, M. G. Gryngarten et al. // *Clinical endocrinology*. – 2013. – V. 78, № 3. – P. 398–404.
45. Genazzani A. D. Pulsatile secretory characteristics of allopregnanolone, a neuroactive steroid, during the menstrual cycle and in amenorrheic subjects / A. D. Genazzani, M. Luisi, B. Malavasi // *European journal of endocrinology*. – 2002. – V. 146, № 3. – P. 347–356.
46. George J. T. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism / J. T. George, J. D.

- Veldhuis, M. Tena-Sempere et al. // *Clinical endocrinology*. – 2013. – V. 79, № 1. – P. 100–104.
47. Gianetti E. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood / E. Gianetti, C. Tusset, S. D. Noel et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2010. – V. 95, № 6. – P. 2857–2867.
48. Good D. J. New gene targets in the study of hypogonadotropic hypogonadism // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2021. – V. 520.
49. Goodman R. L. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B / R. L. Goodman, M. N. Lehman, J. T. Smith et al. // *Endocrinology*. – 2007. – V. 148, № 12. – P. 5752–5760.
50. Gordon C. M. Functional hypothalamic amenorrhea: An endocrine society clinical practice guideline / C. M. Gordon, K. E. Ackerman, S. L. Berga et al. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2017. – V. 102, № 5. – P. 1413–1439.
51. Haisenleder D. J. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo / D. J. Haisenleder, A.C. Dalkin, G. A. Ortolano et al. // *Endocrinology*. – 1991. – V. 128, № 1. – P. 509–517.
52. Haisenleder D. J. Gonadotropin-releasing hormone pulses are required to maintain activation of mitogen-activated protein kinase: role in stimulation of gonadotrope gene expression / D. J. Haisenleder, M. E. Cox, S. J. Parsons et al. // *Endocrinology*. – 1998. – V. 139, № 7. – P. 3104–3111.
53. Hardelin J. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome / J. P. Hardelin, A. K. Julliard, B. Moniot et al. // *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. – 1999. – V. 215, № 1. – P. 26–44.

54. Harrington B. C. Initial evaluation, diagnosis, and treatment of anorexia nervosa and bulimia nervosa / B. C. Harrington, M. Jimerson, C. Haxton, D. C. Jimerson // *American family physician*. – 2015. – V. 91, № 1. – P. 46–52.
55. Harris G. W. Neural control of the pituitary gland // *Physiological reviews*. – 1948. – V. 28, № 2. – P. 139–179.
56. Hayashi K. How sensitive is PCR-SSCP? / K. Hayashi, D. W. Yandell // *Human mutation*. – 1993. – V. 2, № 5. – P. 338–346.
57. Herbison A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2016. – V. 12, № 8. – P. 452–466.
58. Holloway D. *Nursing Management of Women's Health* / ed. D. Holloway, Springer, 2019. P. 30.
59. Iivonen A.-P. Screening for mutations in selected miRNA genes in hypogonadotropic hypogonadism patients / A.-P. Iivonen, J. Käsäkoski, K. Vaaralahti, T. Raivio // *Endocrine connections*. – 2019. – V. 8, № 5. – P. 506–509.
60. Jayasena C. N. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans / C. N. Jayasena, G. M. Nijher, A. N. Comminos et al. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2011. – V. 96, № 12. – P. E1963-72.
61. Jongmans M. C. J. CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene / M. C. J. Jongmans, R. J. Admiraal, K. P. Van Der Donk et al. // *Journal of medical genetics*. – 2006. – V. 43, № 4. – P. 306–314.
62. Kaltsas G. A. Menstrual irregularity in women with acromegaly / G. A. Kaltsas, J. J. Mukherjee, P. J. Jenkins et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1999. – V. 84, № 8. – P. 2731–2735.
63. Kim H.-G. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome / H. G. Kim, I. Kurth, F. Lan et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2008. – V. 83, № 4. – P. 511–519.

64. Kim H.-G. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome / H.-G. Kim, J. W. Ahn, I. Kurth et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2010. – V. 87, № 4. – P. 465–479.
65. Kinjo K. Rare variant of the epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency / K. Kinjo, K. Nagasaki, K. Muroya et al. // *Scientific reports*. – 2020. – V. 10, № 1. – P. 1–8.
66. Kottler M. L. FSHbeta gene mutation in a female with delayed puberty and hypogonadism: response to recombinant human FSH / M. L. Kottler, N. Richard, O. Chabre et al. // *Folia histochemica et cytobiologica*. – 2009. – V. 47, № 5. – P. 55–58.
67. Krsmanovic L. Z. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms / L. Z. Krsmanovic, L. Hu, P. K. Leung et al. // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. – 2009. – V. 20, № 8. – P. 402–408.
68. Lasorella S. Comparison of triptorelin acetate vs triptorelin pamoate in the treatment of Central precocious puberty (CPP): a retrospective study / S. Lasorella, R. Porto, M. L. Iezzi et al. // *Gynecological Endocrinology*. – 2020. – V. 36, № 4. – P. 338–340.
69. Layman L. C. Gonadotropin-releasing hormone, follicle-stimulating hormone beta, luteinizing hormone beta gene structure in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism / L. C. Layman, J. T. Wilson, L. Huey et al. // *Fertility and sterility*. – 1992. – V. 57, № 1. – P. 42–49.
70. Layman L. C. FSH β gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia / L. C. Layman, A/ L/ Porto, J. Xie et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2002. – V. 87, № 8. – P. 3702–3707.
71. Lehman M. N. Does the kndy model for the control of gonadotropin-releasing hormone pulses apply to monkeys and humans? / M. N. Lehman, W. He, L. M. Coolen et al. // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2019. – V. 37, № 2. – P. 71–83.

72. Lehman M. N. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion / M. N. Lehman, L. M. Coolen, R. L. Goodman // *Endocrinology*. – 2010. – V. 151, № 8. – P. 3479–3489.
73. Lofrano-Porto A. Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women / A. Lofrano-Porto, G. B. Barra, L. A. Giacomini et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – V. 357, № 9. – P. 897–904.
74. Lunenfeld B. Classification of amenorrhoeic states and their treatment by ovulation induction / B. Lunenfeld, V. Insler // *Clinical Endocrinology*. – 1974. – V. 3, № 2. – P. 223–237.
75. Maione L. Similarities and differences in the reproductive phenotypes of women with congenital hypogonadotropic hypogonadism caused by GNRHR mutations and women with polycystic ovary syndrome / L. Maione, A. Fèvre, I. C. Nettore et al. // *Human reproduction (Oxford, England)*. – 2019. – V. 34, № 1. – P. 137–147.
76. Mao J.-F. Predictive factors for pituitary response to pulsatile GnRH therapy in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism / J. F. Mao, X. Wang, J. J. Zheng et al. // *Asian journal of andrology*. – 2018. – V. 20, № 4. – P. 319–323.
77. Meczekalski B. Hypothalamic amenorrhea with normal body weight: ACTH, allopregnanolone and cortisol responses to corticotropin-releasing hormone test / B. Meczekalski, A. Tonetti, P. Monteleone et al. // *European journal of endocrinology*. – 2000. – V. 142, № 3. – P. 280–285.
78. Meczekalski B. Functional hypothalamic amenorrhea and its influence on women's health / B. Meczekalski, K. Katulski, A. Czyzyk et al. // *Academic Psychiatry*. – 2014. – V. 37, № 11. – P. 1049–1056.
79. Miraoui H. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism / H. Miraoui, A. A. Dwyer, G. P. Sykiotis et al. // *The American Journal of Human Genetics*. – 2013. – V. 92, № 5. – P. 725–743.

80. Moya-Plana A. PROKR2 and PROK2 mutations cause isolated congenital anosmia without gonadotropic deficiency / A. Moya-Plana, C. Villanueva, O. Laccourreye et al. // *European journal of endocrinology*. – 2013. – V. 168, № 1. – P. 31–37.
81. Munro M. G. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions / M. G. Munro, H. O. Critchley, I. S. Fraser et al. // *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. – 2018. – V. 143, № 3. – P. 393–408.
82. Murphy K. G. Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. // *Journal of neuroendocrinology*. – 2005. – V. 17, № 8. – P. 519–525.
83. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Guideline 2017. Fertility problems: assessment and treatment. [Электронный ресурс]: [сайт]: URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156>
84. Navarro V. M. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse / V. M. Navarro, M. L. Gottsch, C. Chavkin et al. // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2009. – V. 29, № 38. – P. 11859–11866.
85. Novaira H. J. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines / H. J. Novaira, Y. Ng, A. Wolfe, S. Radovick // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2009. – V. 311, № 1-2. – P. 126–134.
86. Olivius C. Prevalence and treatment of central hypogonadism and hypoandrogenism in women with hypopituitarism / C. Olivius, K. Landin-Wilhelmsen, D. S. Olsson et al. // *Pituitary*. – 2018. – V. 21, № 5. – P. 445–453.
87. Pettersson F. Epidemiology of secondary amenorrhea. I. Incidence and prevalence rates / F. Pettersson, H. Fries, S. J. Nillius // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1973. – V. 117, № 1. – P. 80–86.
88. Pierzchlewska M. M. Induction of puberty with human chorionic gonadotropin (hCG) followed by reversal of hypogonadotropic hypogonadism in Kallmann

- syndrome / M. M. Pierzchlewska, M. G. Robaczyk, I. Vogel // *Endokrynologia Polska*. – 2017. – V. 68, № 6. – P. 692–696.
89. Pinilla L. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms / L. Pinilla, E. Aguilar, C. Dieguez et al. // *Physiological reviews*. – 2012. – V. 92, № 3. – P. 1235–1316.
90. Pitteloud N. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes / N. Pitteloud, A. Meysing, R. Quinton et al. // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2006. – V. 254. – C. 60–69.
91. Plant T. M. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis // *Journal of Endocrinology*. – 2015. – V. 226, № 2. – P. T41–T54.
92. POI Eshre Guideline Group. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency / L. Webber, M. Davies, R. Anderson et al. // *Human Reproduction*. – 2016. – V. 31, № 5. – P. 926–937.
93. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Current evaluation of amenorrhea // *Fertility and Sterility*. – 2008. – V. 90, № 5 SUPPL. – P. 219–225.
94. Prosser H. M. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation / H. M. Prosser, A. Bradley, M. A. Caldwell // *European Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 26, № 12. – P. 3339–3344.
95. Quigley M. E. Evidence for increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea / M.E. Quigley, K. L. Sheehan, R. F. Casper, S. S. C. Yen // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1980. – V. 50, № 5. – P. 949–954.
96. Reame N. E. Pulsatile gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea: evidence that reduced frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion is the mechanism of persistent anovulation / N. E. Reame, S. E. Sauder, G. D. Case et al. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 1985. – V. 61, № 5. – P. 851–858.

- 97.Regal M. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult Caucasian population in northwestern Spain / M. Regal, C. Páramo, J. M. Sierra, R. V. García-Mayor // *Clinical endocrinology*. – 2001. – V. 55, № 6. – P. 735–740.
- 98.Richard-Eaglin A. Male and female hypogonadism // *Nurs Clin North Am*. – 2018. – V. 53, № 3. – P. 395–405.
- 99.Russell N. Plasma miRNA expression profile in the diagnosis of late-onset hypogonadism / N. Russell, M. Grossmann // *Asian journal of andrology*. – 2016. – V. 18, № 5. – P. 713.
- 100.Sanders K. M. Heightened cortisol response to exercise challenge in women with functional hypothalamic amenorrhea / K. M. Sanders, J. F. Kawwass, T. Loucks, S. L. Berga // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2018. – V. 218, № 2. – P. 230-e1.
- 101.Schally A. V. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone / A. V. Schally, A. Arimura, Y. Baba // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1971. – V. 43, № 2. – P. 393–399.
- 102.Schneider H. J. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review / H. J. Schneider, I. Kreitschmann-Andermahr, E. Ghigo et al. // *Jama*. – 2007. – V. 298, № 12. – P. 1429–1438.
- 103.Seminara S. B. The GPR54 gene as a regulator of puberty / S. B. Seminara, S. Messager, E. E. Chatzidaki et al. // *The New England journal of medicine*. – 2003. – V. 349, № 17. – P. 1614–1627.
- 104.Sherlock M. ACTH deficiency, higher doses of hydrocortisone replacement, and radiotherapy are independent predictors of mortality in patients with acromegaly / M. Sherlock, R. C. Reulen, A. A. Alonso et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2009. – V. 94, № 11. – P. 4216–4223.
- 105.Sherlock M. Mortality in patients with pituitary disease / M. Sherlock, J. Ayuk, J. W. Tomlinson et al. // *Endocrine reviews*. – 2010. – V. 31, № 3. – P. 301–342.
- 106.Shoham Z. Polycystic ovaries in patients with hypogonadotropic hypogonadism: similarity of ovarian response to gonadotropin stimulation in patients with

- polycystic ovarian syndrome / Z. Shoham, G. S. Conway, A. Patel, H. S. Jacobs // *Fertility and sterility*. – 1992. – V. 58, № 1. – P. 37–45.
107. Sidhoum V. F. Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: Resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system / V. F. Sidhoum, Y. M. Chan, M. F. Lippincott et al. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2014. – V. 99, № 3. – P. 861–870.
108. Stamatiades G. A. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression / G. A. Stamatiades, U. B. Kaiser // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2018. – V. 463. – P. 131–141.
109. Stamou M. I. Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism / M. I. Stamou, N. A. Georgopoulos // *Metabolism: Clinical and Experimental*. – 2018. – V. 86. – P. 124–134.
110. Suh B. Y. Hypercortisolism in patients with functional hypothalamic-amenorrhea / B. Y. Suh, J. H. Liu, S. L. Berga et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1988. – V. 66, № 4. – P. 733–739.
111. Sykiotis G. P. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency / G. P. Sykiotis, L. Plummer, V. A. Hughes et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – V. 107, № 34. – P. 15140–15144.
112. Teede H. J. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome / H. J. Teede, M. L. Misso, M. F. Costello et al. // *Human reproduction*. – 2018. – V. 33, № 9. – P. 1602–1618.
113. Thurston L. Investigation and management of subfertility / L. Thurston, A. Abbara, W. S. Dhillon // *Journal of clinical pathology*. – 2019. – V. 72, № 9. – P. 579–587.
114. Toledano Y. Acquired prolactin deficiency in patients with disorders of the hypothalamic-pituitary axis / Y. Toledano, A. Lubetsky, I. Shimon // *Journal of endocrinological investigation*. – 2007. – V. 30, № 4. – P. 268–273.

115. Tolle V. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women / V. Tolle, M. Kadem, M. T. Bluet-Pajot et al. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2003. – V. 88, № 1. – P. 109–116.
116. Tomlinson J. W. Association between premature mortality and hypopituitarism / J. W. Tomlinson, N. Holden, R. K. Hills et al. // *The Lancet*. – 2001. – V. 357, № 9254. – P. 425–431.
117. Topaloğlu A. K. Update on the Genetics of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism // *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. – 2017. – V. 9, № Suppl 2. – P. 113–122.
118. Trevisan C. M. Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction? / C. M. Trevisan, E. Montagna, R. de Oliveira et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – V. 49, № 4. – P. 1259–1276.
119. Unuane D. Endocrine disorders & female infertility / D. Unuane, H. Tournaye, B. Velkeniers, K. Poppe // *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2011. – V. 25, № 6. – P. 861–873.
120. Warren M. P. Central causes of hypogonadism-functional and organic / M. P. Warren, C. Vu // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. – 2003. – V. 32, № 3. – P. 593–612.
121. Wray S. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode / S. Wray, P. Grant, H. Gainer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – V. 86, № 20. – P. 8132–8136.
122. Young J. Clinical Management of Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism / J. Young, C. Xu, G. E. Papadakis et al. // *Endocrine Reviews*. – 2019. – V. 40, № 2. – P. 669–710.
123. Zhang Y. Leptin function and regulation / Y. Zhang, S. Chua // *Comprehensive Physiology*. – 2018. – V. 8, № 1. – P. 351–369.