

ЮХЛИНА

Юлия Николаевна

РОЛЬ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS1/KISS1R В ГЕНЕЗЕ ЗАДЕРЖКИ СТАРТА ПУБЕРТАТА
И МУЖСКОГО ГИПОГОНАДОТРОПНОГО ГИПОГОНАДИЗМА (КЛИНИКО-
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

14.01.02 – эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Никитина Ирина Леоровна

доктор медицинских наук, доцент

Научный консультант:

Байрамов Алекбер Азизович

доктор медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент **Никитина Ирина Леоровна**

Научный консультант: доктор медицинских наук **Байрамов Алекбер Азизович**

Официальные оппоненты:

Калинченко Наталья Юрьевна, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, детское отделение тиреоидологии, репродуктивного и соматического здоровья научно-исследовательского института Детской Эндокринологии, ведущий научный сотрудник

Цикунов Сергей Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», лаборатория психофизиологии эмоций физиологического отдела имени И.П. Павлова, заведующий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.054.03 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, www.almazovcentre.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, www.almazovcentre.ru).

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.054.03

кандидат медицинских наук

Леонова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Репродуктивная система человека играет ключевую роль в обеспечении фертильности и воспроизводства. Процессы анатомической и функциональной дифференцировки и созревания репродуктивной системы многоэтапны и обеспечиваются молекулярно-генетическими, нейроэндокринными, эпигенетическими и другими регуляторными механизмами (Uenoyama Y. et al., 2019; Navarro V.M. et al., 2009; Ojeda S.R. et al., 2010; Калинин Н.Ю. и др., 2016; Болотова Н.В. и др., 2009). Нарушения на любом регуляторном уровне ведут к функциональной либо органической патологии полового развития, исходом которой может стать гипогонадизм и бесплодие (Ojeda S.R. et al., 2010; Болотова Н.В. и др., 2015; Загарских Е.Ю. и др., 2013). Старт пубертата и последующее созревание репродуктивной системы до достижения половой зрелости являются важным периодом детского и подросткового возраста, определяющим впоследствии потенциал фертильности индивидуума. Задержка старта пубертата, нарушение его прогрессии и гипогонадизм являются достаточно распространенной и весьма значимой проблемой с точки зрения дифференциальной диагностики, выбора терапии и определения прогноза репродукции (Ojeda S.R. et al., 2010; Самсонова Л.Н. и др., 2017). Существующие методы диагностики и лечения не всегда эффективны, что определяет актуальность исследований, направленных на изучение новых механизмов регуляции полового развития (Uenoyama Y. et al., 2019; Yang L. et al., 2016).

Степень разработанности темы исследования

Значимым открытием второго тысячелетия явилась идентификация роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS1/KISS1R, как ключевого регулятора активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (Uenoyama Y. et al., 2019; Velasco I. et al., 2019; de Roux N. et al., 2003, Topaloglu A.K. et al., 2009; Сапронов Н.С. и др., 2012). Проводимые в последние годы в мире исследования показали важность кисспептиновой регуляции пульсаторной секреции гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), запускающей и поддерживающей функциональную активность гонадной оси. Предметом активного исследовательского интереса остается оценка влияния этих пептидов на половые железы в отношении индукции стероидогенеза и потенциала фертильности. Полученные данные позволили рассматривать кисспептины в качестве потенциально эффективного нового метода терапии болезней, связанных с нарушениями репродуктивной функции (Yang L. et al., 2016).

Вопросы, связанные с характером и механизмами влияния лиганд-рецепторной системы кисспептина на запуск и поддержание половой функции, имеют научный интерес и актуальность. С одной стороны, проблема нарушений репродуктивной системы достаточно распространена и требует поиска и обоснования новых терапевтических возможностей для коррекции. С другой стороны, большое количество современных исследований посвящено изучению процессов и механизмов становления половой функции, при этом многими авторами значимая роль в синхронизации деятельности всех уровней гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси отводится лиганд-рецепторной системе кисспептина (Uenoyama Y. et al. 2019; Topaloglu A.K. et al., 2009). Однако в настоящее время данный вопрос изучен не в полной мере и представляет исследовательский интерес.

Изучение механизмов регуляции полового созревания, проведение фундаментальных исследований в эксперименте для транслирования в клиническую практику помогут расширить понимание механизмов, лежащих в основе нарушений сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме и синдроме позднего пубертата, и помогут оптимизировать современные диагностические и терапевтические подходы.

Цель исследования

Оценить функциональную активность лиганд-рецепторной системы кисспептина и ее роль в генезе задержки старта пубертата у мальчиков, включая развитие мужского гипогонадотропного гипогонадизма, для теоретического обоснования новых диагностических и терапевтических подходов к коррекции данной патологии.

Задачи исследования

1. Оценить периферический сигналинг лиганд-рецепторной системы кисспептина в андрогензависимых тканях при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме у самцов крыс.
2. Охарактеризовать гистоморфологические изменения нейросекреторных кисспептиновых нейронов аркуатного ядра гипоталамуса при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме у самцов крыс.
3. Оценить эффективность заместительной гормональной терапии андрогенами в отношении нарушений кисспептиновой регуляции полового развития на модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма у самцов крыс.
4. Дать клиническую характеристику мальчиков-подростков с функциональной задержкой старта пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом и сопоставить степень функциональной активности лиганд-рецепторной системы кисспептина с центральными и периферическими гормонами гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси.
5. Охарактеризовать потенциальные диагностические возможности оценки кисспептина крови при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме.

Научная новизна

В результате клинико-экспериментального исследования, направленного на изучение механизмов кисспептиновой регуляции мужского полового развития, дана характеристика изменений лиганд-рецепторной системы KISS1/KISS1R в периферических и центральных андрогензависимых тканях. Получены новые данные о том, что при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме у самцов крыс плотность андрогеновых рецепторов в гонадах и мышцах половозрелых особей снижается до допубертатного уровня. Впервые установлены разнонаправленные корреляции тестостерона и кисспептина на уровне различных тканей: в крови имеет место сильная обратная корреляция, свидетельствующая о регуляторных взаимоотношениях по типу «обратной связи», а в гонадах здоровых крыс, напротив, возрастание тестостерона ассоциировано напрямую с увеличением плотности кисспептиновых рецепторов. В центральных андрогензависимых тканях (область медиального аркуатного ядра) при индуцировании гипогонадотропного гипогонадизма у крыс мужского пола развиваются как дегенеративные, так и компенсаторные процессы, выражающиеся в уменьшении числа неизмененных и малоизмененных нейронов, нарастании измененных вследствие дистрофических процессов (сморщенных и тeneвидных) клеток, а также нарастании глиоцито-нейронального индекса. Степень выраженности экспрессии рецепторов тестостерона и кисспептина при этом заметно снижается. Впервые установлено, что введение тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме, полностью восстанавливая его уровень в крови, не приводит к восстановлению плотности кисспептиновых рецепторов в тестикулах, а на уровне ЦНС, увеличивая количество малоизмененных нейронов и их способность экспрессировать андрогеновые рецепторы, не изменяет количества гибнущих и погибших клеток.

Впервые на клиническом материале (группы мальчиков с физиологическим течением пубертата и задержкой полового развития вследствие синдрома позднего пубертата и

гипогонадотропного гипогонадизма) установлено, что уровень кисспептина крови является низким при физиологическом сценарии полового развития, независимо от возраста, и значимо возрастает при патологической его задержке. В связи с выше изложенным, предложено использовать уровень кисспептина сыворотки крови как маркер задержки полового развития.

Теоретическая и практическая значимость работы

На экспериментальном материале модели гипогонадотропного гипогонадизма самцов крыс уточнены механизмы кисспептиновой регуляции физиологического и патологического вариантов активации/реактивации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Установлена роль кисспептина, как центрального регулятора старта пубертата, по типу «обратной связи», стимулирующего активность периферических стероидпродуцирующих тканей и выработку тестостерона. Показано, что традиционно применяемая в клинической практике при гипогонадизме заместительная терапия тестостероном недостаточно эффективна для полноценной активации гонадной оси, несмотря на восстановление уровня тестостерона в крови, что обуславливает значимость поиска новых терапевтических технологий, к числу которых может быть отнесено применение кисспептина.

В клинической части исследования доказано, что уровень кисспептина крови не имеет значимых различий в зависимости от стадии пубертата и даже в его отсутствие в соответствующем (допубертатном) возрасте. Напротив, при задержке старта пубертата у мальчиков в возрасте старше 14 лет уровень кисспептина крови значимо возрастает. Показатель концентрации кисспептина выше 16,9 пг/мл может быть использован как диагностический маркер патологии (чувствительность 73%, специфичность 92%).

Материалы диссертации могут быть использованы в программах додипломного и последипломного образования по специальностям нормальная и патологическая физиология, эндокринология, андрология.

Методология и методы исследования

Работа проведена в дизайне ретроспективного и проспективного клинико-экспериментального исследования.

Работа состоит из клинического и экспериментального разделов. В целях получения требуемой научной информации использовались клинические, лабораторные, иммуногистохимические методы, а также статистическая обработка полученных данных.

Исследование выполнено на клинических базах и на базе института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ (генеральный директор академик Е.В. Шляхто) в период 2014-2018 г. Клинический раздел основан на анализе результатов обследования 75 мальчиков с физиологическим половым развитием и его задержкой (синдром позднего пубертата и гипогонадотропный гипогонадизм). Экспериментальный раздел включил изучение результатов обследования 53 особей самцов крыс линии Wistar с экспериментально индуцированным гипогонадотропным гипогонадизмом.

Проверка гипотез осуществлялась с использованием общепринятых методов статистического анализа. Выводы по результатам работы были сделаны на основании наличия или отсутствия достоверных различий и корреляций.

Положения, выносимые на защиту

1. Изменения в центральных и периферических андрогензависимых тканях при гипогонадотропном гипогонадизме самцов крыс характеризуются дегенеративно-дистрофическими и компенсаторно-приспособительными изменениями в нейронах медиального

аркуатного комплекса, сопровождающимися значительным снижением экспрессии рецепторов тестостерона и киспептина, а также редукцией киспептиновых рецепторов в тестикулах и скелетных мышцах. Изменения уровней тестостерона и киспептина в крови носят разнонаправленный характер, свидетельствуя о регуляторных механизмах гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы по типу «обратной связи».

2. Введение тестостерона самцам крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом, несмотря на достижение его пубертатного уровня в крови, не приводит к восстановлению количества киспептиновых рецепторов в периферических андрогензависимых тканях, обеспечивает умеренное обратное развитие дегенеративных процессов в нейронах медиального аркуатного комплекса при сохранении высокого числа гибнущих клеток.

3. Уровень киспептина крови, низкий при физиологическом, независимо от возраста, сценарии полового развития у мальчиков, значительно возрастает при задержке старта пубертата в возрасте старше 14 лет, что позволяет рассматривать его в качестве диагностического маркера патологии полового развития.

Личный вклад автора

Участие автора в диссертационном исследовании выразилось в планировании дизайна исследования, разработке компьютерной базы данных, проведении обзора литературы по теме исследования, наборе участников. Автор принимал личное участие во всех этапах работы с пациентами (включение больных в исследование, анализ медицинской документации, сбор анамнеза, оценка физического и полового развития), участвовал во всех этапах экспериментального исследования (уход за животными, моделирование гипогонадотропного гипогонадизма, введение препаратов, забор биологических материалов, изготовление супернатанта, методы иммуноферментного анализа (ИФА)). После окончания исследования автор участвовал в математической и статистической обработке результатов.

Апробация и внедрение результатов в практику

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рецензируемых Высшей аттестационной комиссией, 1 статья в журнале, индексируемом в базе Scopus и 1 статья в журнале, индексируемом в базе Medline.

Результаты исследования доложены на 9 научно-практических конференциях: Общероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» (Санкт-Петербург, 2015, устный доклад); Конференция молодых ученых ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург, 2015, устный доклад); 55th Annual European Society for Paediatric Endocrinology Meeting (Франция, Париж, 2016, постерный доклад); 5th ENEA WORKSHOP. Hyperprolactinemia and other endocrine causes of infertility (Санкт-Петербург, 2016, устный доклад на английском языке); Всероссийской конференции с международным участием «Командный подход в современной эндокринологии» (Санкт-Петербург, 2016, устный доклад); III Всероссийский Невский урологический форум (Санкт-Петербург, 2016, устный доклад); Симпозиум «Командный подход к оказанию помощи при НФП у детей» (Санкт-Петербург, 2017, устный доклад); Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы современной эндокринологии: фокус на регионы» (Санкт-Петербург, 2018, устный доклад); 57th Annual European Society for Paediatric Endocrinology meeting (Греция, Афины, 2018, устный доклад на английском языке).

Степень достоверности

Степень достоверности результатов работы определяется применением современных методов клинического, лабораторного и иммуногистохимического исследования, а также статистической обработкой данных.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав результатов собственного исследования, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 20 отечественных и 185 зарубежных источников. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 25 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследование включало в себя клиническую и экспериментальную части.

Экспериментальное исследование

Исследование проводилось на лабораторных крысах линии Wistar мужского пола.

Всего было включено 53 особи крыс в возрасте 2-3 дней. Все экспериментальные животные были разделены на 7 групп. Также при планировании исследования все экспериментальные животные были разделены на группы по стадии полового развития. В возрасте 1 месяца соответствовали допубертатной стадии, 2 месяца – препубертатный период, в 4 месяца – половозрелые особи. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Группы экспериментальных животных

| № группы | Название группы | Возраст крыс, месяц | Количество особей, n |
|----------|---|---------------------|----------------------|
| 1 | хирургическая модель гипогонадизма | 2 | 7 |
| 2 | хирургическая модель гипогонадизма | 4 | 8 |
| 3 | комбинированная модель гипогонадизма | 4 | 8 |
| 4 | хирургическая модель гипогонадизма с лечением тестостероном | 4 | 8 |
| 5 | контроль допубертатного возраста | 1 | 8 |
| 6 | контроль препубертатного возраста | 2 | 7 |
| 7 | контроль половозрелые особи | 4 | 6 |

Экспериментальная модель гипогонадотропного гипогонадизма была создана 2 способами:

1. Хирургическая модель создавалась путем односторонней гонадэктомии в раннем неонатальном периоде (4-5 день жизни) по стандартам экспериментальных физиологических

исследований (Corbier P. et al., 1983; Bernhardt J.A. et al., 2007). Известно, что кастрация новорожденных самцов крыс в раннем постнатальном периоде (1-5 день от рождения) нарушает дифференциацию нейроэндокринной системы мозга андрогенами (Мыслицкий В.Ф., 1990; Резников А.Г., 2007). Снижение организующей роли андрогенов на головной мозг ведет к нарушению формирования центров регуляции выброса гонадотропинов и к отсутствию гипофизарного ответа на низкий уровень андрогенов в постнатальном периоде развития животных (Corbier P. et al., 1983; Handa R.J. et al., 1985; Мыслицкий В.Ф., 1990; Шишкина И.В., 1984). Валидацию метода гипогонадотропного гипогонадизма проводили измерением в сыворотке крови половых гормонов: тестостерон, лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в 2-х и 4-х месячном возрасте, которые соответствовали допубертатным значениям.

2. Комбинированная модель: части крыс хирургической модели был введен препарат гонадолиберина в пролонгированной форме (Трипторелин-депо) в дозе 0,29 мг на 100 г веса в возрасте достижения половой зрелости (4 месяца) (Filippi S. et al., 2002; Vignozzi L. et al., 2004; Morelli A. et al., 2004).

В группе хирургической модели в возрасте 4 месяцев была выделена подгруппа из 8 особей крыс, которой был проведен курс введения препарата тестостерона пропионата в дозе 5 мг/кг/сут в течение 7 дней (Байрамов А.А. и др., 2006).

На разных этапах эксперимента были забраны материалы центральных (головной мозг) и периферических (гонады, мышечная ткань, кровь) андроген-зависимых тканей на разных сроках полового развития.

Морфологическое исследование проведено на срезах области медиального аркуатного ядра гипоталамуса (МАЯ). Проводился поиск интересующей области путем множественных пробных фронтальных срезов, зафиксированных в парафине образцов головного мозга, в проекции боковых желудочков на уровне bregma $-3,6$ мм, под контролем микроскопии, согласно стереотаксическому атласу (Paxinos G. et al., 1986). Производилось окрашивание срезов по Ниссию в площади 0,01 мм² правого и левого МАЯ у каждой особи. С учетом имеющихся в литературе данных классификации клеток, определяли фенотип нейронов (Жаботинский Ю.М., 1965). Оценивались площадь и форма клеток, размер и расположение ядер, характер окрашивания клеточных структур, расположение клеток, наличие их скоплений. Морфометрию проводили с помощью программы Imagescore (Russia).

Экспрессия рецепторов к кисспептину KISS1R в центральных андрогензависимых тканях (МАЯ) определялась иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных кроличьих антител KISS1R (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 200µg/ml. Экспрессия рецепторов к тестостерону определялась с использованием мышинных антител клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 500µg/ml. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток докрашивали гематоксилином Карацци. Определяли число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии рецепторов KISS1R и к тестостерону. Срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия).

В периферических андроген-зависимых тканях (гонады, мышцы) определяли концентрацию рецепторов к кисспептину (KISS1R). Образцы тканей, на этапе подготовки для получения гомогената, были подвержены гомогенизации на криогенной мельнице CryoMill-2L (Retsch, Германия). Концентрацию рецепторов KISS1R в полученных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора (MBS 2021161 Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Kisspeptin Receptor (Kiss1R)).

Определение кисспептина в крови крыс проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора (CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunosorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1)).

Морфологическое и иммуногистохимическое исследования проводились под руководством гистоморфолога, д.м.н., старшего научного сотрудника НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ Дробленкова А.В.

Клиническое исследование

В исследование были включены 75 пациентов мужского пола. Они были разделены на три группы. Основную группу составили 22 соматически здоровых мальчика.

Критерии включения в основную группу:

1. Мужской пол;
2. Возраст старше 14 лет;
3. Отсутствием клинических признаков старта полового созревания, объем гонад менее 4 мл;
4. Допубертатные значения уровня ЛГ (<0,1 МЕ/л) и тестостерона (0,09 - 0,22 нмоль/л);
5. Информированное согласие на участие в данном исследовании.

Группы сравнения составили 2 группы практически здоровых мальчиков со стартом пубертата в физиологические сроки. Группа сравнения 1 была представлена 25 мальчиками 14 - 18 лет в стадии Таннер III-V; группа сравнения 2 включала 28 мальчиков 6 - 10 лет в стадии Таннер I. Данные формирования групп представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристики пациентов, включенных в исследование

| | Количество пациентов n (количество человек) | Возраст n (лет) | Стадия полового развития по Таннер |
|--------------------|--|--------------------|------------------------------------|
| Основная группа | 22 | 14-17 | I |
| Группа сравнения 1 | 25 | 14-18 | III-V |
| Группа сравнения 2 | 28 | 6 - 10 | I |

Проведен ретроспективный анализ анамнестических данных, полученных в беседе с пациентами и их родителями, а также при анализе предоставленной медицинской документации. Принимались во внимание факторы перинатального анамнеза, которые могли оказать влияние на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось, особенности течения беременности и родов. Проведен первичный клинический осмотр с оценкой соматического статуса по стандартной схеме клинического обследования. При антропометрическом обследовании производилось измерение роста при помощи механического ростомера ДИАКОМС, серия 0047585, закрепленного на стене с точностью до 0,1 см. Вес измерялся при помощи медицинских электронных настольных весов Масса-К, серия ВЭМ-150. Индекс массы тела (ИМТ) определялся по формуле = вес (кг)/Рост*2 (м). Оценивался в соответствии с референсными таблицами ВОЗ «WHO Reference 2007. Оценка полового развития проводилась при клиническом осмотре по общепринятой методике по шкале Таннер; объем тестикул оценивали с использованием орхидометра.

Лабораторные исследования были направлены на определение уровней кисспептина в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa для Kisspeptin 1 (KISS1) (CEC559Hu) (Cloud-Clone Corp). Определение уровня лютеинизирующего

(ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминисцентным методом на анализаторе "Cobas E 411" (Roche, Швейцария).

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 для Windows. Выборки были проверены по гипотезам о нормальном распределении с использованием показателей асимметрии и эксцесса. Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Для сравнения пар показателей в группах опыта и контроля применяли непараметрический метод рангового сравнения – вычисление парного критерия Вилкоксона (W-критерий). Корреляционный анализ проведен с применением критерия корреляции Пирсона. Различия считали значимыми при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

При анализе данных клинической части исследования использовалась описательная и аналитическая статистика. Сводная статистика была представлена в виде медианы и значений диапазона или процентов случаев с 95% доверительными интервалами. При анализе данных использовался параметрический критерий Манна-Уитни, непараметрический критерий Крускал-Уоллис с попарными межгрупповыми посттестами Dunn и двусторонним ANOVA, а также критерий хи-квадрат с коррекцией Yates'. Чтобы скорректировать возможные смешивающие или модифицирующие эффекты нескольких факторов, была выполнена ANCOVA, в которой потенциальные счетчики были введены в модель в качестве ко-вариатов. Анализ под кривой (ROC) был выполнен для оценки возможности уровня кисспептина в плазме крови быть критерием патологии. Различия считали значимыми при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$). Корреляционный анализ проведен с применением критерия корреляции Пирсона. Для анализа данных использовалось программное обеспечение MedCalc для Windows, версия 18 (MedCalc Software, Остенде, Бельгия) (Schoonjans F., 2017).

Соблюдение этических требований

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ. До включения в исследование у всех было получено письменное информированное согласие.

Результаты исследования

Экспериментальное исследование

Изучение системы кисспептина KISS/KISS1R при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме в периферических андрогензависимых тканях у самцов крыс

Физиологические особенности системы кисспептина в различных возрастных группах интактных животных.

При анализе возрастных изменений уровня тестостерона в крови животных контрольных групп установлены значимые различия в допубертатном возрасте, возрасте старта пубертата и достижении половой зрелости (медиана (Me) тестостерона соответственно 5,99 нг/мл, 14,29 нг/мл и 20,02 нг/мл, $p < 0,01$), что согласуется с представлениями о нарастании уровня этого полового стероида к половозрелому состоянию. Сделан вывод о закономерном повышении уровня тестостерона плазмы крови у здоровых самцов крыс при прогрессировании полового созревания, достигая максимального значения в возрасте 4 мес.

Что касается количественных характеристик кисспептиновых рецепторов в гонадах, то в группе интактных животных было отмечено их увеличение в зависимости от возраста. Так, изменения в тестисах от возраста допубертата (1 мес.) к возрасту половой зрелости (4 мес.)

составили 0,92 нг/мг/белка против 1,13 нг/мг/белка соответственно, $p < 0,01$. В скелетных мышцах подобных изменений получено не было. Даже в физиологических условиях с возрастом не происходило нарастание количества кисспептиновых рецепторов (соответственно медианы в допубертате и периоде половой зрелости 0,12 нг/мг/белка и 0,11 нг/мг/белка, $p > 0,05$). При этом количество данной группы рецепторов как в отсутствие пубертата, так и в периоде полной половой зрелости в тестикулах было значимо выше, чем в мышцах ($p < 0,05$), свидетельствуя о физиологически более низкой представленности кисспептиновых рецепторов в ткани скелетной мускулатуры, несмотря на ее принадлежность также к числу андрогензависимых тканей.

Таким образом, физиологическая представленность рецепторов кисспептина имела различную плотность в гонадах и скелетных мышцах. В первых подтверждено статистически значимое нарастание рецепторов однонаправленно с ростом тестостеронемии на фоне прогрессии полового развития, в скелетных же мышцах подобных изменений не было отмечено – количество их оставалось неизменным и значительно более низким по сравнению с гонадами.

Изучение роли системы кисспептина в регуляции полового развития на модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма у самцов крыс.

Экспериментально индуцированный гипогонадизм приводил к снижению уровня тестостерона крови у половозрелых особей до препубертатных значений, статистически значимо отличавшихся от тестостеронемии в группе интактных животных соответствующего возраста (медианы 15,39 нг/мл в хирургической модели, 9,51 нг/мл в комбинированной модели против 20,02 нг/мл у интактных половозрелых особей, $p < 0,01$). Данные представлены на рисунке 1.

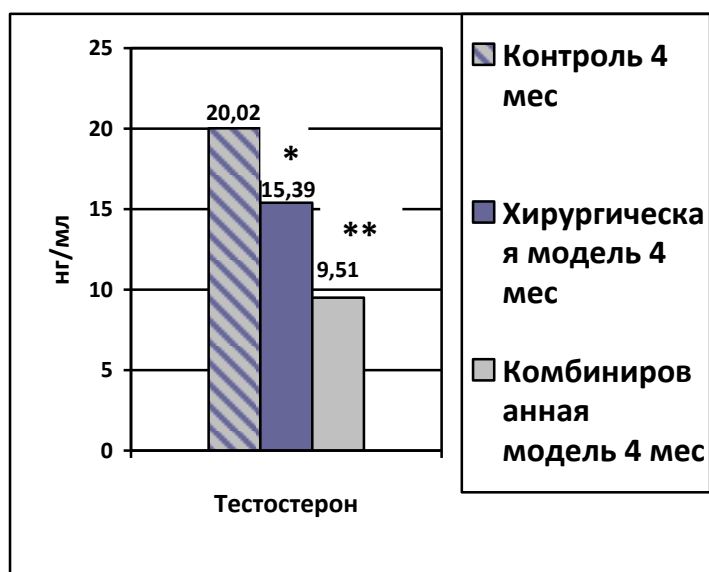


Рисунок 1 - Сравнительный анализ уровня тестостерона крови на модели гипогонадотропного гипогонадизма и здоровых половозрелых особей (нг/мл)

Примечание к рисунку 1: *- сравнение контроль 4 мес.- хирургическая модель 4 мес. ($p < 0,01$); ** - сравнение контроль 4 мес. –комбинированная модель 4 мес. ($p < 0,01$).

Концентрация рецепторов кисспептина в гонадах экспериментальных групп гипогонадизма была значимо ниже, чем у половозрелых интактных крыс (Ме соответственно 0,88 нг/мг/белка и 1,13 нг/мг/белка, $p < 0,05$). Полученные данные плотности KISS1R в модели гипогонадизма (4 мес) соответствовали показателям группы контроля допубертатного возраста (1 мес) (Ме 0,88 нг/мг/белка против 0,92 нг/мг/белка, $p > 0,05$). Данные представлены на рисунке 2.

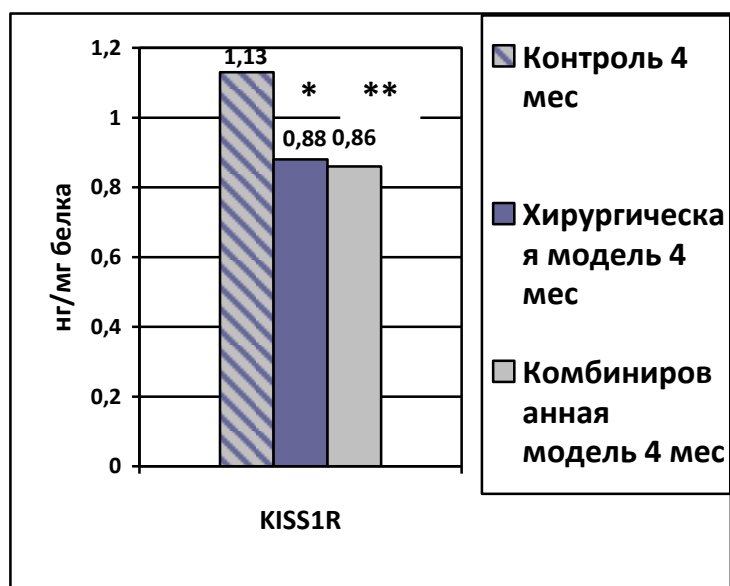


Рисунок 2 - Сравнительный анализ KISS1R в гонадах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля 4 мес (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 2: *- сравнение контроль 4 мес.- хирургическая модель 4 мес. ($p < 0,01$); ** - сравнение контроль 4 мес. –комбинированная модель 4 мес. ($p < 0,01$).

Различий в количестве рецепторов KISS1R в мышцах хирургической модели гипогонадизма и допубертатными, пубертатными интактными крысами (Ме 0,1 нг/мг против 0,12 нг/мг, 0,18 нг/мг, $p > 0,05$) получено не было.

Значимые различия были получены в комбинированной экспериментальной модели гипогонадизма. Концентрация рецептора KISS1R была ниже в этой группе при сравнении как с интактными половозрелыми самцами (Ме 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно, $p < 0,01$), так и при сопоставлении с хирургической моделью в 4 месяца (Ме 0,06 нг/мг и 0,1 нг/мг, $p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 3.

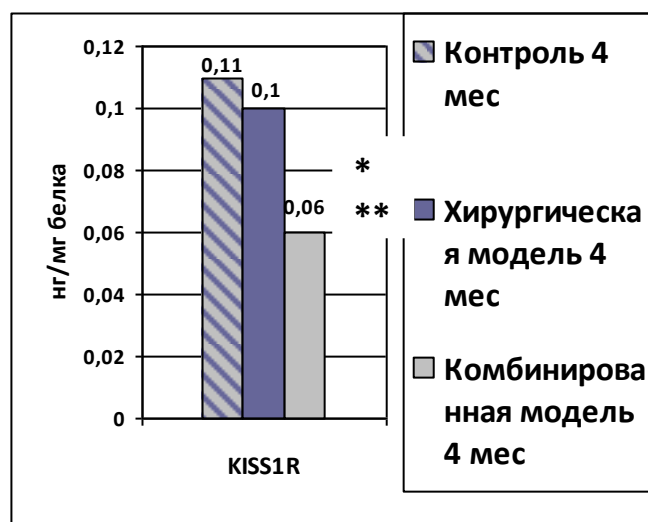


Рисунок 3 - Сравнительный анализ KISS1R в мышцах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля 4 мес (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 3: *- сравнение хирургическая модель 4 мес. –комбинированная модель 4 мес. ($p < 0,05$); ** - сравнение контроль 4 мес. –комбинированная модель 4 мес. ($p < 0,01$).

Было сделано заключение о влиянии выраженности гипотестостеронемии на снижение количества рецепторов KISS1R с исходно менее насыщенной ими мышечной ткани

Что касается уровня кисспептина крови, то проведенный корреляционный анализ выявил сильную обратную связь между кисспептином и тестостероном как у здоровых особей, так и при гипогонадотропном гипогонадизме ($r = -0,99$, $p < 0,01$ в группе контроля, $r = -0,86$, $p < 0,05$ в модели гипогонадизма). Сделано заключение о разнонаправленном содержании кисспептина и тестостерона в крови, независимо от их количественного уровня.

Изучение роли системы кисспептина в регуляции полового развития на экспериментальной модели гипогонадотропного гипогонадизма самцов крыс на фоне введения тестостерона.

На фоне введения тестостерона отмечалось повышение его в плазме крови экспериментальных животных и достигало медианных значений 26,26 нг/мл, что было статистически выше таковых до начала лечения (15,39 нг/мл) ($p < 0,01$). При этом полученные значения превышали таковые в контрольных группах интактных самцов крыс половозрелого возраста (Me 26,26 нг/мл против Me 20,02 нг/мл в контроле, $p < 0,01$). Таким образом, терапия тестостероном гипогонадотропного гипогонадизма в использованной схеме приводила к превышению физиологического уровня тестостерона.

Терапия тестостероном, несмотря на восстановление его уровня в крови до уровня половозрелых особей, не приводила к значимому увеличению количества KISS1R у 4-х месячных самцов крыс в гонадах и скелетных мышцах, которые оставались соответствующими таковым у особей, не вступивших в пубертат.

Уровень кисспептина крови на фоне введения тестостерона также не изменялся.

На основании полученных данных сделано общее заключение, что терапия тестостероном не восстанавливала регуляторные взаимоотношения на уровне периферических андрогензависимых тканей, обеспечиваемых рецепторами кисспептина, несмотря на восстановление пубертатного уровня этого стероида в крови, по крайней мере в примененной дозе и схеме введения. Для уточнения возможностей заместительной терапии требуется продолжение исследований в данном направлении.

Изучение системы кисспептина KISS/KISS1R при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме в центральной нервной системе у самцов крыс

Была выполнена морфологическая оценка нейронов медиального аркуатного ядра (МАЯ). Данные представлены на рисунке 4.

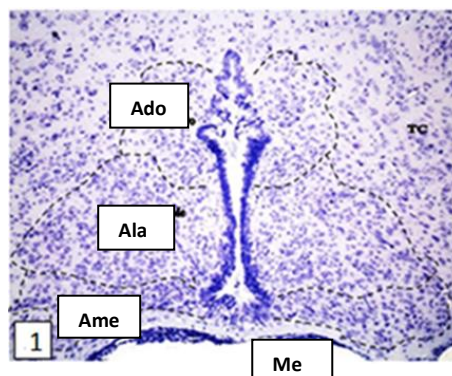


Рисунок 4 - Аркуатный ядерный комплекс

Примечание к рисунку 4: Сопоставление фронтальных срезов промежуточного мозга интактных половозрелых крыс с картами стереотаксического атласа головного мозга крыс Paxinos G. and Watson C. (1998). Ado – аркуатное дорсальное ядро, Ala – аркуатное латеральное ядро, АМе – аркуатное медиальное ядро, МЕ – срединное возвышение. Окраска методом Ниссля, ок. x10, об. x10.

На этапе морфологического исследования был проведен анализ изменения строения нейронов, количества их патологических форм, пространственных глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений в гипоталамических ядрах при гипогонадизме в сравнении с контрольной группой. Выявлено, что при гипогонадотропном гипогонадизме в 2 раза уменьшалась представленность неизмененных и малоизмененных клеток, площадь их также становилась значимо меньше по сравнению с контролем. Рисунок 5.

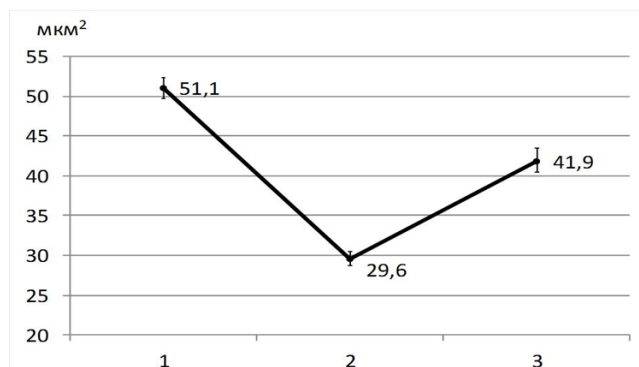


Рисунок 5 - Изменения площади тел малоизмененных нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии тестостероном (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1)

Примечание к рисунку 5: Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ($p < 0,05$).

Отмечена тенденция к группированию клеток различной морфологии, где наряду с малоизмененными нейронами визуализировались значимо измененные (гиперхромные, сморщенные) жизнеспособные нейроны. Подобные изменения в клетках обусловлены необратимыми процессами атрофии/склероза. Также в группе гипогонадизма многократно увеличилось число гибнущих и погибших, или теневидных, клеток. В целом описанные изменения морфологии нейронов расценены, как дегенеративные. Рисунок 6.

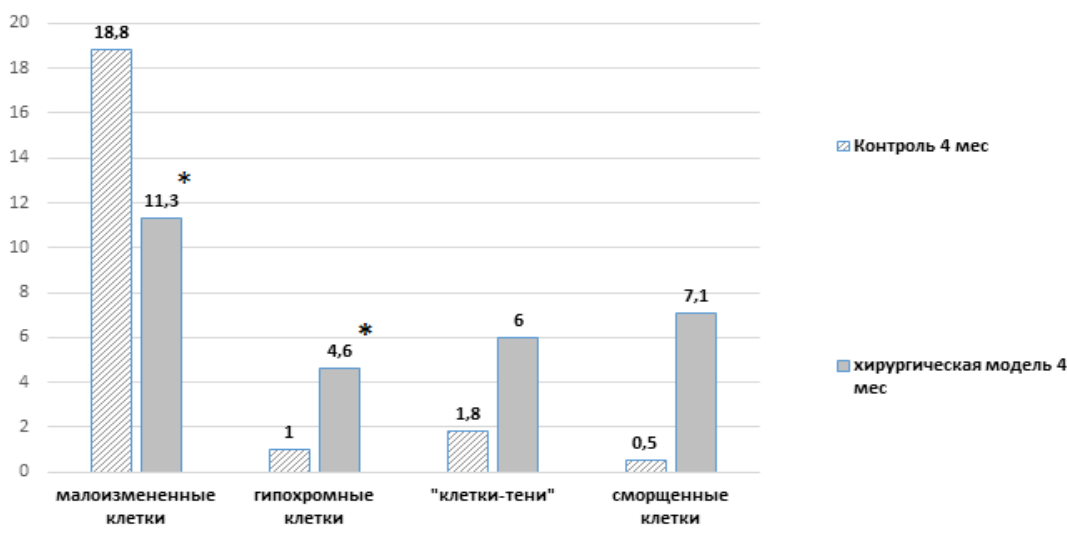


Рисунок 6 - Анализ соотношения нейронов различных видов в разных группах самцов крыс на площади $0,01 \text{ мм}^2$ ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Примечание к рисунку 6: * сравнение с группой контроля $p < 0,05$.

При моделировании гипогонадотропного гипогонадизма было установлено возрастание глиоцито-нейронального индекса, что, наряду со склонностью нейронов к группированию в условиях устойчивого снижения тестостерона, позволило расценивать изменения, как

компенсаторно-приспособительные. Известно, что, объединяясь в группы для более тесного контакта, глиоциты и нейроны способны обмениваться рядом жизненно важных микро- и макромолекул, таких как глюкоза, РНК, нейротрофический глиальный фактор, что в условиях развития дистрофических процессов может трактоваться, как компенсаторный механизм.

Изучение экспрессии рецепторов к андрогенам в МАЯ различных экспериментальных групп самцов крыс.

На этапе иммуногистохимического исследования были изучены изменения экспрессии андрогеновых (АР) и кисспептиновых рецепторов (KISS1R) в нейронах МАЯ у интактных животных и при гипогонадотропном гипогонадизме.

Все нейроны этой области экспрессировали рецепторы к андрогенам. У интактных половозрелых самцов крыс была отмечена преимущественно высокая степень экспрессии с некоторыми вариациями в зависимости от распределения рецепторов в проекции клеточных структур. Умеренная и слабая степень экспрессии имела место лишь в единичных нейронах. Напротив, в модели гипогонадотропного гипогонадизма, наряду с вышеописанными дистрофическими изменениями морфологии нейронов, также были установлены значимые отличия в экспрессии АР. Так, признаки выраженной экспрессии в нейронах МАЯ отсутствовали ($p < 0,05$); экспрессия АР большинством малоизмененных нейронов была расценена, как умеренная. Доля нейронов со слабой экспрессией выросла в 8,6 раза ($p < 0,05$), также определялись тневидные клетки с экспрессией, градирующей как «очень слабая».

Измерение экспрессии рецепторов KISS1R в медиальном аркуатном ядре различных экспериментальных групп самцов крыс.

Подобные изменения определялись и в отношении экспрессии рецепторов KISS1R в МАЯ. У интактных крыс были выявлены 2 группы нейронов – с очень выраженной и слабо выраженной экспрессией KISS1R. В клетках с высокой экспрессией KISS1R локализовались в плазматической мембране и цитоплазме тел и в отростках, отходящих от тела данных клеток. В плазмолемме их экспрессия была непрерывной, а область экспрессии – более широкой, чем у клеток, имеющих низкую экспрессию KISS1R. Последние имели морфологические отличия, представленные меньшими размерами и более светлой окраской ядра и неправильной овальной или полигональной формой плазматической мембраны. Данные представлены на рисунке 7.

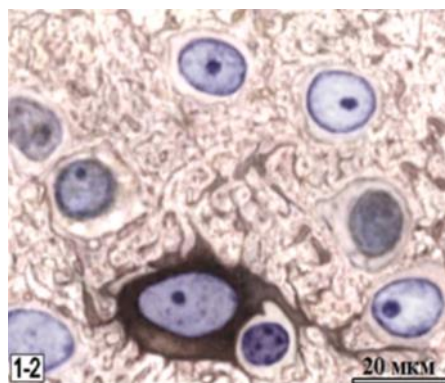


Рисунок 7 - Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у здоровых половозрелых крыс. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100

В условиях гипогонадизма экспрессия рецепторов KISS1R значительно снижалась, сохраняясь лишь на отдельных участках плазмолеммы и, практически отсутствуя в цитоплазме нейронов. Рисунок 8.

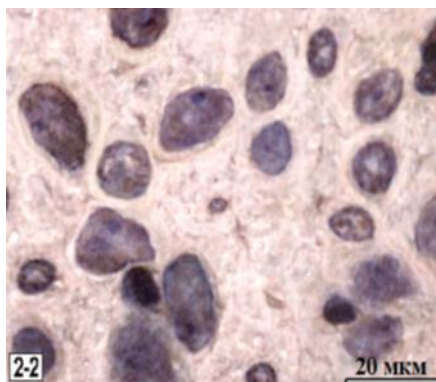


Рисунок 8 - Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 мес. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100

Суммируя полученные результаты, было установлено, что при гипогонадотропном гипогонадизме, в условиях устойчивого дефицита тестостерона в нейронах МАЯ гипоталамуса развиваются дегенеративно-дистрофические изменения с точки зрения морфологии клеток, и снижение экспрессии андрогеновых и кисспептиновых рецепторов, с точки зрения функциональной активности клеток.

Представило интерес изучение гистоморфологических характеристик нейронов МАЯ на фоне введения тестостерона. Была отмечена положительная динамика, выражавшаяся в увеличении площади малоизмененных нейронов в основном за счет хорошо выраженной цитоплазмы, а также в снижении тенденции к образованию групп. Однако число гибнущих и погибших клеток, равно как и глиоцито-нейрональный индекс, не претерпели существенных изменений. Степень экспрессии AP и KISS1R частично восстанавливалась, выражаясь в статистически значимо большей доле нейронов с умеренной и выраженной экспрессией у гипогонадных крыс с лечением по сравнению с не лечеными особями.

Таким образом, введение тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме подвергает частичному обратному развитию дегенеративно-дистрофические процессы и частично восстанавливает интенсивность экспрессии андрогеновых и кисспептиновых рецепторов, однако не влияет на процесс гибели нервных клеток.

Подводя общий итог экспериментальной части исследования и транслируя полученные результаты в клиническую практику, следует отметить значимое негативное влияние устойчивого снижения уровня тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме на процессы кисспептин-опосредованной регуляции полового развития, представленные уменьшением количества кисспептиновых рецепторов в периферических андрогензависимых тканях, прогрессией дегенеративных морфологических и функциональных изменений в центральных отделах головного мозга, регулирующих активность репродуктивной системы, не полностью обратимых даже при восстановлении уровня тестостерона путем заместительной терапии. Полученные результаты обосновывают важность трансляции их в клиническую практику с целью анализа кисспептиновой регуляции при центральных вариантах задержки полового развития для поиска и обоснования новых диагностических и терапевтических возможностей при данной группе патологии.

Клиническое исследование

В клинический раздел исследования было включено 75 детей и подростков мужского пола. Были сформированы 3 группы мальчиков, различного возраста: основная группа – 22 мальчика старше 14 лет с отсутствием вторичных половых признаков, допубертатным объемом тестикул и

низким уровнем тестостерона и ЛГ $<0,01$ МЕ/л. Был проведен стимуляционный тест с трипторелином-депо, по результатам которого установлено, что в 6 случаях стимулированный пик ЛГ был ниже 10 МЕ/л, что подтверждало гипогонадотропный гипогонадизм. В 16 случаях максимальное значение ЛГ было выше 10 МЕ/л, что свидетельствовало о синдроме позднего пубертата. Уровень тестостерона у мальчиков с гипогонадотропным гипогонадизмом также, как у мальчиков с синдромом позднего пубертата, был низким, не имея значимых различий (медианы в подгруппах соответственно: 0,09 нмоль/л и 0,22 нмоль/л, $p=0,11$). Поскольку основной идеей проводимого исследования являлось уточнение механизмов задержки полового развития центрального генеза, пациенты с гипогонадотропным гипогонадизмом и синдромом позднего пубертата были объединены в одну группу задержки полового созревания.

Группы сравнения были представлены мальчиками с физиологическим течением полового развития. Группа сравнения 1 - юноши в возрасте сопоставимом с основной группой - от 14 до 17 лет, имеющие физиологическое половое созревание (Таннер III-V), и группа сравнения 2 - мальчики, не имеющие старт пубертата в физиологически допустимые сроки - в возрасте от 8 до 10 лет (Таннер I). Все включенные в исследование дети и подростки не имели острой и тяжелой хронической соматической патологии, не принимали препараты, влияющие на стероидогенез.

При проведении сравнительного анализа факторов перинатального риска в группах не было установлено различий в частоте преэклампсии, анемии во время беременности, преждевременных и оперативных родов, внутриутробной инфекции ($p>0,05$), что позволило сделать заключение о сопоставимости групп с точки зрения возможного негативного влияния на функциональную активность гипоталамо-гипофизарной системы в раннем периоде развития и актуальности поиска других причин различий в регуляции полового развития в сопоставимых по возрасту и другим факторам группах. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Сравнение перинатальных характеристик в различных группах

| Характеристика | Основная группа задержки полового развития (n = 22) | Группа сравнения 1 Таннер III-V (n = 25) | Группа сравнения 2 Таннер I (n = 28) | P* |
|---|---|--|--------------------------------------|------|
| Преждевременные роды, % | 0 | 0 | 10,7 | 0.11 |
| Оперативные роды, % | 27 | 23 | 25 | 0.98 |
| Преэклампсия, % | 35 | 29 | 33 | 0.90 |
| Анемия во время беременности, % | 18 | 14 | 25 | 0.63 |
| Внутриутробная инфекция, % | 6 | 5 | 4 | 0.94 |
| Примечание: * Крускал-Уоллес тест для всех групп. | | | | |

При сравнении параметров физического развития на момент включения в исследование, были установлены различия в параметрах роста – дети основной группы имели более низкое значение SDS роста (Me -0,79 SDS) при сравнении с группой сравнения 1 сопоставимого возраста (Me 0,42 SDS), $p<0,05$. При этом медиана SDS роста в группе сравнения 2 составила -0,5 SDS и была сопоставима с основной группой, $p>0,05$. Отставание в росте более 1 SDS составило 36% в основной группе, 16% и 35% в группах сравнения 1 и 2 соответственно. При оценке показателей ИМТ было установлено, что избыток веса отмечался у 27% обследованных основной группы, 40%

группы сравнения 1 и 21% группы сравнения 2, данные различия были статистически не значимы ($p>0,05$).

Выполнено определение кисспептина крови у всех исследуемых. При анализе уровня кисспептина внутри основной группы, где ранее не было выявлено статистических различий по клинико-биохимическим параметрам, также не было установлено различий кисспептина крови в группе позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма (медианы соответственно 29,5 пг/мл и 44.5 пг/мл, $p=0,63$). Полученные результаты подтверждают возможность объединения функциональной и органической задержки пубертата в общую группу задержки полового развития по признаку отсутствия реактивации центральных отделов гонадостата в должном для этого возрасте.

В группах мальчиков с физиологическим для возраста сценарием полового развития, независимо от его стадии, были установлены сопоставимые значения уровня кисспептина крови (медианы в обеих группах 13.8 пг/мл), которые были значимо ниже по сравнению с таковыми в основной группе задержки полового развития, где медиана кисспептина составила 31.2 пг/мл ($p=0,02$). Данные представлены на рисунке 9.

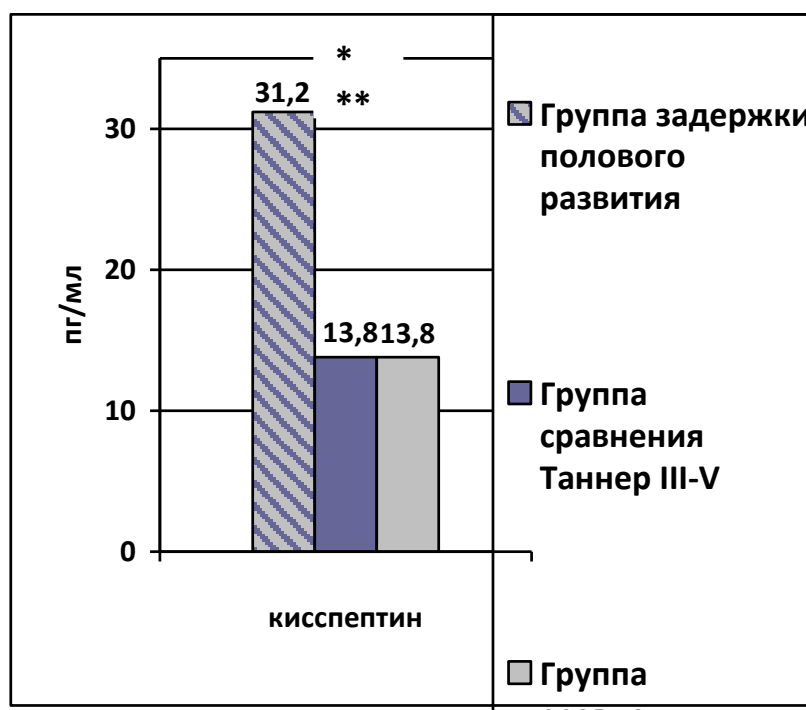


Рисунок 9 - Сравнительный анализ уровня кисспептина плазмы крови в различных группах (пг/мл)

Примечание к рисунку 9: *сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер III-V ($p=0,02$); **сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер I ($p=0,02$).

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа показано, что уровень кисспептина крови, сопоставимо низкий при физиологическом течении пубертата, независимо от его стадии, значимо повышается при задержке полового развития в соответствующем старту пубертата возрасте.

Проведенный корреляционный анализ между уровнем тестостерона и кисспептина крови установил обратную связь средней силы между этими показателями ($r = - 0,5$, $p<0,01$). Подобные данные ранее были получены на экспериментальном материале. Таким образом, наличие стойкой обратной взаимосвязи между уровнями тестостерона и кисспептина крови, наряду с установленным клинико-биохимическим фенотипом подростков, имеющих значимо более высокий уровень кисспептинемии при задержке полового развития центрального геноза по

сравнению с мальчиками, не имеющими нарушений полового развития, позволяют обозначить новые регуляторные механизмы стероидогенеза со стороны ксиспептина по принципу «обратной связи».

Полученные данные о повышении ксиспептина крови при задержке полового развития определили исследовательский поиск в направлении количественных значений данного сигнального пептида, возможных для использования в качестве критерия патологического сценария пубертата. В результате проведенного анализа распределения под кривой (ROC) значений ксиспептина при задержке полового развития и физиологическом течении пубертата (основная группа и группа сравнения 1) был установлен оптимальный пороговый уровень ксиспептина в крови для прогнозирования задержки полового созревания. Таким уровнем по данным ROC анализа, можно считать показатель ксиспептина крови 16,9 пг/мл (чувствительность 73%, специфичность 92%, $p < 0,0001$). Данные представлены на рисунке 10.

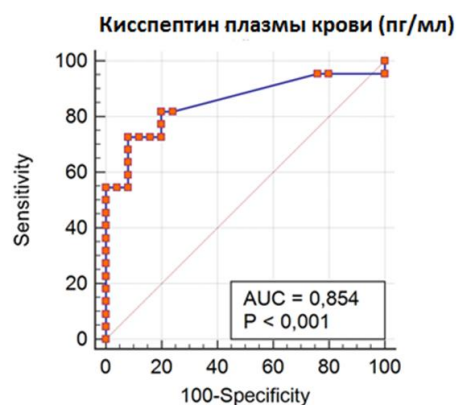


Рисунок 10 - ROC анализ уровня ксиспептина плазмы крови в основной группе

Для уточнения возможных дифференциальных различий в значениях ксиспептина для прогноза синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма подобные ROC-кривые были построены отдельно для значений ксиспептина крови при каждом из названных состояний в сравнении со значениями в группе контроля 1. Пороговые значения ксиспептина крови при обоих состояниях были одинаковы и не отличались от такового для общей группы задержки полового развития, т.е. соответствовали 16,9 пг/мл (для синдрома позднего пубертата чувствительность 77,7%, специфичность 92%; для гипогонадотропного гипогонадизма чувствительность 66,7%, специфичность 92%, $p < 0,0001$). Данные представлены на рисунке 11 и 12.

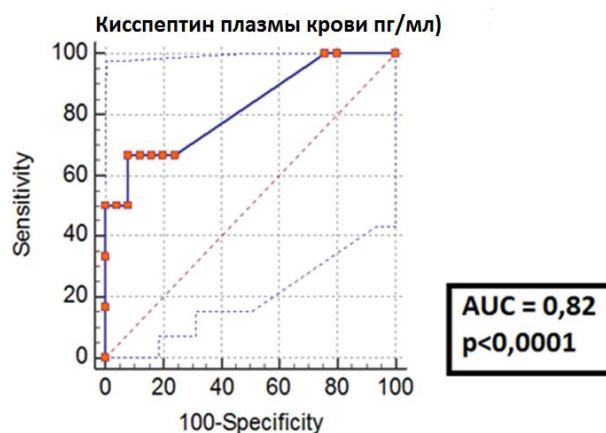


Рисунок 11 - ROC анализ уровня ксиспептина плазмы крови в подгруппе подростков с гипогонадотропным гипогонадизмом

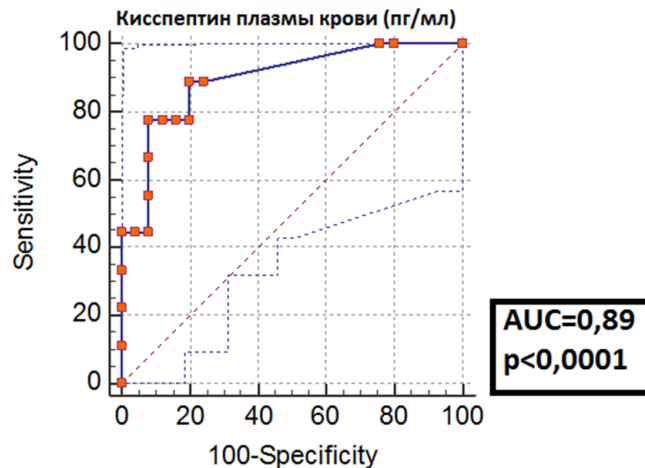


Рисунок 12 - ROC анализ уровня кисспептина плазмы крови в подгруппе подростков с синдромом позднего пубертата

Сделано общее заключение, что значение кисспептина крови $>16,9$ пг/мл является пороговым для прогнозирования задержки старта полового развития, но не позволяет дифференцировать функциональные и органические его варианты.

Выводы

1. Экспериментально индуцированный гипогонадотропный гипогонадизм у самцов крыс ведет к нарушению периферического сигналинга лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS1/KISS1R, представленного значительным снижением количества кисспептиновых рецепторов в андрогензависимых тканях (гонадах и скелетной мускулатуре), достигающим допубертатного уровня, причем на уровне мышечной ткани данный эффект отмечен только в комбинированной модели гипогонадизма. В крови низкий уровень тестостерона имеет сильную обратную корреляцию с плазменным уровнем кисспептина.
2. Изменения центральных механизмов регуляции полового развития при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме у самцов крыс представлены дегенеративными процессами в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса, сопровождающимися значимым снижением экспрессии андрогеновых и кисспептиновых рецепторов. При гипогонадотропном гипогонадизме установлено появление изменений морфологии и гибели части нейронов в ассоциации с активацией реакции глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений, которые могут быть расценены, как реакция компенсаторного ремоделирования нервной ткани.
3. Экзогенное введение тестостерона, восстанавливая его уровень в крови, не приводит к существенному изменению количества кисспептиновых рецепторов в периферических андрогензависимых тканях у самцов крыс. На центральном уровне терапия тестостероном оказывает частичный положительный эффект на дегенеративные изменения в нейронах МАЯ гипоталамуса, выражающийся в увеличении площади тел нейронов с $29,6$ мкм² до $41,9$ мкм², но не достигая таковой в группе интактных половозрелых особей ($51,1$ мкм²), и восстановлении экспрессии андрогеновых рецепторов, но не влияет на процесс гибели нервных клеток, начавшийся на фоне гипогонадизма.
4. Среди мальчиков с задержкой пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом не установлено значимых различий в факторах потенциального перинатального риска в сравнении со здоровыми детьми групп контроля. Показатели линейного роста при задержке полового развития были достоверно ниже. Уровень кисспептина крови, не имеющий существенных количественных различий при физиологическом для возраста, независимо от стадии, половом развитии, значимо возрастает у мальчиков в возрасте старше 14 лет, не имеющих старта пубертата.

5. Установлено пороговое значение уровня кисспептина крови – 16,9 пг/мл, которое с высокой специфичностью и чувствительностью (соответственно 92% и 73%) может быть рекомендовано в качестве диагностического биохимического маркера задержки центральных механизмов реактивации гонадной оси при клинических симптомах задержки старта пубертата у мальчиков в возрасте старше 14 лет.

Практические рекомендации

1. Определение уровня кисспептина крови может быть рекомендовано для включения в план обследования мальчиков с отсутствием старта пубертата в возрасте старше 14 лет. Уровень кисспептина выше 16,9 пг/мл рекомендуется расценивать в качестве дополнительного диагностического критерия задержки старта полового развития в данной группе пациентов.
2. Полученные в ходе экспериментального исследования результаты могут быть использованы в программах додипломного и последипломного образования по специальностям нормальная и патологическая физиология, эндокринология, андрология.

Список опубликованных работ

1. **Никитина, И.Л. Кисспептины в физиологии и патологии полового развития – новые диагностические и терапевтические возможности / И.Л. Никитина, А.А. Байрамов, Ю.Н. Ходулева (Юхлина) [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. - Т. 12, № 4. - С. 3-12.**
2. **Ходулева, Ю.Н. (Юхлина) Дегенеративные изменения нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра в модели мужского гипогонадизма / Ю.Н. Ходулева (Юхлина), З.П. Асауленко, А.А. Байрамов [и др.] // Педиатр. — 2015. - Т. 6, № 3. - С. 62-68.**
3. **Никитина, И.Л. Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма / И.Л. Никитина, Ю.Н. Ходулева (Юхлина), А.С. Масель [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2016. - Т. 60, № 4. - С.24-33.**
4. **Дробленков, А.В. Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма / А.В. Дробленков, Л.Г. Прошина, Ю.Н. Юхлина [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2017. - Т. 61, № 4. - С. 21-30.**
5. **Юхлина, Ю.Н. Уровень кисспептина в крови мальчиков с физиологическим половым созреванием и гипогонадотропным гипогонадизмом / Ю.Н. Юхлина, И.И. Нагорная, И.Л. Никитина // Инновационные технологии в эндокринологии сборник тезисов III Всероссийского эндокринологического конгресса с международным участием. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России; ОО «Российская ассоциация эндокринологов». - 2017. - С. 481. Тезисы**
6. **Никитина, И.Л. Потенциал диагностических и терапевтических возможностей при задержке пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме у мальчиков / И.Л. Никитина, Ю.Н. Юхлина, Е.Ю. Васильева [и др.] // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. - 2018. - № 2. - С. 78-82.**
7. **Никитина, И.Л. Кисспептиновые механизмы регуляции полового развития мальчиков: потенциал диагностики и терапии при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме / И.Л. Никитина, Ю.Н. Юхлина, Е.Ю. Васильева [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2018. - Т. 64, № 5. - С. 280-285.**
8. **Nikitina, I. Study of the Serum Kisspeptin Level in Healthy and Hypogonadotropic Boys / I. Nikitina, Yu. Khoduleva (Yukhlina), I. Nagornaya [et al.] // Horm Res Paediatr. – 2018. – Vol. 90, Suppl. 1. – P. 69.**

Список сокращений

AP – андрогеновые рецепторы

ГГГ ось – гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось

ГГ – гипогонадотропный гипогонадизм

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ИМТ - индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МАЯ – медиальное аркуатное ядро

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЦНС – центральная нервная система

KISS1R – рецептор кисспептина

Me – медиана

SDS - Standart Deviation Score