

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЮХЛИНА

Юлия Николаевна

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

14.01.02 – эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Никитина Ирина Леоровна

доктор медицинских наук, доцент

Научный консультант:

Байрамов Алекбер Азизович

доктор медицинских наук

Санкт-Петербург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ..... | 12 |
| 1.1. Физиология репродуктивной системы | 12 |
| 1.2. Лиганд-рецепторная система кисспептина - ключевой регулятор репродуктивной системы..... | 19 |
| 1.3. Синдром позднего пубертата и гипогонадотропный гипогонадизм: патофизиология и современные технологии коррекции..... | 29 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 34 |
| 2.1. Дизайн экспериментального исследования | 35 |
| 2.2. Дизайн клинического исследования..... | 41 |
| ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R В РЕГУЛЯЦИИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ САМЦОВ КРЫС. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ | 46 |
| 3.1. Изучение системы кисспептина KISS/KISS1R при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме в периферических андрогензависимых тканях у самцов крыс | 46 |
| 3.2. Изучение системы кисспептина KISS/KISS1R при экспериментально индуцированном гипогонадотропном гипогонадизме в центральной нервной системе у самцов крыс | 63 |
| ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R ПРИ ЗАДЕРЖКЕ СТАРТА ПУБЕРТАТА И ГИПОГОНАДОТРОПНОМ ГИПОГОНАДИЗМЕ У МАЛЬЧИКОВ. КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ | 78 |
| 4.1. Клиническая характеристика мальчиков с задержкой старта пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| 4.2. Характеристика функциональной активности системы кисспептина KISS1/KISS1R у мальчиков с задержкой старта пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом..... | 81 |
| ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 88 |
| ВЫВОДЫ..... | 103 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 105 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 106 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 107 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

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 [1, 2, 3, 4, 5]. Нарушения на любом регуляторном уровне ведут к функциональной либо органической патологии полового развития, исходом которой может стать гипогонадизм и бесплодие [5, 6, 7]. Значимым открытием второго тысячелетия явилась идентификация роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS1/KISS1R, как ключевого регулятора активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГ) [1, 8, 9, 10, 11, 12]. 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 кисспептин в качестве потенциально наиболее эффективного нового метода терапии болезней, связанных с нарушениями репродуктивной функции [13].

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 [14, 15]. Существующие методы диагностики и лечения не всегда эффективны, что определяет актуальность исследований, направленных на уточнение новых механизмов регуляции полового развития [1, 13].

Вопросы, связанные с характером и механизмами влияния лиганд-рецепторной системы кинспептина 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 кинспептина [1, 11]. Однако в настоящее время данный вопрос изучен не в полной мере и представляет исследовательский интерес.

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

Цель исследования

Оценить функциональную активность лиганд-рецепторной системы кинспептина 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 исследования

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. Приоритетным является установление разнонаправленных корреляций тестостерона и кинспептина 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 кинспептиновых 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 теневидных) клеток, а также нарастании глиоцито-нейронального индекса. Степень выраженности экспрессии рецепторов тестостерона и кинспептина при этом заметно снижается. Впервые установлено, что введение тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме, полностью восстанавливая его уровень в крови, не приводит к восстановлению плотности кинспептиновых рецепторов в тестикулах, а на уровне центральной нервной системы (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 кинспептина крови является низким при физиологическом сценарии полового развития, независимо от возраста, и значимо возрастает при патологической его задержке. Предложено использование кинспептина крови, как диагностического маркера задержки полового развития.

Теоретическая и практическая значимость

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

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

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 ксиспептина, а также редукцией ксиспептиновых рецепторов в тестикулах и скелетных мышцах. Изменения уровней тестостерона и ксиспептина 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 ксиспептиновых 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.

Степень достоверности

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

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).

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 ИФА). После окончания исследования автор участвовал в математической и статистической обработке результатов.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ

1.1. Физиология репродуктивной системы

Одним из уникальных свойств всех видов живых организмов является способность к репродукции. Репродуктивная система человека представляет собой совокупность органов и систем, обеспечивающих функцию продолжения рода, осуществление которой возможно лишь после совершения каскада событий, способствующих достижению определенной степени зрелости репродуктивной системы. Совокупность физиологических процессов в организме ребенка, приводящих к полной соматической, психологической и половой зрелости определяют, как половое развитие или созревание. Формирование, созревание и дифференцировка репродуктивной системы является сложным многоступенчатым процессом с участием различных механизмов на генетическом, молекулярном, гормональном и биохимическом уровнях [1, 16]. Так, в результате многофакторного влияния в различные, строго лимитированные, периоды пренатальной и постнатальной жизни, происходит дифференцировка пола. Выделяют генетический, гонадный, фенотипический и психологический пол. Процессы анатомического формирования пола происходят до 14 недели беременности, половая дифференцировка мозга осуществляется во второй половине внутриутробного развития [16, 17, 18].

Онтогенез репродуктивных органов начинается с появления первичных половых клеток или гоноцитов, которые выявляются уже на стадии двухнедельного эмбриона. Между 5 и 7 неделями беременности гоноциты мигрируют из области кишечной эктодермы в половые валики, где делятся путем митоза, в результате чего формируется первичная (индифферентная) гонада.

Хронология и динамика дальнейшей дифференцировки гонацитов зависит от пола развивающегося организма и контролируется генетическими, гормональными и эпигенетическими факторами. Также к 4 неделе беременности формируются предшественники внутренних половых органов – Вольфовы протоки, предшественники мужских внутренних половых органов, и Мюллеровы протоки, предшественники женских органов. У плода мужского пола семенники дифференцируются к концу пятой эмбриональной недели, прежде чем гонадотрофы станут функционально активными. Формирование из первичной гонады тестикул происходит на 7-10 неделе развития под влиянием SR γ -гена, экспрессируемого на длинном плече Y-хромосомы. Таким образом происходит дифференцировка клеток Сертоли, а чуть позже и клеток Лейдига. Клетки Сертоли секретируют антимюллеров гормон (АМГ), отвечающий за регрессию Мюллеровых протоков. Клетки Лейдига секретируют тестостерон и инсулиноподобный фактор роста 3. Андрогены индуцируют дифференцировку Вольфовых протоков и вирилизацию уrogenитального синуса и наружных половых органов. На 6-8 неделе развития эмбриона из производных задних частей Вольфовых каналов и нефрогенной ткани формируется половой тяж, который дает начало семенным трубочкам семенников. Далее, под влиянием тестостерона, который секретируется в семенниках плода с 8-й недели беременности и к 3-5-месяцам, его уровень в крови достигает такового половозрелого мужчины, происходит маскулинизация и развитие внутренних половых органов. Активный же метаболит тестостерона, дигидротестостерон, формирующийся под воздействием фермента 5-альфа-редуктазы, способствует развитию наружных половых органов (половой бугорок преобразуется в половой член, половые складки в мошонку) [19, 20]. На этой ранней стадии жизни недостаточность гипофиза не влияет на половую дифференциацию мужчин. И, наоборот, во второй половине беременности фетальный лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) становятся основными регуляторами физиологии яичка [21]. ЛГ контролирует функцию клеток Лейдига: андрогены и инсулиноподобный фактор роста 3 (ИПФР 3) ответственны за развитие яичка [22],

тогда как андрогены также оказывают трофическое влияние на размер полового члена и мошонки. ФСГ индуцирует пролиферацию клеток Сертоли и секрецию АМГ и ингибина В. В целом, эти физиологические события объясняют возникновение микропениса, микроорхидизма, крипторхизма и гипопластической мошонки у новорожденных мальчиков с дефицитом гонадотропина.

Первичные зародышевые клетки имеют внегонадальное происхождение и мигрируют, чтобы проникнуть в гонадный гребень и агрегировать с дифференцирующимися клетками Сертоли и перитубулярными клетками с образованием семенных канатиков. Дифференцировка половых клеток, миграция и пролиферация регулируются большим количеством факторов [23, 24, 25].

Генетический контроль дифференцировки пола реализуется множеством генов, экспрессируемых как на половых, так и на аутосомных хромосомах. Так в 1990 г была установлена ключевая роль SRY-гена, экспрессируемого на длинном плече Y-хромосомы, в формировании тестикул [26, 27]. Развитие же по женскому типу осуществляется по принципу «автономной тенденции к феминизации», когда без влияния факторов, детерминирующих развитие тестикул, происходит автоматическое (пассивное) формирование женского пола. Позднее, на основании проведенных исследовательских работ, было установлено, что это утверждение не совсем верно, так как для полноценного процесса необходимо участие других генов X-хромосомы, а отсутствие влияния SRY-гена лишь дает возможность формирования из первичной гонады яичника. Также в настоящее время известным фактом является контроль процесса дифференцировки мозга генами, экспрессируемыми на аутосомах (Ген 1 опухоли Вильямса WT1, стероидогенный фактор 1 SF1, SOX9, Wnt4), поломка в которых приводит к сочетанным патологиям органов [28, 29, 30].

Гормональная регуляция развития и дальнейшего функционирования репродуктивной системы осуществляется на нескольких уровнях так называемой гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, деятельность которой в течение жизни имеет волнообразный характер и претерпевает три этапа активации и реактивации. Период активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в

середине внутриутробного периода, в раннем постнатальном периоде, сменяющийся продолжительным периодом «ювенильной паузы», завершающийся третьим этапом реактивации пубертатного периода [31, 32]. Гонадотропные гормоны начинают секретироваться в гипофизе с 8-10 недели эмбриогенеза с дальнейшим повышением их значений до 29 недели. Характер изменений концентрации гонадотропинов в крови в этот период значительно отличается. Так, значение ЛГ остается высоким на протяжении всей беременности и снижается на последних сроках. Показатель ФСГ имеет максимальное значение в середине беременности. Отмечена более высокая концентрация данного показателя у девочек. Гендерные различия обусловлены подавляющим влиянием высоких значений тестостерона крови у плода мужского пола. Так регуляторные взаимодействия периферических и центральных половых гормонов формируются к 20-й неделе беременности. Угнетение секреции половых стероидов на завершающихся сроках развития плода осуществляется на фоне влияния гормонов плаценты [33, 34].

Таким образом, в периоде внутриутробного развития впервые происходит активация ГГГ оси [31, 35]. По результатам множества исследований биологическое значение активации ГГГ оси у плода не до конца ясно, но нет сомнений в том, что данный процесс является важным в развитии внутренних и наружных половых органов у мужчин. Однако механизмы, способствующие активации данной оси, до настоящего времени изучены недостаточно и остается множество вопросов.

При рождении уровень гормонов гипофиза и яичка временно невелик, но их уровень увеличивается с первой недели жизни [36]. Гонадотропины и тестостерон остаются высокими в течение 3–6 месяцев, в то время как уровни АМГ и ингибина В сохраняются повышенными в младенчестве и детстве [37, 38, 39]. Данный период транзитной реактивации ГГГ оси новорожденных получил название «миниубертат» [31, 32]. Гормональная активность в этот период имеет клинические проявления действия тестостерона у мальчиков, такие как увеличение полового члена, по некоторым данным до 1 см за 3 месяца, и

особенности нейроповеденческого развития по мужскому типу [40]. В этот период в гонадах определяется пролиферация и созревание клеток Сертоли, изменения клеток Лейдига [41]. При этом сперматогенез не инициируется, вероятно, из-за отсутствия экспрессии рецептора андрогенов в клетках Сертоли в этот период развития [42, 43, 44, 45]. Впоследствии активность оси существенно уменьшается, однако АМГ [46, 47] и продукция ингибина В [48, 49] остается активной.

После периода «минипубертата» уровень половых стероидов низкий до наступления пубертатного возраста [39].

Таким образом, в позднем младенчестве и детстве существует физиологическое состояние с низким уровнем секреции гонадотропинов и андрогенов по сравнению с внутриутробным периодом, периодом «минипубертата», пубертатным и взрослым периодами. Однако клетки Сертоли остаются активными, что явно исключает классическую точку зрения, согласно которой детство характеризуется гипогонадным состоянием [39]. Таким образом, функцию оси гипоталамус-гипофиз-яичко можно оценить, определив базальные сывороточные уровни АМГ и ингибина В. Интересно, что в этот период жизни уровни ингибина В отражают активность клеток Сертоли даже в отсутствие половых клеток [50]. Чтобы оценить функцию клеток Лейдига, необходима стимуляция с помощью хорионического гонадотропина (ХГЧ).

Следующим периодом активации ГГГ оси является пубертат. Контролируется комплексом нейроэндокринных факторов, обеспечивающих ряд физических и психических изменений, приводящих к физической, психической и репродуктивной зрелости организма. Начало пубертата определяется способностью центральной нервной системы индуцировать синтез и импульсную секрецию гонадотропин-рилизинг гормона. Увеличение амплитуды и частоты импульса секреции гонадотропинов стимулирует пубертатное развитие гонад. ФСГ провоцирует новую волну пролиферации клеток Сертоли, а ЛГ снова вызывает появление зрелых клеток Лейдига. Концентрация тестостерона в яичке увеличивается до того, как он повышается в плазме крови [51], и провоцирует созревание клеток Сертоли, характеризующееся увеличением размера клеток,

остановкой пролиферации. Пролiferация клеток Сертоли и последующее увеличение размера клеток, вероятно, ответственны за начальное, умеренное увеличение яичек, которые характеризуют начало полового созревания у подростков мужского пола. Клинически начало полового созревания определяется объемом яичка ≥ 4 мл. Последующее увеличение размера гонад до конечного объема 15–25 мл зависит от нормального развития сперматогенеза. Семенные каналцы приобретают просвет, а их диаметр значительно увеличивается.

Секреция ингибина В увеличивается в период полового созревания. Взрослые уровни циркулирующего ингибина В достигаются уже в стадии по Таннер II у мальчиков [52], что совпадает с повышением уровня ЛГ в сыворотке крови и внутриклеточного тестостерона. После этого уровни ингибина В остаются постоянными до конца полового созревания. Ингибин В является основным негативным регулятором секреции ФСГ у взрослых мужчин.

Достижение адекватного количества сперматозоидов обусловлено сперматогенным процессом, который является нормальным как в качественном, так и в количественном отношении. Общее количество клеток Сертоли, присутствующих в яичке, оказывает непосредственное влияние на количественную выработку сперматозоидов во взрослой жизни. Поскольку пролиферация клеток Сертоли зависит от ФСГ, яички пациентов мужского пола с гипогонадотропным гипогонадизмом имеют меньше клеток Сертоли, что приводит к уменьшению количества половых клеток и объема гонад. Однако ФСГ не является абсолютно необходимым для качественного завершения сперматогенеза. Сперматозоиды продуцируются, хотя и в меньшем количестве, в отсутствие передачи сигналов ФСГ [53].

Тестостерон и адекватная экспрессия андрогеновых рецепторов в клетках Сертоли необходимы для мейоза [45]. Следует отметить, что уровень тестостерона в клетках гонад, а не в сыворотке, регулирует сперматогенез. Фактически, введение экзогенного тестостерона приводит к повышению уровня его в сыворотке крови, но не способствует достижению достаточной концентрации андрогенов в яичке [54].

В настоящее время имеют место нормативные значения возраста старта полового созревания, которые имеют широкий диапазон как у мальчиков (от 9 до 14 лет), так и у девочек (от 8 до 13 лет) [3, 16, 55, 56]. По данным различных исследований в настоящее время отмечается прогрессирующее акселерация. Изменение сроков старта пубертата установлено повсеместно в различной степени. Так, в Советском Союзе в течение 30 лет (период с 1940-1950 г. по 1970-1980 г.) средний возраст наступления менархе сместился на 1,5 года и составил 12,5 — 13,5 лет [57]. По данным европейских исследований эти изменения имеют еще более выраженную тенденцию — возраст наступления менструаций сместился на 4 года в период наблюдения с начала XIX до середины XX века. Данные изменения не являются гонадотропинзависимыми [58, 59, 60, 61, 62].

Нейроэндокринный контроль размножения у всех млекопитающих регулируется гипоталамической нейронной сетью, содержащей около 1500 нейронов, секретирующих гонадотропин-рилизинг-гормон, которые контролируют активность репродуктивной оси в течение всей жизни. Несмотря на то, что уже более 40 лет известно, что активация и реактивация ГГГ оси зависит от импульсной секреции ГнРГ функционально связанной группой нейронов, которые преимущественно расположены в медиальном и базальном ядрах гипоталамуса человека [56, 63], процессы, регулирующие секрецию этого гормона, до настоящего времени являются главной нерешенной задачей нейроэндокринологии. Эта сложная центральная нейроэндокринная регуляторная единица с одной стороны восприимчива к воздействию «отрицательной-обратной» связи от половых стероидов, однако, с другой стороны, до настоящего времени существует множество вопросов и предположений о существовании различных других физиологических регуляторов [64]. Одним из регуляторных факторов нейронов гипоталамуса, секретирующих ГнРГ, является влияние ЦНС. Изучение закономерностей полового созревания, в том числе диапазона нормативных значений возраста начала пубертата, механизмов физиологической и патологической задержки реактивации гонадной оси, остается предметом активного исследовательского интереса [12, 65]. Углубление понимания

механизмов межнейронального сигналинга, уточнение роли его участников и их взаимодействия, определяющего характер импульсной секреции ГнРГ, расшифровка информационного вклада периферических сигналов, поступающих из органов и тканей, расположенных за пределами центральной нервной системы, а также способы передачи этих сигналов, несомненно, способны расширить представления о физиологии и патологии полового развития у детей и подростков, улучшить понимание причин различий в сроках старта пубертата, и, возможно, предложить новые способы коррекции отдельных вариантов патологии [66, 67, 68].

Данные множества исследований в этой сфере показали, что старт полового созревания осуществляется под воздействием различных факторов. В последние годы выполнено большое количество научно-исследовательских работ, направленных на изучение факторов, стимулирующих или ингибирующих продукцию ГнРГ. Среди них выделяют особенности диеты, факторы внешней среды, генетические факторы, влияние лептина и грелина, секретируемых адипоцитами, эффекты инсулиноподобного фактора роста и различных нейропептидов. Ключевую роль в данных процессах в настоящее время отводят лиганд-рецепторной системе кисспептина и другим немногочисленным нейропептидам [1, 12, 66].

1.2. Лиганд-рецепторная система кисспептина - ключевой регулятор репродуктивной системы

В 2003 году впервые были получены данные об участии белка кисспептина в процессах регуляции репродуктивной системы [10, 13, 69, 70, 71]. Первоначально же кисспептин в 1996 году был открыт как ингибитор метастазов опухоли меланомы человека, новая ДНК была выделена из клеток меланомы [72]. Система кисспептина представлена геном KISS1, который локализован на 1q32 и

продуктами его транскрипционной активности: белок кисспептин и G-протеиновый рецептор (KISS1R) [73, 74].

Функционально активные молекулы кисспептина образуются путем расщепления под воздействием протеолиза их предшественника, состоящего из 154 аминокислот. При этом существуют биологически активные молекулы кисспептина с различной молекулярной массой, представленные - 54, 13, 14, 10, 8 и др. – аминокислотными остатками, наиболее активным среди них является кисспептин-54, ранее названный метастинном [3].

Рецептор KISS1R представляет собой 398-аминокислотный белок G-класса G-белков, связанный с фосфолипазой C. Имеет внеклеточный N-концевой домен, за которым следуют семь трансмембранных спиралей и заканчивается C-концевым цитоплазматическим доменом из примерно 70 остатков [70, 75]. Эта внутрицитоплазматическая C-концевая область может образовывать комплексы с белками, участвующими в передаче сигналов рецептора [75, 76]. Как следствие, сигнал KISS1R увеличивает внутриклеточные уровни Ca^{2+} , активирует кальций-зависимые сигнальные пути и активирует митоген-активируемые протеинкиназы p38, внеклеточные сигнальные киназы 1 и 2 в нейронах ГнРГ [77].

Впервые в 2001 году экспрессия гена рецептора кисспептина была выделена в плаценте человека [78], затем при дальнейшем изучении были получены данные о экспрессии мРНК KISS1-R в головном мозге, гипофизе [79], яичниках [80], яичках, тонком кишечнике и поджелудочной железе [78, 80, 81]. Нейроны кисспептина локализованы в аркуатном ядре и преоптической области у человека [82, 83], у грызунов также в дугообразном и перивентрикулярном ядрах [84, 85, 86, 87]. Опосредованно через нейрональные взаимосвязи реализуется стимуляция секреции ГнРГ нейронами гипоталамуса. Доказана представленность на большинстве ГнРГ нейронов рецептора KISS1R [88, 89, 90], который, связываясь с белком кисспептином, инициирует деполяризацию клетки и секрецию ГнРГ [70, 71, 91, 92]. Недавно, благодаря различным исследованиям генотипа человека и животных, были установлены факторы, являющиеся важнейшими элементами центрального контроля репродуктивной системы – так выявлен ряд молекул,

которые необходимы для эмбриональной миграции нейронов GnRH в гипоталамус из обонятельной плакаты (KAL1, NELF, FGFR1, PROK1, PROKR2). У человека с генетическими дефектами в этих локусах обычно отмечается развитие гипогонадотропного гипогонадизма (ГГ) в сочетании с нарушением обонятельного ощущения. Мутации же в GnRH-рецепторе, либо в KISS1R, зарегистрированные у людей с семейными формами ГГ, не сопровождались нарушением обонятельной функции [11, 93]. Так, лица, имеющие инактивирующую мутацию в гене рецептора кисспептина, демонстрируют развитие изолированного нормоосмического ГГ [10, 70, 94, 95, 96, 97], что характеризуется нарушением полового созревания и фертильности [98, 99]. Аналогичные данные были получены при создании моделей на грызунах [70, 100, 101, 102]. В других исследованиях, путем создания экспериментальной модели с делецией в гене рецептора кисспептина у мышей, были получены данные об отсутствии полового созревания, уменьшении размера гонад и уровня половых стероидов, бесплодии [103]. Эти результаты показывают, что надлежащее функционирование кисспептина и его рецепторов играет важную роль в регуляции репродуктивной системы, включая секрецию гонадотропина, старт полового созревания, овуляцию и, в конечном итоге, фертильность [70, 104, 105, 106, 107, 108]. Однако эти генетические дефекты объясняют лишь небольшое количество случаев семейного нормоосмического ГГ, предполагая существование других, пока неизвестных механизмов центрального контроля репродуктивной оси [109].

Важно отметить о существовании анатомического и полового диморфизма. Кисспептиновые нейроны, расположенные в перивентрикулярных ядрах гипоталамуса осуществляют стимулирующее действие, в то время как KISS1-нейроны, локализованные в аркуатных ядрах гипофиза оказывают ингибирующее влияние на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось [110]. Долгое время важной целью активного исследовательского интереса оставалась уникальная способность женского пола к преовуляторному выбросу гонадотропинов. Так в 2006 году команда Clarkson J. в своих экспериментальных исследованиях выявила

наличие полового диморфизма системы кисспептина, показав десятикратное преобладание концентрации нейронов кисспептина в антеровентральных перивентрикулярных и преоптических перивентрикулярных ядрах гипоталамуса женских особей крыс в отличие от мужских [111]. Затем в 2007 году Kauffman A.S. и коллеги предположили, что концентрация нейронов кисспептина в перивентрикулярном ядре гипоталамуса играет определенную роль в генерации преовуляторного всплеска ГнРГ/ЛГ, который возникает только у женщин. Так, были получены данные значительно большей концентрации mRNA KISS1 в перивентрикулярных ядрах у самок крыс, чем самцов. Интересно, что эта половая разница была организована перинатально, о чем свидетельствует наблюдение, что неонатально андрогенизированные самки крыс демонстрируют мужскую модель экспрессии KISS1 [112]. В 2010 году сопоставимые данные также были получены при изучении аутопсийного материала человека. Были отмечены значимые половые различия с меньшей представленностью нейронов кисспептина у мужчин в ростральной перивентривентрикулярной области третьего желудочка и воронки [83]. Полученные данные в дальнейшем были подтверждены и другими исследователями - количество тел кисспептиновых нейронов, плотность их волокон и частота их контактов с нейронами ГнРГ была значительно выше у женщин по сравнению с мужчинами [113]. В 2012 году были получены интересные экспериментальные данные об уменьшении количества иммунореактивных нейронов кисспептина в пределах третьего желудочка у гонадэктомированных в раннем неонатальном периоде самцов мышей, которое было восстановлено путем введения как эстрадиола, так и тестостерона [114].

На основании полученных исследовательских данных лиганд-рецепторная система кисспептина осуществляет свои биологические эффекты как непосредственно путем прямого взаимодействия с клетками, секретирующими половые стероиды [115, 116, 117, 118], так и опосредовано через различные нейропептидные вещества. Особое внимание в последние годы получили такие субстанции как нейрокинин-В и динорфин.

Так, в исследованиях Goodman R.L. было показано, что нейрокинин-В, член семейства Р-родственных тахикининов, высоко экспрессируется в гипоталамических нейронах, которые также экспрессируют кисспептин и динорфин. Были получены данные о том, что почти все кисспептиновые нейроны аркуатных ядер гипоталамуса содержали динорфин. Аналогичным образом, почти все нейроны динорфина в этих ядрах содержали кисспептин. В другом эксперименте исследователи показали, что более трех четвертей нейронов кисспептина в аркуатных ядрах также секретировали нейрокинин-В, и аналогичный процент нейронов нейрокинаина-В секретировал кисспептин. Эти данные показали, что одна субпопуляция нейронов аркуатных ядер содержит все три нейропептида [119]. На основании чего был предложен термин «KNDу-содержащие нейроны» [11, 119, 120, 121]. К настоящему времени существуют также немногочисленные данные, свидетельствующие о том, что кисспептин, нейрокинин-В и динорфин также ко-локализуются в одной субпопуляции клеток воронкообразного ядра человека [122]. Поскольку практически все эти нейроны экспрессируют рецепторы эстрогена и прогестерона, они, вероятно, передают эффекты обратной связи этих стероидов на нейроны ГнРГ для регулирования репродуктивной функции. Данные нейропептиды в настоящее время относят к наиболее значимым факторам, регулирующим процессы активации и реактивации гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Получены данные о стимулирующем влиянии Нейрокинаина-В на секрецию ГнРГ нейронами гипоталамуса. Так, мутации в гене, кодирующем нейрокинин-В, тахикинин 3 (ТАС3) или его рецептор (ТАСР3), сочетались с развитием гипогонадизма [11, 123]. Динорфин представляет собой эндогенный опиоидный пептид, который действует преимущественно через κ-опиоидный рецептор (KOR) [124]. Известно, что динорфин регулирует опосредованную прогестероном «отрицательную-обратную» связь с секрецией ГнРГ [125].

После множества открытий в данной области перед исследователями неизбежно встал вопрос понимания иерархии ролей кисспептина, нейрокинаина-В и динорфина в нейроэндокринном контроле импульсной секреции ГнРГ. И в 2010

году Young J. и его команда провели исследование, пролившее свет на данный вопрос. В ходе исследования пациентам с ГГ, возникающим в результате естественных мутаций с потерей функции в лиганде нейрокинина-В и его рецептора, вводили кисспептин. Эти пациенты характеризовались очень низким уровнем ЛГ, но нормальными или почти нормальными значениями концентрации ФСГ, что сочеталось с низкой частотой импульсов ГнРГ [126]. Напротив, инактивирующие мутации в гене рецептора кисспептина приводили к низкой концентрации как ЛГ, так и ФСГ [10, 70]. На основании чего, было предположено, что нейрокинин-В, секретлируемый из KND-нейронов, действует аутокринным или паракринным способом для усиления секреции кисспептина, и что одного только кисспептина достаточно, чтобы стимулировать импульсную секрецию ГнРГ нейронами гипоталамуса. Это предположение было доказано на основании полученных данных о восстановлении секреции ЛГ у пациентов с TAC3- и TACR3-инактивирующими мутациями после введения кисспептина. Что демонстрирует характер функциональной координации нейропептидов в пределах одной группы нейронов, и транслирует специфику иерархии кисспептина и нейрокинина-В в регуляции секреции ГнРГ нейронами гипоталамуса человека [117, 127].

Что касается динорфина, он, по данным исследований, опосредует «отрицательную-обратную» связь прогестерона и частоты импульсов секреции ГнРГ/ЛГ. Описанное выше утверждение основано на экспериментальных данных на овцах, описывающих увеличение частоты импульса ЛГ в лютеиновой фазе после введения антагониста рецептора динорфина [125]. Также были получены сопоставимые данные об увеличении экспрессии препро-DYN-мРНК в нейронах аркуатных ядер у женщин в постменопаузе [128]. Однако данные у грызунов противоречивы [2, 129, 130], возможно, из-за сокращенной лютеиновой фазы у крыс и мышей.

Таким образом, синхронное влияние KND-нейронов на нейроны ГнРГ осуществляется основными нейропептидами кисспептина в результате стимулирующего действия нейрокинина-В и ингибирующего действия

динорфина. Так каждый импульс ГнРГ инициируется начальным увеличением секреции нейрокинаина-В из нескольких KND-нейронов, что стимулирует дальнейшее их высвобождение, в конечном итоге увеличивая выброс кинспептина и резкое увеличение секреции ГнРГ в начале импульса [121]. Предполагается, что стимуляция нейрокинаина-В также активирует высвобождение динорфина, и тормозящие действия этого нейропептида на KND-нейронах начинают тормозить секрецию кинспептина и, в конечном итоге, полностью подавляют активность нейронов, заканчивая ГнРГ секреторный эпизод. Динорфин в том числе подавляет и свою собственную секрецию, что позволяет увеличить высвобождение нейрокинаина-В, которое вызывает следующий импульс ГнРГ. Таким образом, M.N. Lehman и соавторы предположили, что кинспептин управляет импульсами ГнРГ, в свою очередь нейрокинин-В является триггером, инициирующим синхронное возбуждение KND-нейронов и начало каждого импульса, а динорфин является нейропептидом, который отключает возбуждение KND-нейронов и заканчивает каждый импульс [121].

При анализе современной литературы также обращают на себя внимание данные, указывающие на действие кинспептина непосредственно на гонады. Такие выводы были сделаны на основании полученных данных о экспрессии генов, кодирующих кинспептин и его рецептор в яичниках крыс, приматов и человека [80, 131]. При этом наблюдалась цикличность экспрессии с учетом фазы менструального цикла [132]. Выше изложенные данные впоследствии были подтверждены в экспериментальных исследованиях на самках мышей [133]. Важными также являются данные о зависимости активирующего овуляторное созревание ооцитов выброса ЛГ от стимуляции кинспептина в экспериментальном исследовании на мышах [134]. Сопоставимые данные были получены при анализе данных на мужском поле. Так гены, кодирующие кинспептин и его рецептор KISS1R, экспрессируются в яичках грызунов и человека [77, 78, 135]. Имеются данные о усилении стимуляции секреции тестостерона хорионическим гонадотропином на фоне инъекции кинспептина [136] у обезьян, при этом изолированное введение кинспептина не оказывало подобного эффекта [136]. В

другом исследовании было выявлено усиление подвижности сперматозоидов на фоне введения кисспептина у мышей, что увеличивало скорость оплодотворения самок. В то же время, при введении антагонистов кисспептина был отмечен обратный эффект [137, 138]. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить о существовании периферических механизмов действия кисспептина, влияющих на различные уровни репродуктивного потенциала экспериментальных животных и человека.

В ходе проводимых исследований функции лиганд-рецепторной системы кисспептина было также выявлено преобладание периферической экспрессии кисспептина в клетках синцитиотрофобластов плаценты [34, 81, 139]. Было показано значимое увеличение концентрации уровня кисспептина в плазме крови во время беременности с прогрессирующим увеличением данных показателей с увеличением срока беременности [140, 141]. Получены данные о повышении экспрессии кисспептина при гестационном трофобластическом заболевании, что в дальнейшем может быть применимо как диагностический маркер [142]. В литературе существует множество исследований, направленных на изучение роли кисспептина при различных нарушениях беременности [34]. Так, продолжен анализ имеющихся данных роли кисспептина в развитии эклампсии [143] и задержки внутриутробного развития плода [144]. Получены данные о более низком значении кисспептина крови при наличии гестационного и сахарного диабета 1 типа и гипертонической болезни [145], по сравнению со здоровыми беременными. Имеются также данные о более низких значениях концентрации кисспептина в плазме крови у женщин с рецидивирующими выкидышами и кровотечениями на разных сроках беременности [146, 147]. На основании имеющихся данных можно предположить возможность разработки диагностического критерия уровня кисспептина плазмы крови как маркера риска прерывания беременности.

Наиболее изученной областью влияния лиганд-рецепторной системы кисспептина на репродуктивную систему является овуляторный цикл [8]. При анализе имеющихся научно-исследовательских работ складывается представление

о цикличности секреции кинспептина как у животных женского пола, так и у женщин. Так введение кинспептина в преовуляторной фазе менструального цикла стимулировало выброс ЛГ нейронами гипофиза, что не отмечалось в фолликулярной фазе [148, 149, 150]. На основании полученных данных можно сделать вывод о важной роли системы кинспептина в репродуктивной способности.

Также в эксперименте на животных описаны данные о способности кинспептина стимулировать выброс не только гонадотропных гормонов гипофиза, но и пролактина и соматотропного гормона [151, 152], которые не были подтверждены при оценке данных показателей у человека [153].

Существуют данные о том, что система кинспептина также участвует в контроле ключевых аспектов метаболического гомеостаза и веса тела [8, 9].

В настоящее время отмечается рост экспериментальных и появление немногочисленных клинических исследований, направленных на изучение влияния системы кинспептина на репродуктивную систему. Изучаются эффекты введения различных доз, схем и путей препаратов кинспептина различной молекулярной массы на периферические и центральные половые стероиды. Так введение препарата животным стимулировало секрецию ГнРГ. Parker P.A. в своем исследовании получил данные о увеличении концентрации ЛГ у бычков на фоне различных доз и схем введения препарата кинспептина 6. Были сделаны выводы о влиянии данного препарата на старт полового созревания у животных [154]. Аналогичный результат был получен в исследованиях на людях. При этом побочных эффектов проводимой терапии не отмечалось. На фоне внутривенного введения кинспептина здоровым мужчинам отмечалось увеличение концентрации половых стероидов в плазме крови [155]. При подкожном введении женщинам в период менопаузы были получены данные о стимулированном повышении ЛГ в плазме крови [148]. Аналогичные данные получены при лечении женщин с аменореей в связи с ГГ [156]. Была отмечена зависимость продолжительности эффекта от режима введения препарата. Так, прием кинспептина 2 раза в день сохранял стимулированные значения гонадотропинов в течение 2 недель, в то же

время прием 2 раза в неделю был более пролонгированный и составил 2 месяца [157]. В других исследовательских работах был описан характер импульсной секреции ЛГ после болюсного введения кисспептина-10, который характеризовался большей амплитудой в сравнении с физиологическим выбросом. Интересно также подавление следующего собственного выброса гонадотропинов [158]. Другой коллектив авторов показал значимое увеличение секреции гонадотропинов у здоровых мужчин на фоне пролонгированного внутривенного введения препарата кисспептин 10 [155]. Jayasena C.N. и соавторы в своем клиническом исследовании также получили данные о стимуляции секреции ЛГ нейронами гипофиза при введении кисспептина-54 женщинам с ГГ [159, 160]. По данным Young J. и соавторов пролонгированное введение препарата кисспептина способствовало восстановлению импульсной секреции ЛГ при установленной деактивирующей мутации гена НКВ [161]. Nabi G. и соавторы в своем исследовании вводили препарат кисспептин мальчикам на разных стадиях полового созревания и установили, что чувствительность ГнРГ нейронов к кисспептину развивается в течение более поздней стадии полового развития (Таннера V) [162]. Chan Y.M. и соавторы вводили кисспептин детям с задержкой полового созревания и оценивали уровень ЛГ. Были получены неоднородные данные - некоторые из них показали значимое повышение ЛГ, другие практически не имели ответа [163].

Таким образом, несмотря на имеющиеся разнонаправленные данные, подавляющее количество исследований свидетельствуют о ключевом значении системы кисспептина в регуляции репродуктивной системы, способного стимулировать секрецию ГнРГ более физиологично, чем рекомендуемые в настоящее время другие препараты [148, 155, 161].

1.3. Синдром позднего пубертата и гипогонадотропный гипогонадизм: патофизиология и современные технологии коррекции

Задержка полового созревания у мальчиков - это отсутствие полового созревания в возрасте старше 14 лет [5]. Полное клиническое определение гипогонадизма включает снижение функции яичек по сравнению с физиологическим для данного возраста, включая нарушение секреции гормонов клетками Лейдига (андрогены, ИПФР 3) и / или клеток Сертоли (АМГ, ингибин В) и / или нарушение сперматогенеза. Наиболее частой причиной задержки полового созревания является конституционная задержка (63%), гипогонадотропный гипогонадизм на фоне соматических заболеваний (20%), врожденный изолированный гипогонадотропный гипогонадизм (9%) и гипергонадотропный гипогонадизм (7%) [164].

Мужской гипогонадизм классифицируется по уровню нарушения работы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в первую очередь. Различают центральный (гипогонадотропный), первичный гипогонадизм и смешанный.

Центральный гипогонадизм характеризуется недостаточностью яичек вследствие центрального нарушения, которое может быть на уровне гипоталамуса или гипофиза [165]. Его называют гипогонадотропным гипогонадизмом.

Тестикулярный (или первичный) гипогонадизм относится к состоянию, при котором первоначально нарушается функция яичка. Поскольку «отрицательная-обратная» связь с осью гипоталамус-гипофиз обычно не функционирует, что приводит к повышению уровня ФСГ и ЛГ, главным образом в периоде полового созревания, это состояние называют гипергонадотропным гипогонадизмом.

Наконец, некоторые расстройства могут одновременно воздействовать как на ось гипоталамус-гипофиз, так и на яичко, и спровоцировать комбинированный гипогонадизм. При этом недостаточность яичек не является исключительно следствием дефицита гонадотропина.

Клинические последствия мужского гипогонадизма зависят от периода жизни, в котором функция яичка начинает нарушаться. Гипогонадизм,

возникающий у плода, установленный в первом триместре беременности, приводит к нарушениям полового развития с неоднозначными или женскими гениталиями из-за отсутствия достаточного уровня гормонов яичка во время критического периода дифференциации пола у мужчин [166, 167]. Дисгенезия гонад является примером полной гонадной недостаточности, тогда как аплазия / гипоплазия клеток Лейдига и стероидогенные дефекты являются диссоциированными формами гипогонадизма с ранним началом у плода. Как обсуждалось ранее, центральный гипогонадизм не может привести к неоднозначности гениталий, так как функция клеток Лейдига в первом триместре жизни плода регулируется с помощью плацентарного ХГЧ. Гипогонадизм плода - первичный, центральный или комбинированный - развивается во второй половине беременности, как правило, приводит к микропенису и крипторхизму.

Поскольку гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось остается активной в течение 3–6 месяцев после рождения [31, 167], этот период представляет собой возможность установить диагноз гипогонадизма [168]. После этого функция гипоталамического гонадотрофа у мальчика снижается, в связи с чем мужской гипогонадизм может оставаться неявным, если он не установлен в младенчестве. Врач должен подозревать это состояние и активно искать его (например, измерять сывороточный АМГ или ингибин В или тестостерон после стимуляции ХГЧ, проведение пробы с диферелином), в противном случае диагноз откладывается до наступления половой зрелости.

В пубертатном возрасте гипогонадизм характеризуется отсутствием или остановкой пубертатного развития. Из-за андрогенной недостаточности вторичные половые признаки не развиваются, пропорции тела обычно являются евнухоидными, голос остается высоким, костный возраст отстает от паспортного, а объем яичек не увеличивается, отражая отсутствие или остановку сперматогенеза.

Когда гипогонадизм устанавливается во взрослом возрасте, наиболее распространенными признаками, которые отражают дефицит андрогенов, являются снижение либидо, импотенция и олиго- или азооспермия. Другими

признаками могут быть усталость, потеря костной и мышечной массы, увеличение жировой массы и связанные с этим нарушения обмена веществ, а также нарушение когнитивных функций [169].

Врожденный дефицит гонадотропинов у младенцев мужского пола характеризуется наличием микропениса, крипторхизма и/или микроорхидизма [170, 171]. Ранний старт терапии ФСГ приводит к росту гонад, стимулируя пролиферацию клеток Сертоли, и повышению уровня АМГ и ингибина В [171].

Изолированный гипогонадотропный гипогонадизм может ассоциироваться с частичной или полной потерей обоняния и другими неврологическими нарушениями (синдром Каллмана или аносмический гипогонадотропный гипогонадизм) или с синдромальными эндокринными, метаболическими или неврологическими проявлениями [172]. Центральный гипогонадизм приводит к снижению уровня гонадотропинов и гормонов яичка у новорожденного. Первые 3–6 месяцев жизни являются критическим периодом для диагностики центрального гипогонадизма [168]. Лечение ФСГ провоцирует увеличение АМГ в сыворотке крови. Дальнейшее лечение ХГЧ запускает сперматогенез, что приводит к увеличению яичка. И наоборот, лечение экзогенным тестостероном приводит только к развитию вторичных половых признаков, не вызывая сперматогенеза [173].

Гипогонадотропный гипогонадизм следует отличать от конституциональной задержки полового созревания у мальчика с отсутствием половых признаков. Конституциональная задержка полового созревания представляет собой продление покоя гонадотрофа [14, 15]. У этих пациентов базальные уровни ФСГ, АМГ и ингибина В находятся в пределах нормального препубертатного диапазона, то есть выше, чем у пациентов мужского пола с центральным гипогонадизмом [174, 175], и положительным ответом ЛГ на стимуляционных тестах с диферелином [175].

Причинами гипогонадотропного гипогонадизма, развивающегося в постнатальном периоде может быть органическая патология центральной нервной системы (опухоли или инфильтративные поражения), хирургическая или лучевая

терапия первичных поражений может спровоцировать дисфункцию гипофиза. Травматические повреждения черепа также могут привести к нарушениям. АМГ и ингибин В обычно не подвергаются значительному влиянию. Существует также понятие функционального гипогонадотропного гипогонадизма, развивающегося на фоне других эндокринных расстройств, приема лекарственных препаратов, на фоне тяжелых соматических заболеваний (тяжелая анемия, гипопропротеинемические состояния, нервная анорексия и т. д.). Аналогичным образом, эндокринные расстройства, такие как акромегалия [176] и длительный гипотиреоз [177], могут приводить к центральному гипогонадизму. Подобные эффекты наблюдаются при избытке циркулирующих стероидов из-за потребления анаболических препаратов [166, 178].

Правильный диагноз имеет решающее значение для выбора наиболее адекватной терапии [179]. У мальчиков с конституциональной задержкой полового созревания выжидательная тактика является основной. Тем не менее, психологические расстройства пациента могут быть ослаблены краткосрочной терапией низкими дозами тестостерона, которая может вызывать развитие вторичных половых признаков [6]. После прекращения терапии пубертатное развитие продолжается, как у мальчиков с физиологическим течением. Долгосрочная терапия тестостероном является единственным вариантом у мальчиков с задержкой полового развития на фоне гипергонадотропного гипогонадизма, тогда как у пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом помимо длительного введения тестостерона, могут использоваться также гонадотропины и гонадотропин-рилизинг-гормон. Гонадотропины и ГнРГ, помимо индукции вторичных половых признаков, также могут вызывать созревание яичек и сперматогенез. Другие препараты, такие как агонисты кисспептина и нейрокинина В, в настоящее время рассматриваются в качестве новых терапевтических вариантов для лечения нарушения полового созревания [180].

Таким образом, исследования как физиологической роли, так и потенциальных диагностических и терапевтических возможностей системы кисспептина, в мире являются чрезвычайно актуальными, живо развивающимися

и имеют высокую научную и практическую значимость. Отечественные исследования в этой области чрезвычайно немногочисленны, имеются единичные публикации, касающиеся аналитических обзоров современных исследований в этом направлении, что обозначает высокую актуальность и значимость проведения исследований в данной области.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методологической основой диссертационного исследования явились принципы и правила доказательной медицины. Работа проведена в дизайне ретроспективного и проспективного экспериментально-клинического исследования. Работа состоит из клинического и экспериментального разделов. В целях получения требуемой научной информации использовались клинические, лабораторные методы, а также проводилась 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.

При проведении исследования соблюдались требования Национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» по ГОСТу Р 52379-2005, были использованы современные методы обработки информации и статистического анализа. 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 пациентов (их родителей) было получено письменное информированное согласие.

2.1. Дизайн экспериментального исследования

Материалы исследования

Исследование проведено с участием 53 особей крыс линии Wistar. Эксперимент проведен в весенне-летний период. Критериями включения были: крысы линии Wistar, мужской пол. Критериями исключения явились любые отклонения от стандартов линии Wistar (по весу, возрасту и видимые признаки), женский пол. Все экспериментальные животные были разделены на 7 групп. 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 |

При планировании исследования все экспериментальные животные были разделены на группы по стадии полового развития. В возрасте 1 месяца соответствовали допубертатной стадии, в 2-х месячном возрасте – препубертатный период, в 4-х месячном – половозрелые особи.

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. Кастрацию самцов выполняли в первые дни постнатальной жизни. Модель гипогонадотропного гипогонадизма у самцов крыс создавали путем хирургического удаления одной гонады у новорожденных крысят в возрасте 4 дней постнатальной жизни [181, 182]. Известно, что кастрация новорожденных самцов крыс в раннем постнатальном периоде (1-5 день от рождения) нарушает дифференциацию нейроэндокринной системы мозга андрогенами [183, 184]. 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 [181, 183, 185, 186]. Валидацию метода гипогонадотропного гипогонадизма проводили измерением в сыворотке крови половых гормонов: тестостерон, ЛГ и ФСГ в 2-х и 4-х месячном возрасте методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Cloud-Clone Corp. (Китай), которые соответствовали допубертатным значениям.

Данные представлены на рисунке 1.

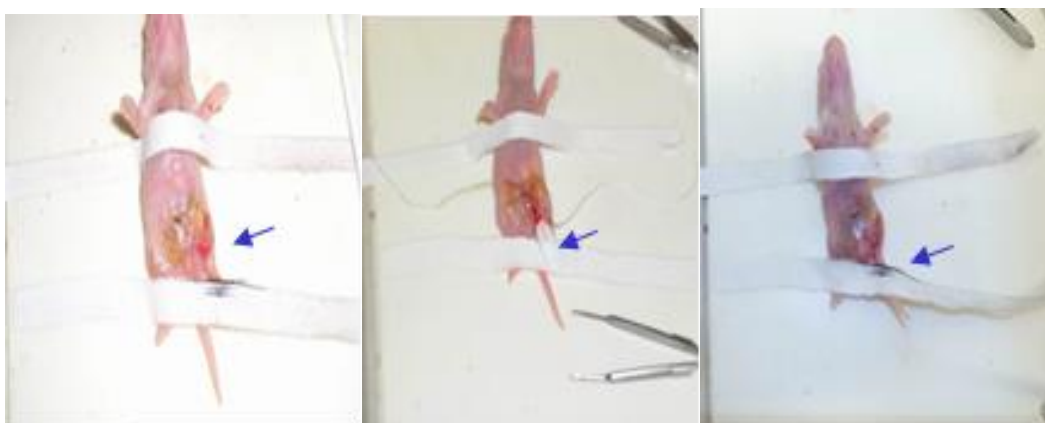


Рисунок 1 - Создание хирургической модели ГГ

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) [187, 188, 189].

После создания моделей было проведено исследование уровня тестостерона крови, который в хирургической (Me 15,39 нг/мл) и комбинированной модели (Me 9,51 нг/мл) был достоверно ниже данного показателя у здоровых половозрелых крыс (Me 20,02), $p < 0,01$ и был сопоставим с уровнем тестостерона у крыс допубертатного возраста.

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 [190].

В запланированные в соответствии с дизайном исследования сроки были забраны материалы центральных (головной мозг) и периферических (гонады, мышечная ткань, кровь) андрогензависимых тканей на разных сроках полового развития. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Экспериментальный материал и сроки забора

| | Группы | | | |
|--------------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|---|
| | Контроль | Хирургическая модель ГГ | Комбинированная модель ГГ | Хирургическая модель с лечением тестостероном |
| Возраст забора материала | | | | |
| Материал: | | | | |
| Кровь | 1, 2, 4 мес. | 2, 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. |
| Гонады | 1, 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. |
| Мышцы | 1, 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. |
| Головной мозг | 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. | 4 мес. |

Для дальнейших этапов исследования часть образцов тканей (кровь) была заморожена при температуре минус 30 градусов, часть (гонады, мышцы) была заморожена в жидком азоте при температуре минус 80 градусов, часть (головной мозг) была зафиксирована в парафине.

Методы исследования

Морфологическое исследование. Морфологическое исследование проведено на срезах области медиального аркуатного ядра (МАЯ) гипоталамуса. 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. and Watson C., 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 [191]. Оценивались площадь и форма клеток, размер и расположение ядер, характер окрашивания клеточных структур, расположение клеток, наличие их скоплений. Морфометрию проводили с помощью программы ImageScope (Russia).

Иммуногистохимический метод. В центральных андрогензависимых тканях (МАЯ гипоталамуса) иммуногистохимическим методом определяли экспрессию рецепторов KISS1R с использованием поликлональных кроличьих антител KISS1R (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации $200\mu\text{g/ml}$ и андрогеновых рецепторов (AR) с использованием мышинных антител клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации $500\mu\text{g/ml}$. Применяли вторичные биотинилированные антитела (VECTASTAIN ABC, США). После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток докрашивали гематоксилином Карацци. По середине левосторонней части МАЯ в площади $0,01$ мм² у каждой особи определяли число и долю тел нервных клеток,

различавшихся по степени экспрессии рецепторов KISS1R и к андрогенам. Срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Panoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия).

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 А.В. Дробленкова.

Метод иммуноферментного анализа. Концентрацию KISS1R в периферических андрогензависимых тканях (гонады, мышцы) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора (MBS 2021161 Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Kisspeptin Receptor (KISS1R)). Полученные данные сравнивались с приготовленными стандартами (с концентрацией 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монокроматора BioTek Synergy. Для перевода в стандартные единицы измерения (нг/мг) полученные показатели концентраций рецепторов в тканях были пересчитаны с учетом концентрации белка в этих препаратах (количество рецепторов на мг белка). Для этого методом Варбурга в супернатантах экспериментальных образцов определяли концентрацию белка на вертикальном оптическом абсорбциометре-монокроматоре BioTek Synergy 2. Концентрация белка определялась по сравнению с BSA (2,0 мг/мл) для каждого препарата.

Для проведения иммуноферментного анализа имеющиеся образцы тканей гонад и мышц прошли этапы подготовки. Ткани были подвержены гомогенизации на криогенной мельнице CryoMill-2L (Retsch, Германия) при температуре жидкого азота. Охлаждение гонад длилось 1,5 мин, мышечной ткани 2 мин. После чего гонады и мышцы в течение 3 и 4 мин соответственно были подвержены вибрационной гомогенизации с частотой 25 Гц. С учетом локализации интересующего нас G-протеин связанного рецептора KISS1R в мембранах клеток,

для его извлечения полученный гомогенат суспендировали в изотоническом фосфатном буфере, содержащем 0,5% Тритона 100. Далее гомогенаты проб подвергали вибрационному воздействию в аппарате Vortex V-1 plus BioSan в течение 2-3 секунд и оставляли на 30 мин в холодильнике. Центрифугировали в аппарате Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter, Германия) при температуре +4 градуса на 12000 оборотов в течение 15 минут. В результате выше описанных действий был получен супернатант.

Определение кисспептина в крови крыс проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора (CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1)), полученные значения сравнивали с приготовленными стандартами (с концентрацией 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

Концентрацию тестостерона в плазме крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием анализатора Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора (CSB-E05100rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat testosterone concentrations). Полученные значения также сравнивали со стандартами (с концентрацией 25,6 нг/мл, 6,4 нг/мл, 2 нг/мл, 0,5 нг/мл, 0,13 нг/мл, 0 нг/мл) на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монохроматора BioTek Synergy 2.

2.2. Дизайн клинического исследования

Материалы исследования

В исследование были включены 75 пациентов мужского пола, которые были разделены на три группы. Основную группу составили 22 соматически здоровых мальчика с отсутствием старта полового созревания - не имеющие вторичных половых признаков в возрасте старше 14 лет (объем гонад менее 4 мл и допубертатные значения ЛГ и тестостерона). Возраст в группе составил 14 - 17 лет.

Критерии включения в основную группу:

1. Мужской пол;
2. Возраст старше 14 лет;
3. Отсутствие клинических признаков старта полового созревания, в том числе 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.

Критерии исключения:

1. Гипергонадотропный гипогонадизм, гиперпролактинемия;
2. Наличие тяжелых хронических заболеваний (сердечно-сосудистой, бронхолегочной, пищеварительной, ренальной систем и др.);
3. Прием в течение последних 6 месяцев до исследования препаратов, влияющих на стероидогенез.

Группы сравнения составили 2 группы практически здоровых мальчиков с запуском пубертата в физиологические сроки. Группа 1 была представлена 25 мальчиками 14 - 18 лет в стадии полового развития по Таннер III-V; группа 2 включала 28 мальчиков 6 - 10 лет в стадии Таннер I. Данные формирования групп представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Характеристика пациентов

| | Количество пациентов n (число 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 |

Методы исследования

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 ГГГ ось, особенности течения беременности и родов. Для оценки соответствия антропометрических параметров при рождении был использован калькулятор INTERGROWTH-21st [192].

Все дети, принявшие участие в исследовании, прошли 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. Степень отклонения роста пациента от среднего роста в популяции определялась с помощью вычисления коэффициента стандартного отклонения SDS (Standart Deviation Score). Вес измерялся при помощи медицинских электронных настольных весов Масса-К, серия ВЭМ-150. Индекс массы тела (ИМТ) определялся по формуле $\text{ИМТ} = \frac{\text{вес(кг)}}{\text{Рост}^2(\text{м})}$. Оценивался в соответствии с референсными таблицами ВОЗ «WHO Reference 2007»; отклонения более 1 SD (standart deviation) от медианы (Me) оценивались, как патологические («выше среднего», «ниже среднего» и др.). Оценка полового развития проводилась при

клиническом осмотре по общепринятой методике по шкале Таннер: Таннер I - отсутствие вторичных половых признаков. Объем тестикул оценивали с использованием орхидометра.

Пациентам с задержкой полового созревания был проведен тест с аналогом ГнРГ (трипторелин депо с концентрацией 0.1 мг). При стимулированном пике ЛГ ниже 10 МЕ/л тест считался отрицательным, устанавливался диагноз гипогонадотропный гипогонадизм, выше 10 МЕ/л – синдром позднего пубертата. [193].

Иммуноферментный анализ. Концентрацию кисспептина в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa для Kisspeptin 1 (KISS1) (CEC559Hu) (Cloud-Clone Corp) методом иммуноферментного конкурентного ингибирования. Образцы венозной крови забирались в 8 часов утра в пробирки с использованием гепарина в качестве антикоагулянта и центрифугировали в течение 15 минут при $1000 \times g$ при $8^{\circ} C$ в течение 30 минут после сбора. Плазму удаляли, образцы хранили в аликвотах при $-20^{\circ} C$ для последующих измерений кисспептина. Моноклональное антитело, специфичное к кисспептину, было предварительно нанесено на микропланшет. Реакция ингибирования запускалась между меченым биотином кисспептина и немеченым (стандарты или образцы) с антителом с предварительно нанесенным специфичным для кисспептина покрытием. После инкубации несвязанный конъюгат смывался. Затем в каждую лунку микроплшета добавляли авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), и инкубировали. Количество связанного конъюгата HRP было обратно пропорционально концентрации кисспептина в образце. После добавления раствора субстрата интенсивность проявленного цвета была обратно пропорциональна концентрации кисспептина в образце. Сравнение интенсивности цвета проводили со стандартными концентрациями, установленными в 5 точках разбавленного стандарта, равного 2000 пг/мл, 666,67 пг/мл, 222,22 пг/мл, 74,07 пг/мл, 24,69 пг/мл и стандартного разбавителя (0 пг/мл). Минимальная определяемая доза кисспептина составляла

менее 9,27 пг/мл. Этот анализ обладает высокой чувствительностью и специфичностью для выявления кисспептина.

Хемилюминисцентный метод. Определение уровня ЛГ, ФСГ и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминисцентным методом на анализаторе "Cobas E 411" (Roche, Швейцария).

Методы статистического анализа данных

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) [33].

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R В РЕГУЛЯЦИИ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ САМЦОВ КРЫС. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование включало анализ системы кисспептина в периферических и центральных андрогензависимых тканях. В периферических тканях проводилось определение кисспептина и тестостерона в крови, а также концентрации рецепторов KISS1R в гонадах и мышечной ткани. В центральных андрогензависимых тканях выполнялось гистоморфологическое исследование МЯГ гипоталамуса и определение экспрессии рецепторов KISS1R и андрогеновых рецепторов иммуногистохимическим методом у интактных и гипогонадных самцов крыс в разных возрастных группах, в том числе на фоне терапии тестостероном.

3.1 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

Был определен уровень тестостерона плазмы крови интактных у крыс в различные возрастные периоды и стадии полового созревания и у крыс с гипогонадизмом. Полученные данные были проанализированы, сделаны заключения. Абсолютные значения концентрации тестостерона в плазме крови самцов крыс различных групп представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Абсолютные значения концентрации тестостерона в плазме крови самцов крыс различных групп (нг/мл)

| Группы | Концентрация тестостерона в плазме (нг/мл) | | | | | | | | | Me (нг/мл) | W ¹ - критерий |
|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|------------------------------|
| | | | | | | | | | | | |
| Контроль 1 мес. (n=8) | 11,2 | 10,8 | 3,14 | 2,55 | 0 | 0,37 | 8,43 | 11,4 | 5,99 | 21,68 ² 2,86 ³ 18,98 ⁴ | |
| Контроль 2 мес. (n=8) | 14,02 | 12,56 | 8,22 | 12,7 | 16,17 | 17,73 | 16,91 | 16 | 14,29 | 0,69 ⁵ 3,09 ⁶ | |
| Хирургическая модель 2 мес. (n=7) | 10,17 | 11,92 | 16,03 | 18,25 | 13,88 | 8,94 | 15,03 | | 13,46 | 3,24 ⁷ 2,84 ⁸ | |
| Контроль 4 мес. (n=6) | 17,94 | 20,19 | 17,96 | 20,7 | 21,05 | 22,27 | | | 20,02 | 3,12 ⁹ | |
| Хирургическая модель 4 мес. (n=7) | 15,61 | 14,21 | 13,96 | 14,22 | 14,6 | 17,96 | 17,19 | | 15,39 | | |
| Комбинированная модель 4 мес. (n=8) | 11,3 | 10,78 | 11,21 | 10,14 | 5,95 | 5,96 | 7,77 | 12,89 | 9,51 | | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n=8) | 21,19 | 26,43 | 26,33 | 25,84 | 26,35 | 26,25 | 26,25 | 26,44 | 26,26 | | |

Примечание:

1. критерий Уилкоксона;

2. сравнение «контроль 4 мес. – контроль 1 мес.» ($p < 0,01$);

3. сравнение «контроль 4 мес. - хирургическая модель 4 мес.» ($p < 0,01$);

4. сравнение «хирургическая модель 4 мес. – контроль 1 мес.» ($p < 0,01$);

5. сравнение «хирургическая модель 4 мес. – контроль 2 мес.» ($p > 0,05$);

6. сравнение «комбинированная модель 4 мес. – контроль 4 мес.» ($p < 0,01$);

7. сравнение «комбинированная модель 4 мес. - хирургическая модель 4 мес.» ($p < 0,01$);

8. сравнение «контроль 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p < 0,01$);

9. сравнение «контроль 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p < 0,01$).

При анализе уровня тестостерона крови различных возрастных групп интактных животных с учетом стадий полового созревания были получены данные о закономерном увеличении уровня данного показателя при прогрессировании степени полового развития. Так допубертатные интактные особи имели низкие значения плазменного уровня тестостерона, медиана которого составила 5,99 нг/мл. В возрасте препубертата (2 мес) отмечалось повышение в 2 раза и достигало значений Ме 14,29 нг/мл. Максимальный показатель отмечался у половозрелых особей 4 мес (Ме – 20,02 нг/мл), что было значимо выше при сравнении как с допубертатными, так и с препубертатными особями ($p < 0,01$). Данные представлены на рисунке 2.

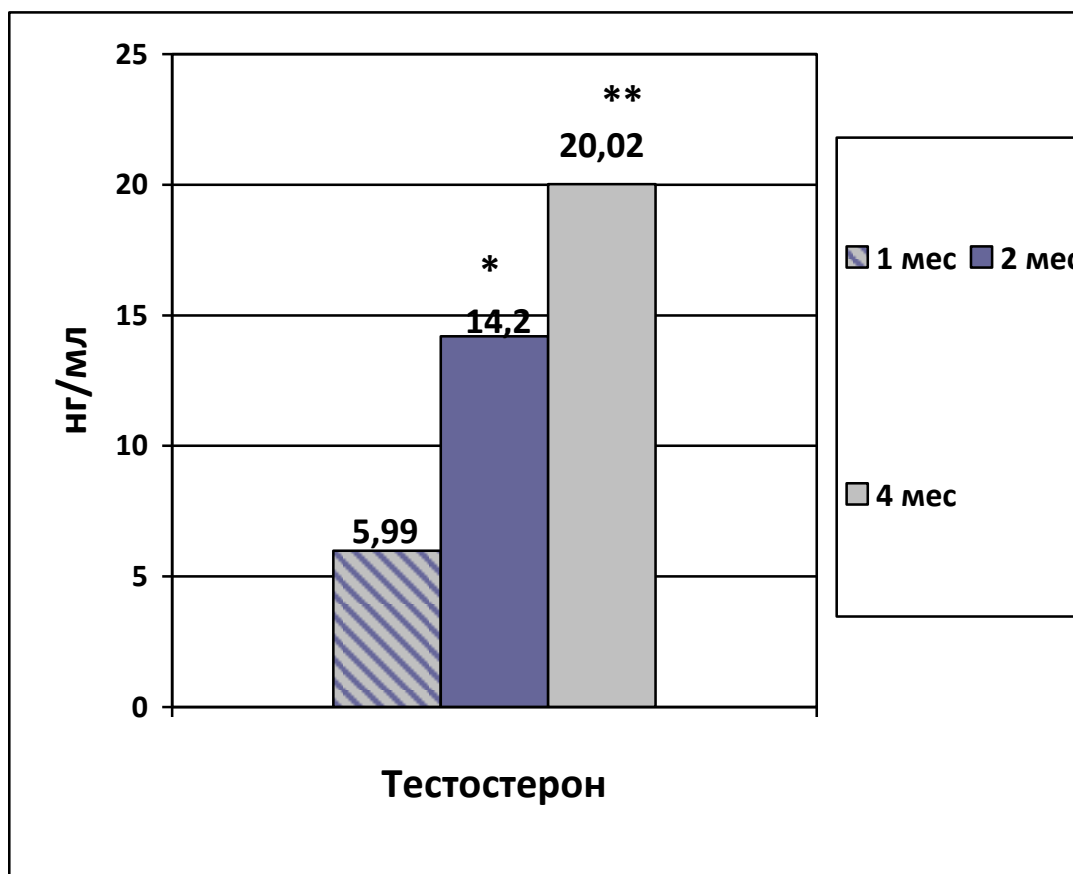


Рисунок 2 - Сравнительный анализ концентрации тестостерона плазмы крови здоровых крыс различных возрастов (нг/мл)

Примечание к рисунку 2:

*- сравнение группа контроля 1 мес.-группа контроля 2 мес. ($p < 0,01$);

** - сравнение группа контроля 1 мес. – группа контроля 4 мес. ($p < 0,01$).

Таким образом, был сделан вывод о закономерном повышении уровня тестостерона плазмы крови у здоровых самцов крыс при прогрессировании полового созревания, достигая максимального значения в возрасте 4 мес.

Для оценки системы кисспептина был определен уровень кисспептина плазмы крови интактных и гипогонадных крыс в различные возрастные периоды и стадии полового созревания. Абсолютные значения концентрации кисспептина в плазме крови самцов крыс различных групп представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Абсолютные значения концентрации кисспептина в плазме крови самцов крыс различных групп (нг/мл)

| Группы | Концентрация кисспептина в плазме (нг/мл) | | | | | | | | Ме (нг/мл) | W ¹ -критерий |
|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------------|--|
| | | | | | | | | | | |
| Контроль 1 мес. (n=6) | 0,42 | 0,26 | 0,45 | 0,22 | 0,29 | 0,37 | | | 0,33 | 0,96 ² |
| Контроль 2 мес. (n=7) | 0,29 | 0,41 | 0,32 | 0,42 | 0,37 | 0,06 | 0,14 | | 0,29 | 0,14 ³ |
| Хирургическая модель 2 мес. (n=5) | 0,32 | 0,24 | 0,18 | 0,25 | 0,25 | | | | 0,25 | 0,43 ⁴ 1,29 ⁵ |
| Контроль 4 мес. (n=6) | 0,37 | 0,23 | 0,18 | 0,14 | 0,22 | 0,46 | | | 0,26 | 0,89 ⁶ |
| Хирургическая модель 4 мес. (n=7) | 0,37 | 0,13 | 0,16 | 0,43 | 0,36 | 0,21 | 0,2 | | 0,27 | 1,29 ⁷ |
| Комбинированная модель 4 мес. (n=8) | 0,23 | 0,19 | 0,43 | 0,31 | 0,46 | 0,39 | 0,39 | 0,74 | 0,39 | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном(n=5) | 0,23 | 0,31 | 0,3 | 0,34 | 1,16 | | | | 0,47 | |
| Примечание: | | | | | | | | | | |
| 1. критерий Уилкоксона; | | | | | | | | | | |
| 2. сравнение «контроль 4 мес. – контроль 1 мес.» (p>0,05); | | | | | | | | | | |
| 3. сравнение «контроль 4 мес. – контроль 2 мес.» (p>0,05); | | | | | | | | | | |

Продолжение таблицы 5

- 4.сравнение «контроль 4 мес. - хирургическая модель 4 мес.» ($p>0,05$);
- 5.сравнение «комбинированная модель 4 мес. – контроль 4 мес.» ($p>0,05$);
- 6.сравнение «хирургическая модель 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p>0,05$);
- 7.сравнение «контроль 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p>0,05$).

Уровень кисспептина в плазме крови здоровых интактных животных не имел статистически значимых отличий в различных возрастных группах. Так Me в 1 мес составила 0,33 нг/мл, в 2 мес – 0,29 нг/мл и 0,26 нг/мл в половозрелом возрасте ($p>0,05$). Данные представлены на рисунке 3.

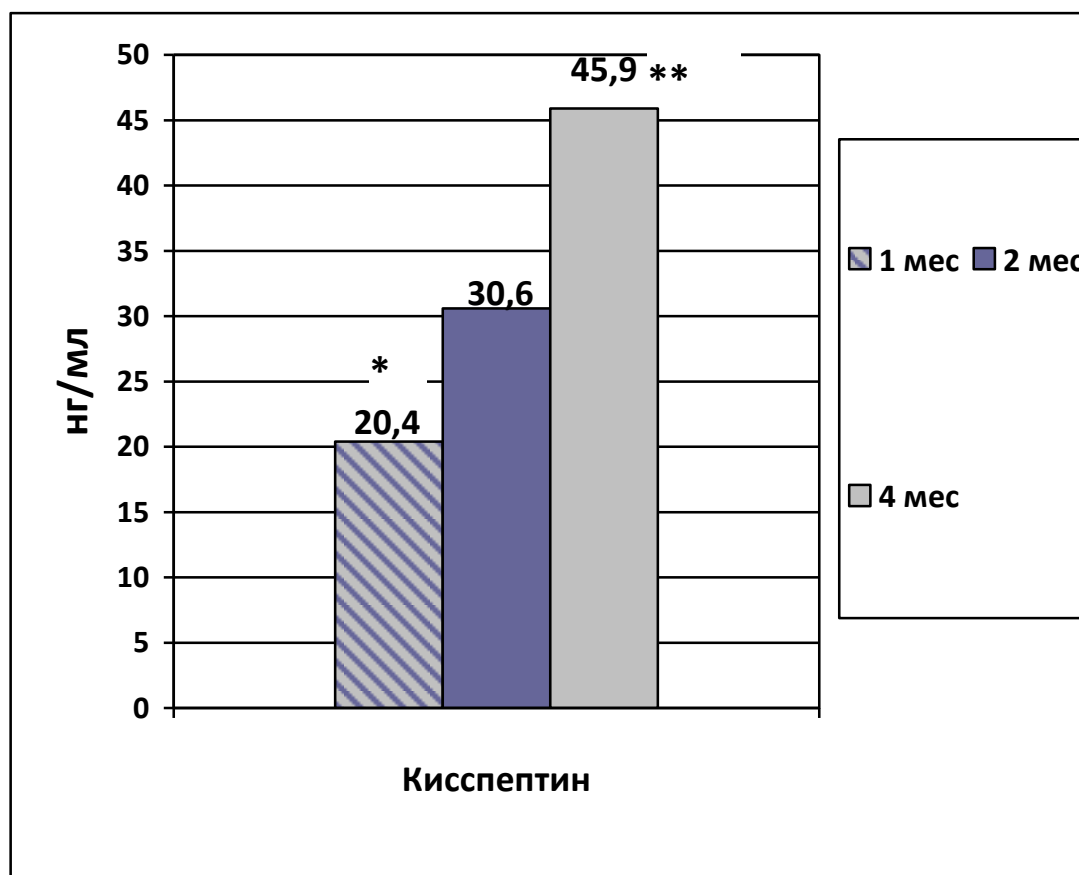


Рисунок 3 - Сравнительный анализ концентрации кисспептина плазмы крови здоровых крыс различных возрастов (нг/мл)

Примечание к рисунку 3: * сравнение группы контроля 4 мес. с группой контроля 1 мес. ($p > 0,05$); ** сравнение группы контроля 4 мес. с группой контроля 2 мес. ($p > 0,05$).

Таким образом, сделано заключение об отсутствии значимых различий уровня кисспептина плазмы крови здоровых животных в зависимости от возраста и стадии полового созревания.

Была определена концентрация KISS1R в гонадах и мышцах интактных крыс и крыс экспериментальной модели гипогонадизма в различные возрастные периоды и стадии полового созревания. Полученные данные были проанализированы, сделаны заключения. Абсолютные значения концентрации KISS1R в гонадах различных групп представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Абсолютные значения концентрации рецептора кисспептина KISS1R в гонадах самцов крыс различных групп (нг/мл)

| Группы | Концентрация рецепторов к кисспептину (нг/мг белка) | | | | | | | | Ме (нг/мг белка) | W ¹ -критерий |
|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------------------|--|
| Контроль 1 мес. (n=6) | 0,73 | 0,84 | 0,53 | 0,7 | 0,89 | 1,89 | | | 0,92 | 2,05 ² 2,68 ³ |
| Контроль 4 мес. (n=5) | 1,24 | 1,17 | 0,92 | 1,23 | 1,15 | | | | 1,13 | 1,83 ⁴ 0,69 ⁵ |
| Хирургическая модель 4 мес. (n=8) | 0,85 | 0,81 | 0,8 | 0,7 | 0,81 | 0,86 | 1,3 | 0,94 | 0,88 | 0,52 ⁶ |
| Комбинированная модель 4 мес. (n=7) | 0,89 | 1,23 | 0,94 | 0,83 | 0,72 | 0,76 | 0,89 | | 0,86 | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n=7) | 0,71 | 0,62 | 0,73 | 0,98 | 0,9 | 0,87 | 0,76 | | 0,79 | |

Примечание:

1. критерий Уилкоксона ($p < 0,05$);

2. сравнение «контроль 4 мес. - хирургическая модель 4 мес.» ($p < 0,01$);

3. сравнение «контроль 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p > 0,05$);

4. сравнение «контроль 4 мес. — контроль 1 мес.» ($p > 0,05$);

5. сравнение «хирургическая модель 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» ($p > 0,05$);

6. сравнение «хирургическая модель 4 мес. — контроль 1 мес.» ($p > 0,05$).

Абсолютные значения концентрации KISS1R в мышцах различных групп представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Абсолютные значения концентрации рецептора кисспептина KISS1R в мышцах самцов крыс различных групп (нг/мл)

| Группы | Концентрация рецепторов к кисспептину (нг/мг белка) | | | | | | | | Ме (нг/мг белка) | W ¹ -критерий |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------------------|--|
| | | | | | | | | | | |
| Контроль 1 мес. (n=6) | 0,19 | 0,16 | 0,1 | 0,07 | 0,1 | 0,12 | | | 0,12 | 1,28 ² 0,29 ³ |
| Контроль 4 мес. (n=5) | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,1 | 0,12 | | | | 0,11 | 0 ⁴ 2,84 ⁵ |
| Хирургическая модель 4 мес. (n=6) | 0,04 | 0,19 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,1 | | | 0,1 | 0,18 ⁶ 0,18 ⁷ |
| Комбинированная модель 4 мес. (n=7) | 0,04 | 0,02 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,09 | 0,07 | | 0,06 | |
| Хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном (n=8) | 0,08 | 0,19 | 0,12 | 0,08 | 0,13 | 0,07 | 0,11 | 0,06 | 0,11 | |
| Примечание: | | | | | | | | | | |
| 1. W-критерий — критерий Уилкоксона (p>0,05); | | | | | | | | | | |
| 2. сравнение «контроль 4 мес. - хирургическая модель 4 мес.» (p>0,05); | | | | | | | | | | |
| 3. сравнение «контроль 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» (p>0,05); | | | | | | | | | | |
| 4. сравнение «хирургическая модель 4 мес. – хирургическая модель 4 мес. с лечением тестостероном» (p<0,01); | | | | | | | | | | |

Продолжение таблицы 7.

- 5.сравнение «контроль 4 мес. - комбинированная модель 4 мес.» ($p>0,05$);
 6.сравнение «хирургическая модель 4 мес. - комбинированная модель 4 мес.» ($p>0,05$);
 7.сравнение «контроль 4 мес. — контроль 1 мес.» ($p>0,05$).

При анализе полученных данных количественных характеристик кисспептиновых рецепторов KISS1R в гонадах в группе интактных животных было отмечено их увеличение в зависимости от возраста. Так, изменения в тестикулах от возраста допубертата (1 мес) к возрасту половой зрелости (4 мес) составили 0,92 нг/мг против 1,13 нг/мг 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 и 0,11 нг/мг, $p>0,05$). Данные представлены на рисунке 4.

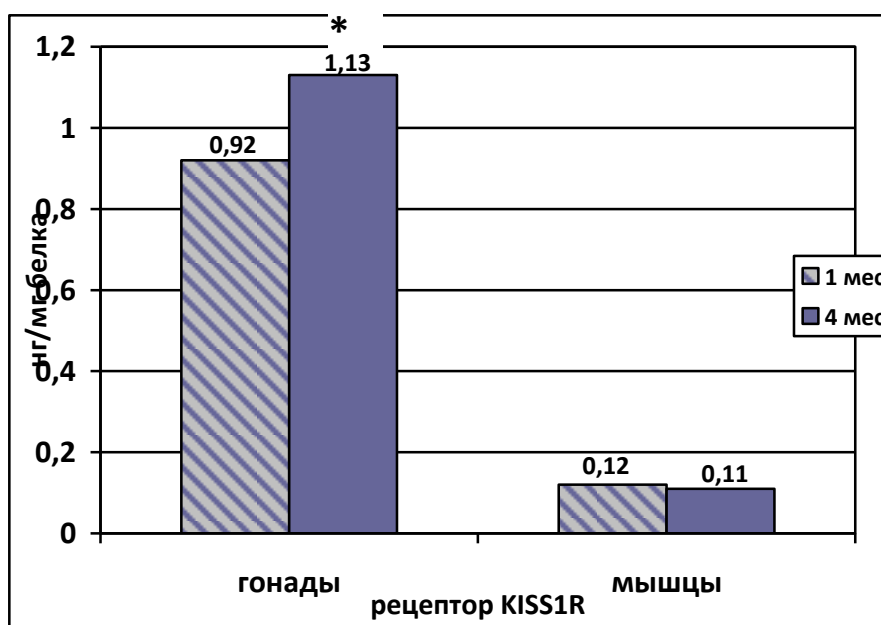


Рисунок 4 - Сравнительный анализ концентрации KISS1R в гонадах и мышечной ткани различных возрастных групп здоровых самцов крыс (нг/мг белка)

Примечания к рисунку 4:

* сравнение концентрации KISS1R в гонадах в группе контроля 1 мес. и 4 мес. ($p<0,01$).

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 концентрации 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 гипогонадотропный гипогонадизм приводил к снижению уровня тестостерона крови у половозрелых особей до препубертатных значений (в хирургической модели $Me\ 15,39$ нг/мл, в комбинированной модели $Me\ 9,51$ нг/мл), статистически значимо отличавшихся от тестостеронемии в группе интактных животных соответствующего возраста ($Me\ 20,02$ нг/мл), $p < 0,01$. Данные представлены на рисунке 5.

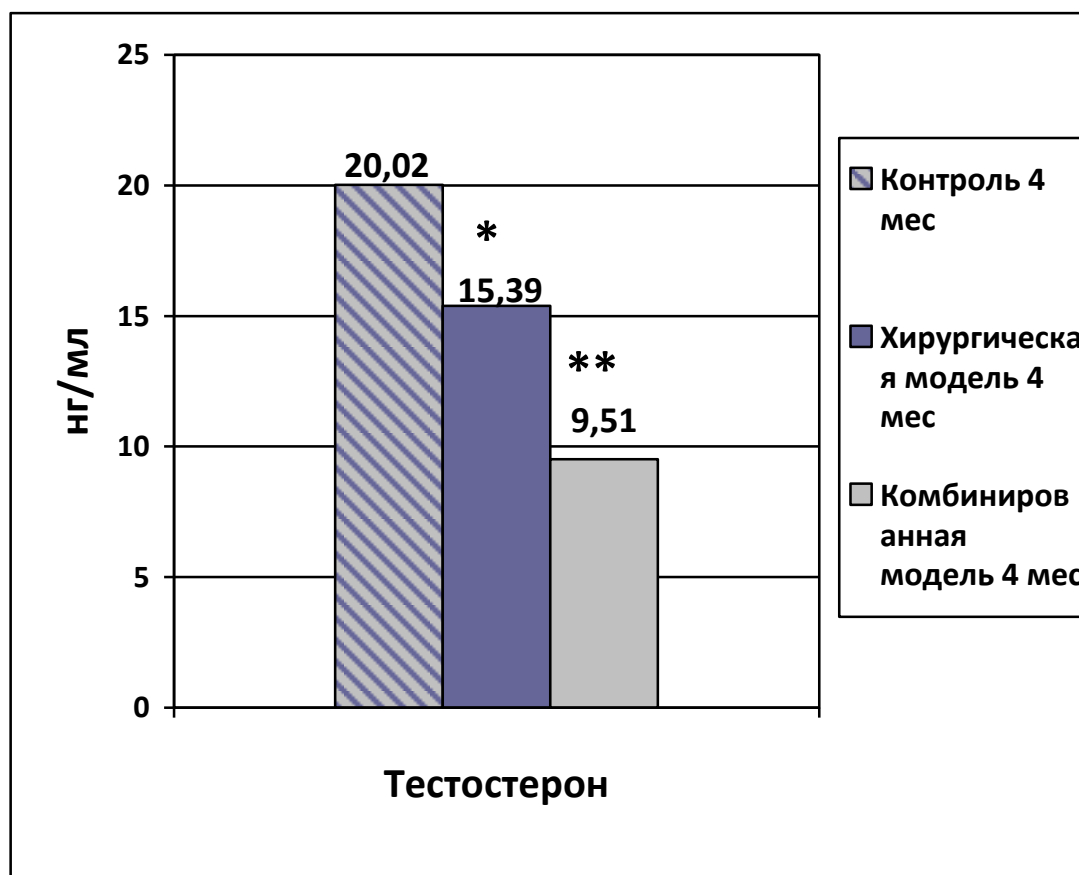


Рисунок 5 - Сравнительный анализ уровня тестостерона крови на модели гипогонадотропного гипогонадизма и здоровых половозрелых особей (нг/мл)

Примечание к рисунку 5:

*- сравнение контроль 4 мес.- хирургическая модель 4 мес. ($p < 0,01$);

** - сравнение контроль 4 мес. –комбинированная модель 4 мес. ($p < 0,01$).

Таким образом, получены данные о снижении уровня тестостерона при моделировании гипогонадотропного гипогонадизма при сравнении со здоровыми особями того же возраста, до значений препубертатных крыс.

Концентрация рецепторов KISS1R в гонадах в экспериментальных группах гипогонадотропного гипогонадизма была значимо ниже, чем у половозрелых интактных крыс (Ме соответственно 0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, $p < 0,05$). Полученные данные о плотности рецепторов KISS1R в модели гипогонадизма (4 мес) соответствовали показателям группы контроля допубертатного возраста (1 мес) (Ме 0,88 нг/мг против 0,92 нг/мг, $p > 0,05$). Данные представлены на рисунке 6.

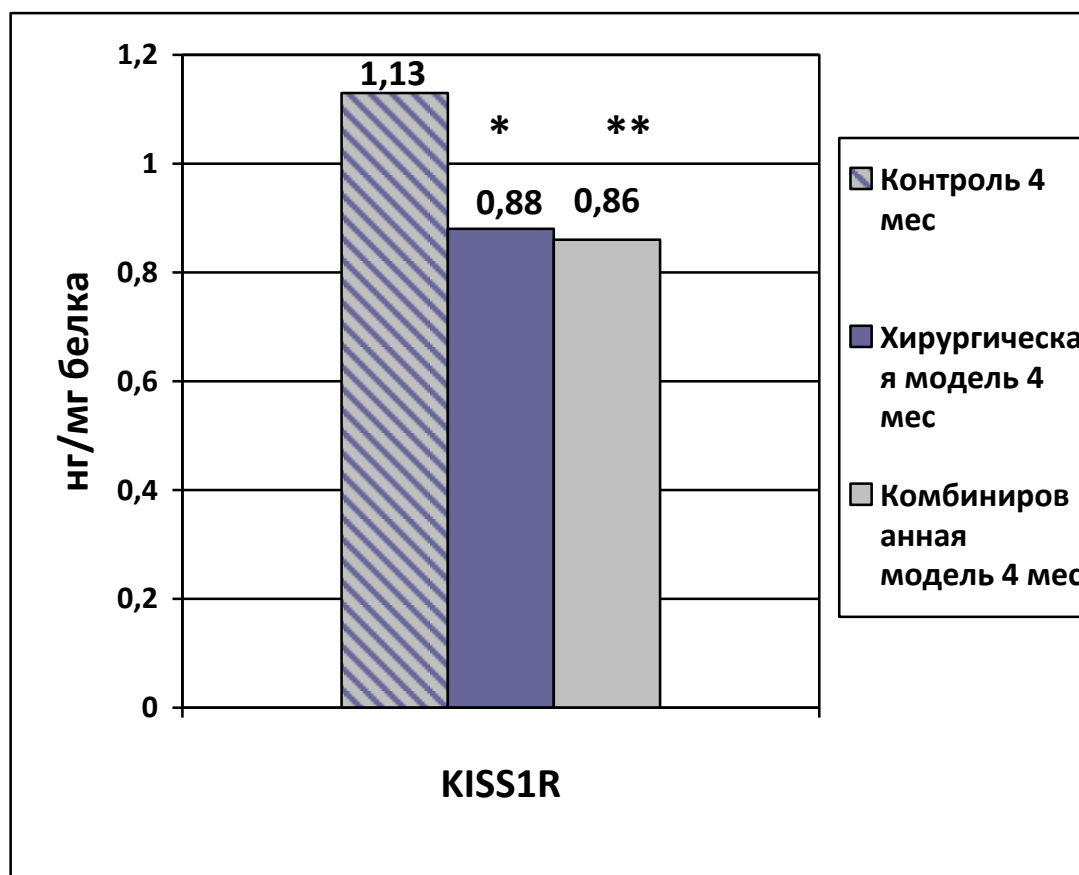


Рисунок 6 - Сравнительный анализ KISS1R в гонадах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля 4 мес (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 6:

*- 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 (Me 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 (Me 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно, $p < 0,01$), так и при сопоставлении с хирургической моделью в 4 месяца (Me 0,06 нг/мг и 0,1 нг/мг, $p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 7.

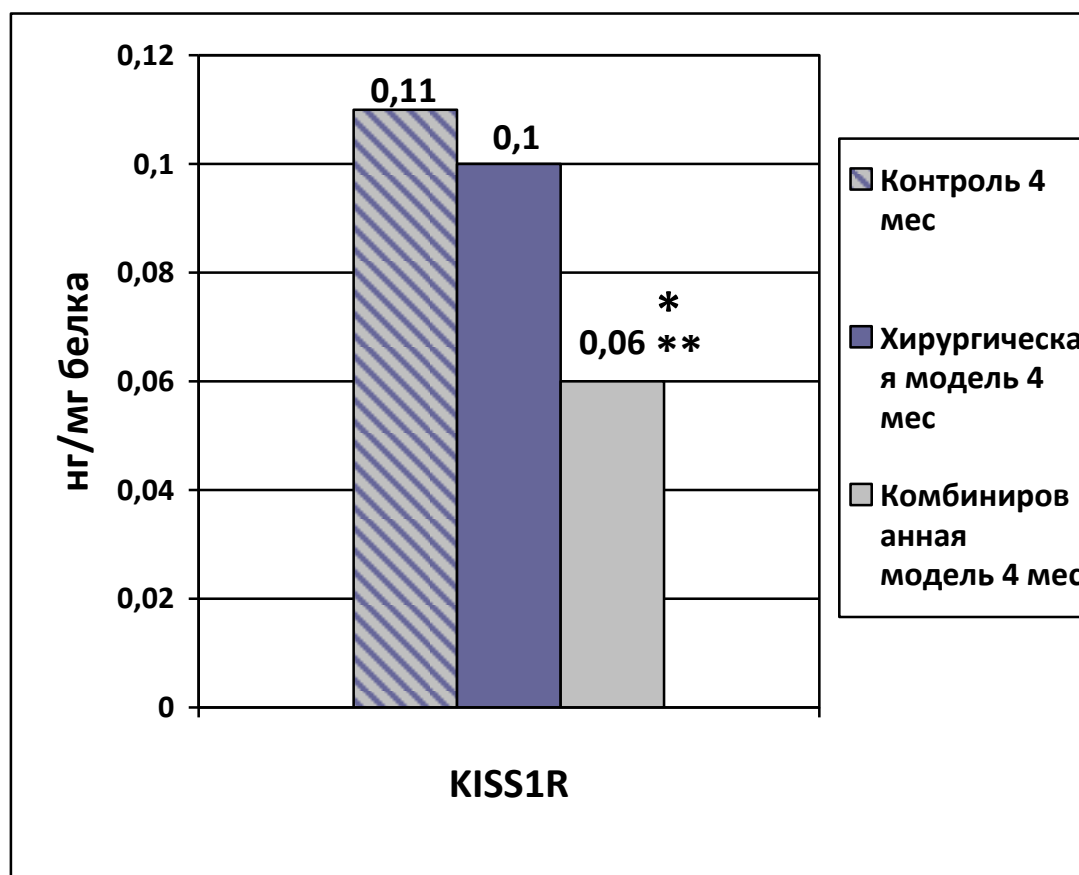


Рисунок 7 - Сравнительный анализ KISS1R в мышцах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля 4 мес (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 7:

*- 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.

Проведенный корреляционный анализ уровня кисспептина и тестостерона плазмы крови в контрольных группах на разных стадиях полового созревания установил сильную обратную зависимость этих показателей ($r = -0,99$, $p < 0,01$). Повышение уровня плазменного тестостерона коррелировало со снижением кисспептина крови. В группах гипогонадотропного гипогонадизма данный вид корреляции сохранялся при анализе показателей хирургической модели пре- и

пубертатного возраста и комбинированной модели 4 месяцев ($r = -0,86$, $p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 8.

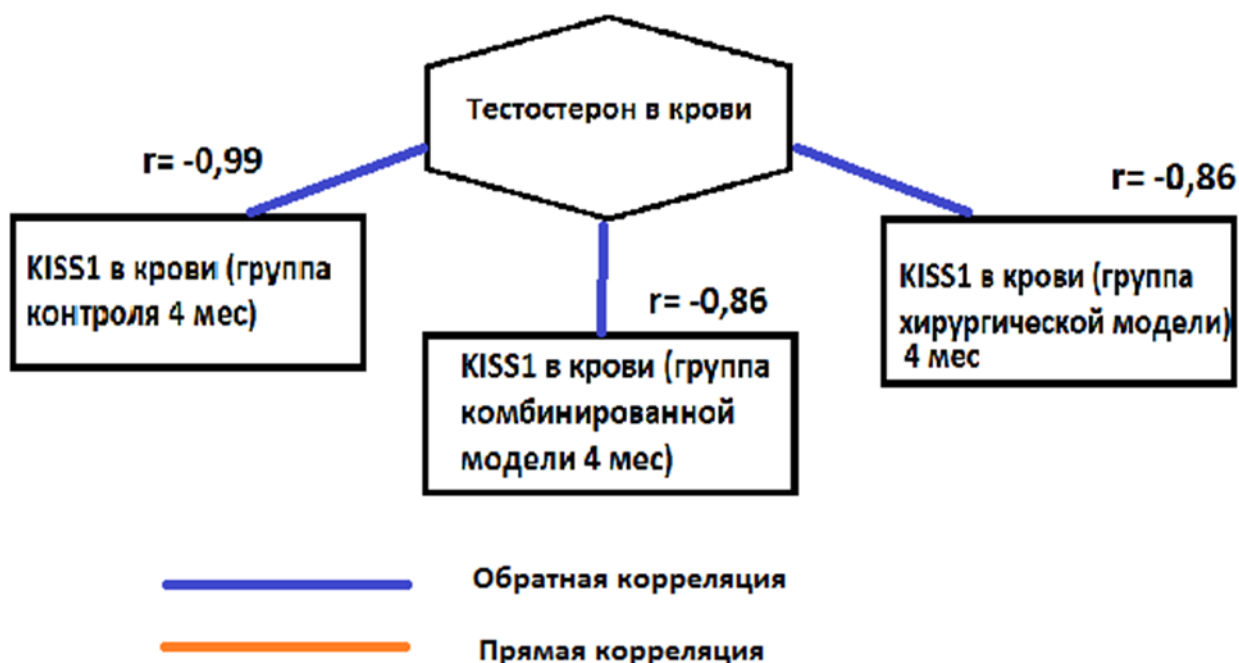


Рисунок 8 - Корреляционный анализ уровня тестостерона и кисспептина плазмы крови самцов крыс опытных групп

Таким образом, сделано заключение о разнонаправленном содержании кисспептина и тестостерона в крови, независимо от их количественного уровня, что подтверждает их регуляцию по принципу обратной связи.

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 (Ме 26,26 нг/мл против Ме 20,02 нг/мл в контроле, $p < 0,01$). Таким образом, терапия тестостероном гипогонадотропного гипогонадизма в использованной схеме приводила к превышению физиологического уровня тестостерона. Данные представлены на рисунке 9.

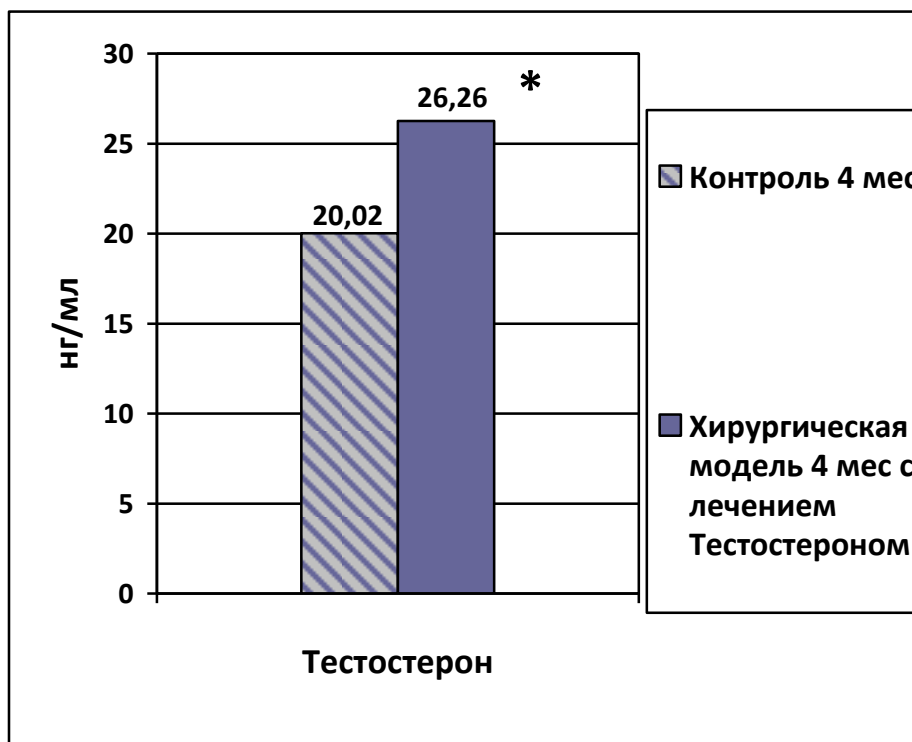


Рисунок 9 - Анализ изменения уровня тестостерона крови на фоне введения препарата тестостерона у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом 4 мес (нг/мл)

Примечание к рисунку 9: * сравнение контроль 4 мес. –хирургическая модель 4 мес. с лечением Тестостероном ($p < 0,01$).

На фоне восстановления тестостеронемии проведена оценка изменений концентрации кисспептиновых рецепторов KISS1R в андрогензависимых тканях. Введение препарата эфира тестостерона не повлияло на плотность KISS1R в гонадах, показатель оставался достоверно ниже при сравнении с группой интактных крыс соответствующего возраста (Ме соответственно 0,79 нг/мг белка и 1,13 нг/мг белка $p < 0,01$). При сопоставлении данного показателя в экспериментальной группе гипогонадизма в возрасте 4 мес до и после терапии

тестостероном, также не было получено статистически значимых различий (Ме соответственно 0,88 нг/мг белка и 0,79 нг/мг белка, $p>0,05$). Данные представлены на рисунке 10.

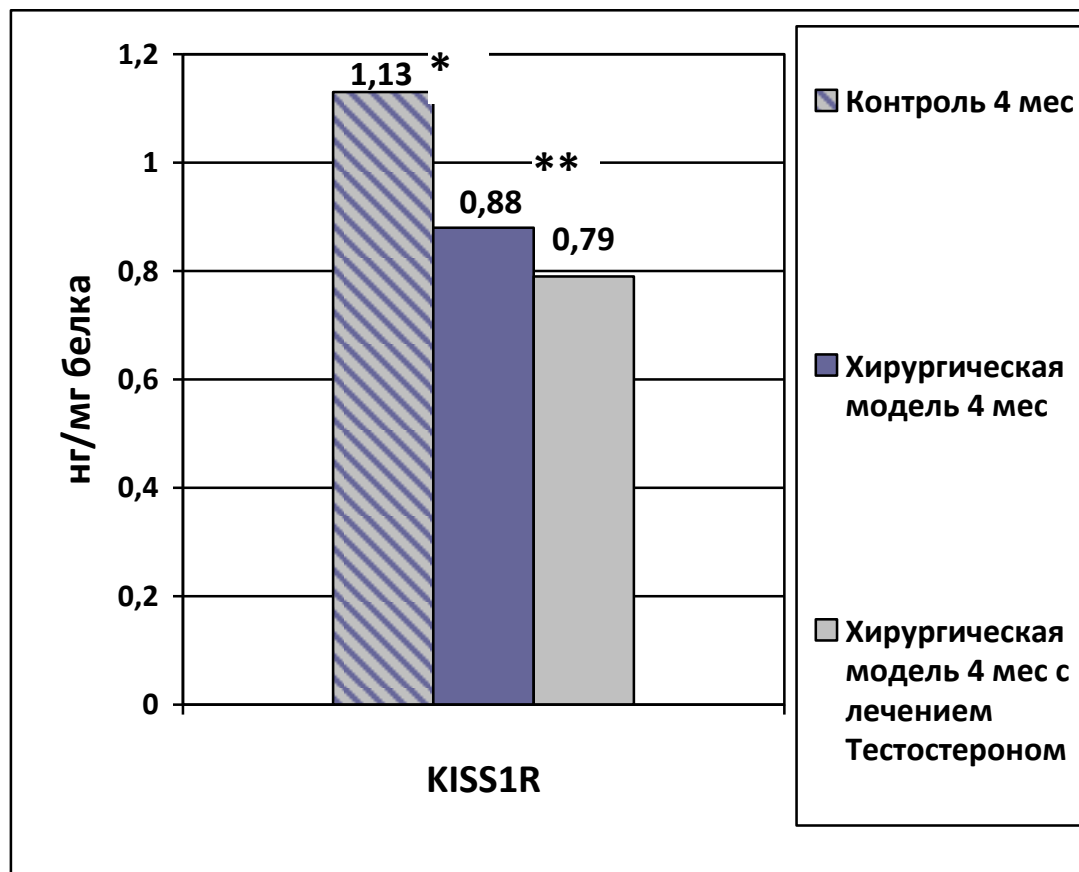


Рисунок 10 - Динамика концентрации KISS1R в гонадах самцов крыс на фоне терапии препаратом тестостерона (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 10:

*Сравнение группы лечения тестостероном 4 мес. с группой контроля 4 мес. ($p<0,01$);

**Сравнение группы лечения тестостероном 4 мес. с группой хирургической модели гипогонадизма 4 мес. ($p>0,05$).

Терапия препаратом тестостерона не приводила к изменению концентрации KISS1R в скелетных мышцах, так данный показатель не отличался в группе экспериментальной модели гипогонадизма в половозрелом возрасте и группе с лечением тестостероном (Ме соответственно 0,1 нг/мг белка и 0,11 нг/мг белка, $p>0,05$). Данные представлены на рисунке 11.

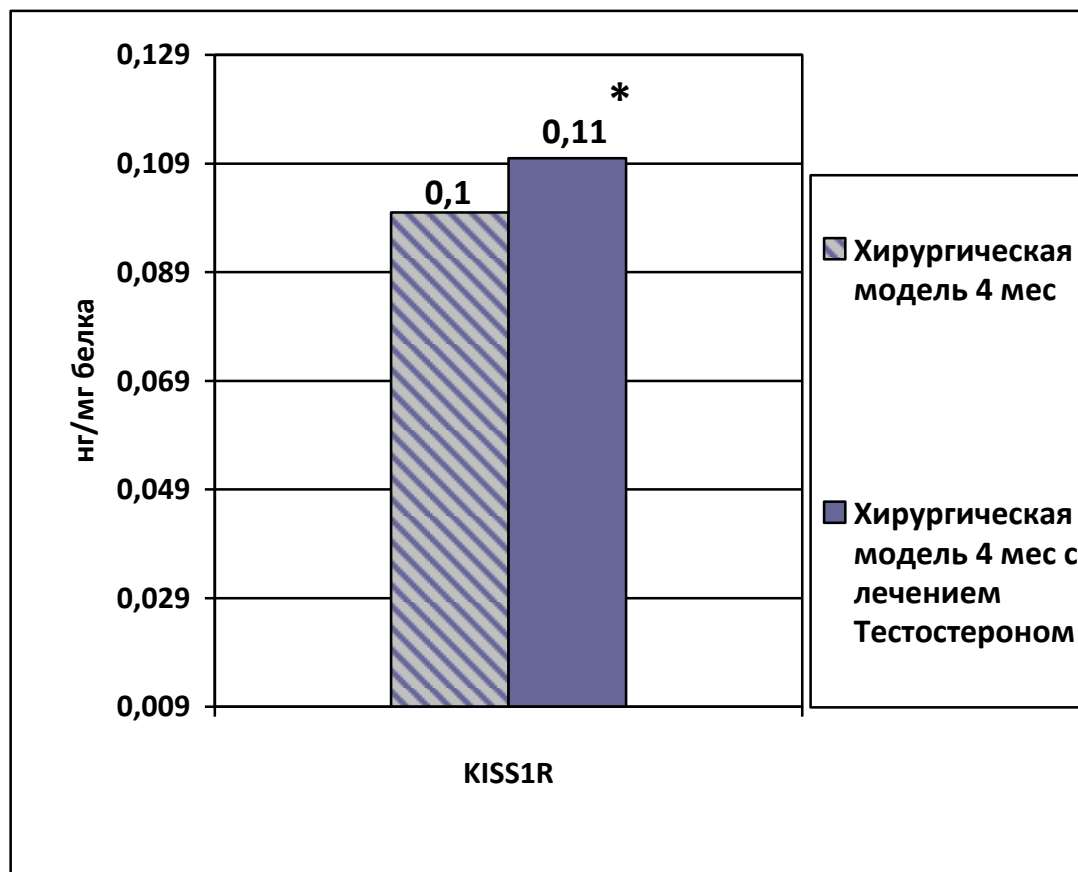


Рисунок 11 - Динамика концентрации KISS1R в мышцах самцов крыс на фоне терапии препаратом тестостерона (нг/мг белка)

Примечание к рисунку 11:

*Сравнение группы лечения тестостероном 4 мес. с группой хирургической модели 4 мес. ($p > 0,05$).

Таким образом, плотность рецепторов KISS1R в периферических андрогензависимых тканях экспериментальных животных в физиологических условиях возрастает при прогрессировании полового созревания. При моделировании гипогонадотропного гипогонадизма концентрация KISS1R снижается и соответствует таковой у интактных крыс 1 месяца. Введение заместительной гормональной терапии препаратом тестостерона с восстановлением данного показателя в плазме крови не изменяет концентрацию KISS1R.

На основании полученных данных сделано общее заключение, что терапия тестостероном не восстанавливала регуляторные взаимоотношения на уровне периферических андрогензависимых тканей, обеспечиваемых рецепторами кисспептина KISS1R, 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.

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

Для изучения кисспептиновой регуляции полового созревания важным является оценка морфологической и функциональной характеристик кисспептиновых нейронов. Данные нейроны располагаются преимущественно в медиальном аркуатном ядре гипоталамуса (рисунок 12).

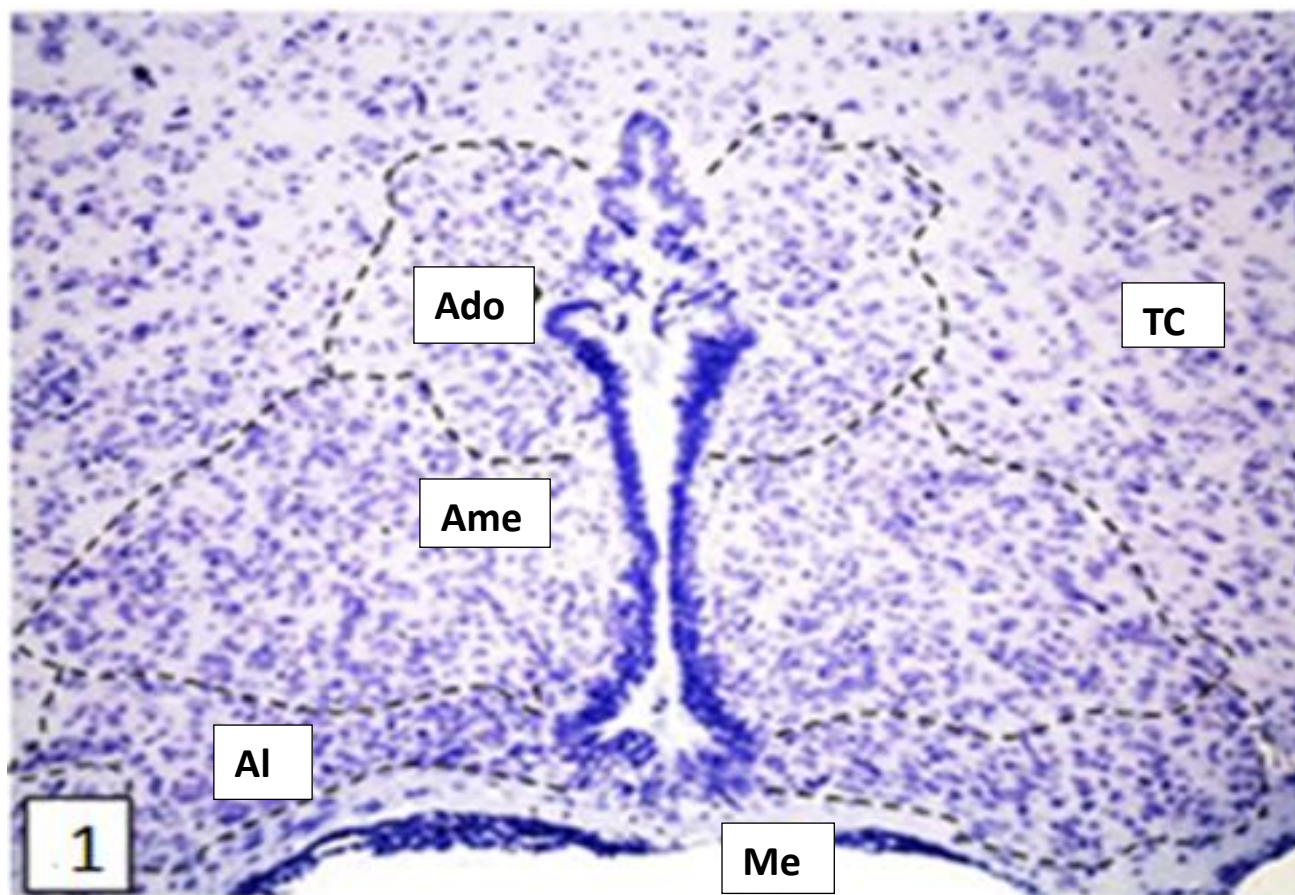


Рисунок 12 - Аркуатный ядерный комплекс

Примечание к рисунку 12: Сопоставление фронтальных срезов промежуточного мозга intactных 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.

При морфологическом изучении МАЯ гипоталамуса intactных половозрелых крыс были выделены следующие группы нейронов (рисунок 13):

1. неизменные клетки: клетки неправильной формы с четкими контурами, ровной ядерной оболочкой с немногочисленными вдавлениями и преобладанием хроматофильной субстанции в цитоплазме;
2. сморщенные клетки: сморщенная форма с нечеткими контурами без хроматофильной субстанции в своей структуре;
3. гипохромные клетки: без нарушения строения с бледной цитоплазмой;

4. «клетки-тени»: разновидность клеток с грубыми нарушениями, со стертыми краями тела и ядра.

Компенсаторные изменения в клетке характеризует глиоцито-нейрональный индекс, который составил $0,23 \pm 0,05$ отн. ед.

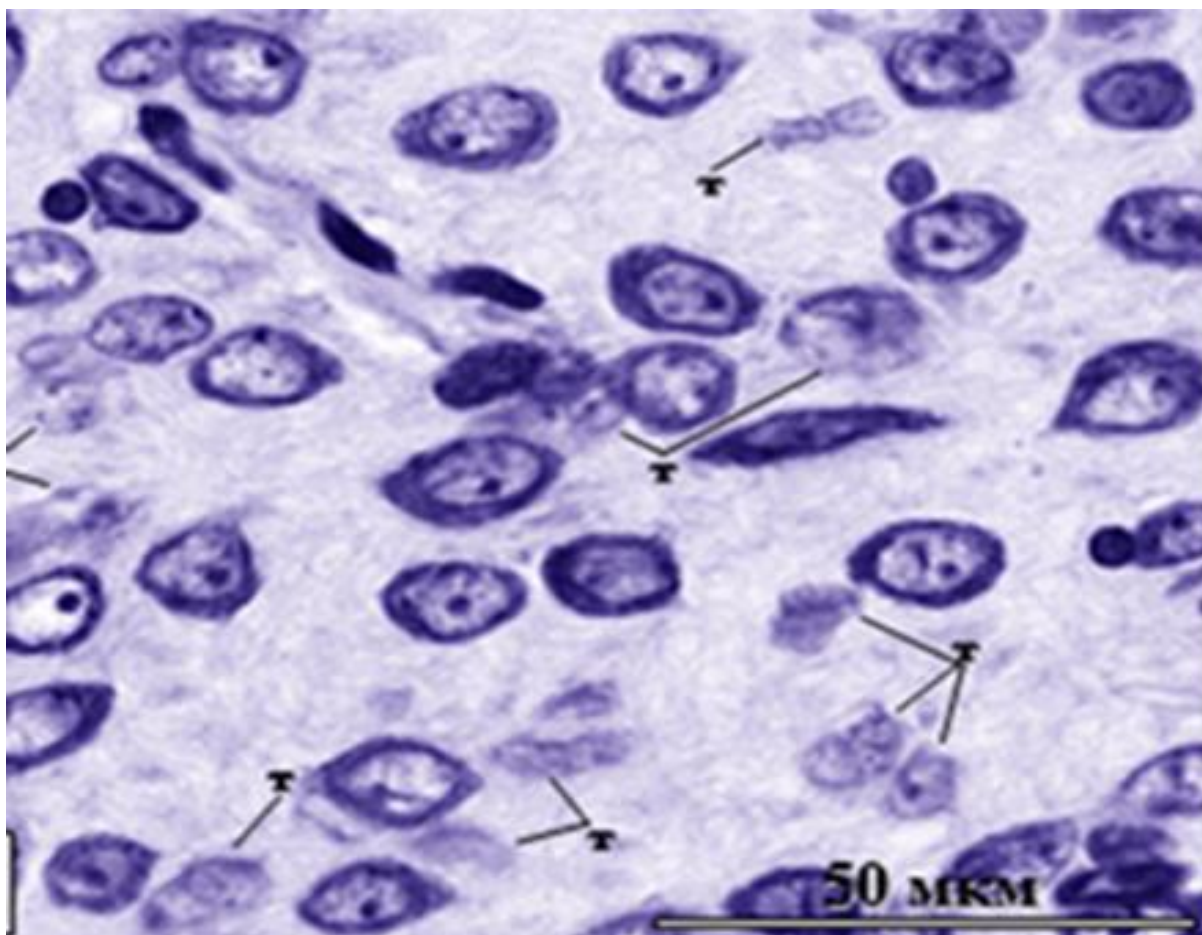


Рисунок 13 - Морфологические характеристики нейронов МАЯ здоровых самцов крыс 4 мес

Примечание к рисунку 13: малоизмененные нейроны не обозначены. Патологически измененные нейроны: Т – «клетки-тени». Окраска методом Ниссля, ок. x10, об. x100.

В модели гипогонадотропного гипогонадизма в половозрелом возрасте отмечались значительные морфологические изменения в клетках МАЯ, обусловленные необратимыми процессами атрофии/склероза:

1. уменьшение площади цитоплазмы и тел клеток малоизмененных нейронов ($p < 0,05$), значительное уменьшение их количества ($p < 0,05$);

2. увеличение количества «клеток-теней» ($p < 0,05$);

Описанные изменения морфологии нейронов расценены как дегенеративные. Данные представлены на рисунках 14 и 15.

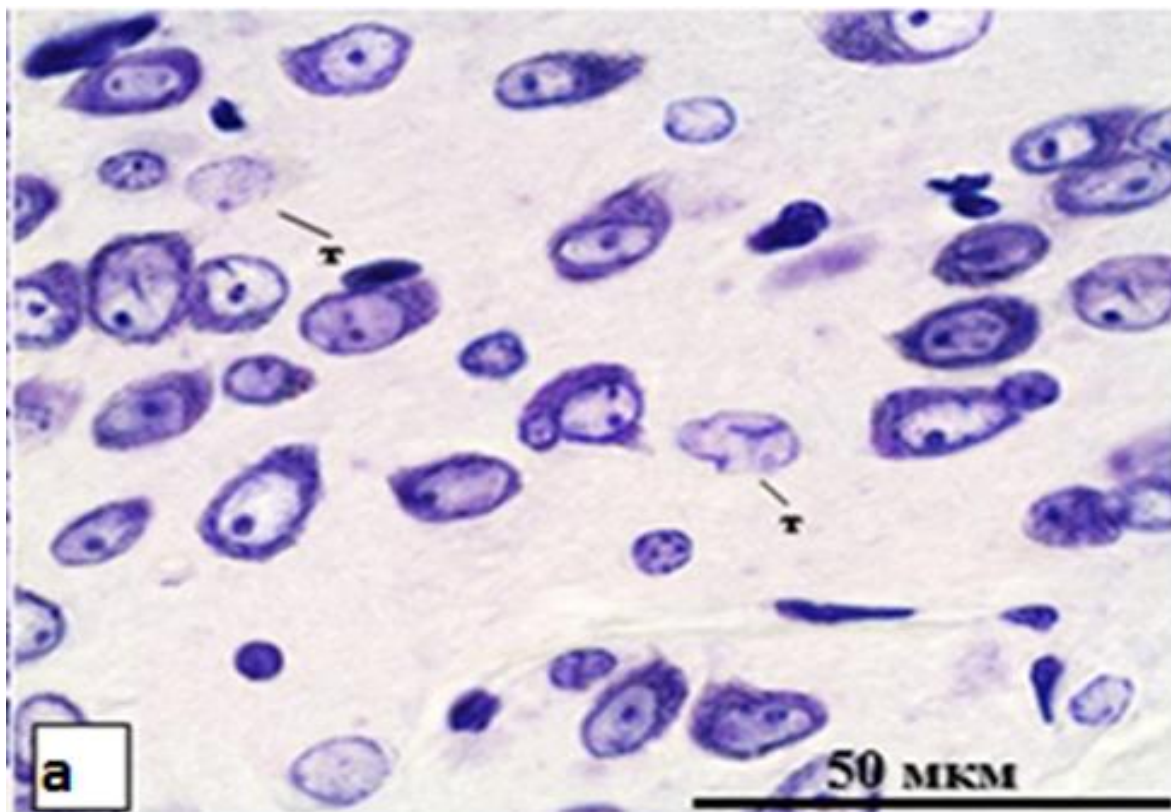


Рисунок 14 - Морфологические характеристики нейронов МАЯ самцов крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 месяцев

Примечание:

патологически измененные нейроны: Т – «клетки-тени».

Малоизмененные (нормохромные) нейроны не обозначены.

Окраска методом Ниссля, ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

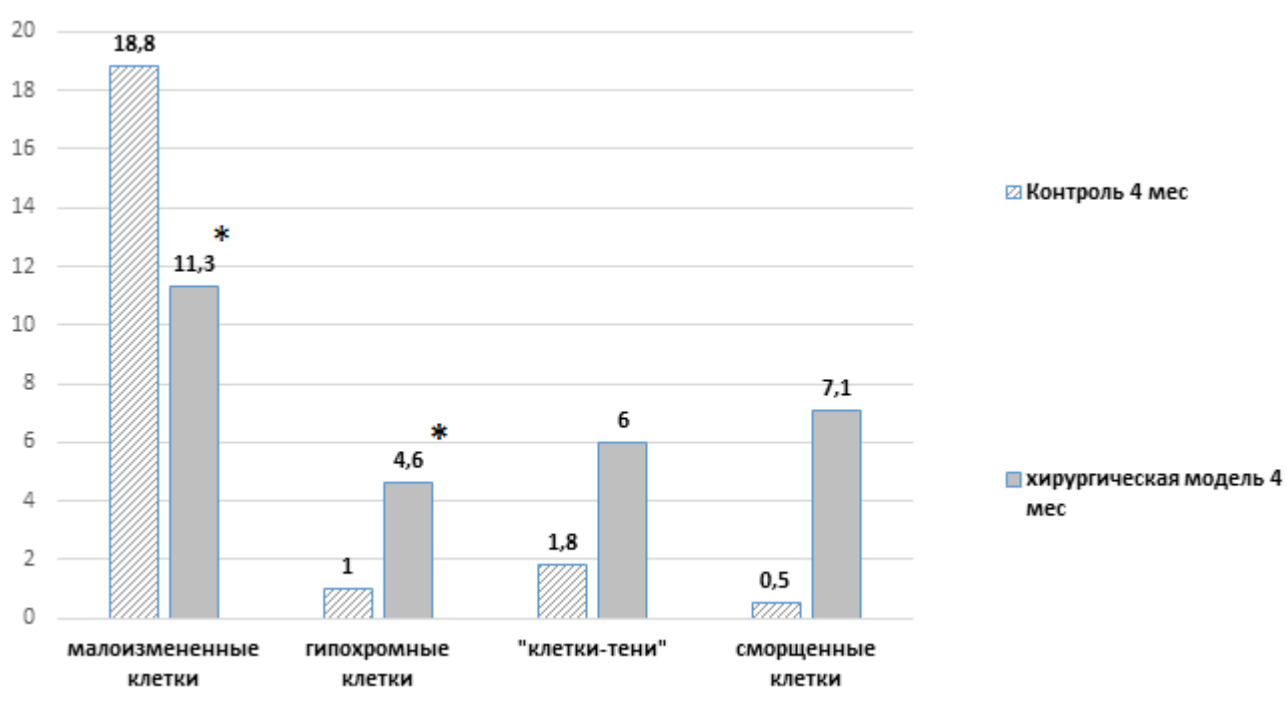


Рисунок 15 - Анализ соотношения нейронов различных видов в разных группах

самцов крыс на площади $0,01 \text{ мм}^2$ ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Примечание к рисунку 15: * сравнение с группой контроля $p < 0,05$.

Наряду с вышеописанными изменениями, было установлено возрастание глиоцито-нейронального индекса ($p < 0,05$), что, в сочетании 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 [194]. В условиях развития дистрофических процессов данные изменения могут трактоваться как компенсаторный механизм.

Таким образом, сделано заключение о том, что гипогонадотропный гипогонадизм способствует развитию выраженных дистрофических, дегенеративных и компенсаторно-приспособительных изменений морфологических характеристик МАЯ гипоталамуса самцов крыс.

Была выполнена морфологические характеристики нейронов МАЯ самцов крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма на фоне терапии тестостероном. Данные представлены на рисунке 16.

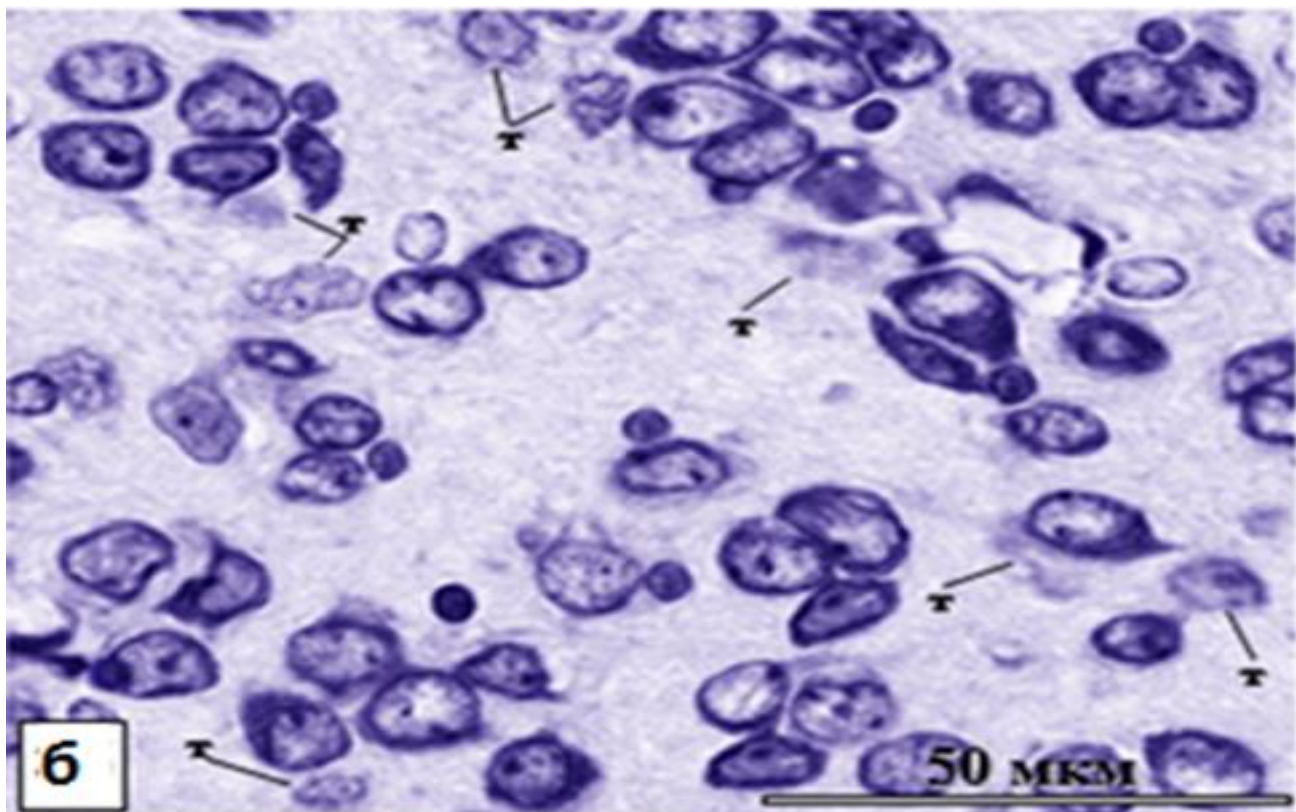


Рисунок 16 - Морфологические характеристики нейронов МАЯ самцов крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 мес на фоне терапии тестостероном

Примечание: Патологически измененные нейроны: Т – клетки-«тени».

Малоизмененные (нормохромные) нейроны не обозначены.

Окраска методом Ниссля, ок. x10, об. x100.

На фоне введения тестостерона отмечалось увеличение площади тел малоизмененных нейронов МАЯ при сравнении с группой гипогонадизма ($p < 0,05$) Данные представлены на рисунке 17.

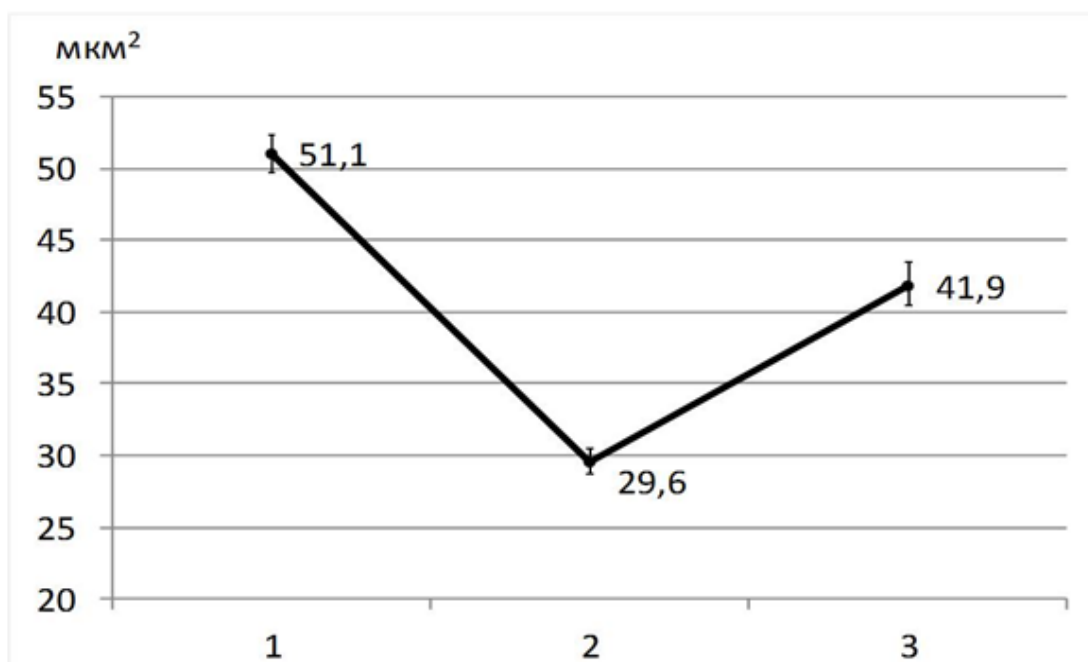


Рисунок 17 - Изменения площади тел малоизмененных нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии тестостероном (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1)

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

Количественная характеристика изменений площади тел малоизмененных нейронов, межклеточного взаимодействия в МАЯ и динамика глиоцито-нейронального индекса представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Площадь тел малоизмененных нейронов и межклеточное взаимодействие в МАЯ на площади $0,01 \text{ мм}^2$ ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

| Группа | Площадь тел малоизмененных нейронов, мкм ² | Количество групп нейронов | Глиоцито-нейрональный индекс |
|------------------|---|---------------------------|------------------------------|
| | m=30 | m=14 | m=14 |
| Контроль, 4 мес. | 423,0±31,41 | 2,03 ± 0,74 | 0,23 ± 0,05 |

Продолжение таблицы 8

| Группа | Площадь тел малоизмененных нейронов, мкм ² | Количество групп нейронов | Глиоцито-нейрональный индекс |
|---|---|---------------------------|------------------------------|
| | m=30 | m=14 | m=14 |
| Хирургическая модель гипогонадизма, 4 мес. | 318,8±47,7* | 7,41 ± 0,91* | 0,32 ± 0,04* |
| Хирургическая модель с лечением тестостероном, 4 мес. | 405,9±33,0** | 1,62 ± 1,02** | 0,30 ± 0,04* |
| Примечание: * – различия с параметрами клеток в контроле значимы (p<0,05); ** – различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы (p<0,05); m - количество наблюдений. | | | |

Также отмечалось уменьшение количества поврежденных гипохромных и сморщенных клеток при сравнении с экспериментальной группой гипогонадизма (p<0,05), однако представленность функционально неактивных «клеток-теней» не изменилась и значимо преобладала при сравнении со здоровыми крысами (p<0,05). Сохранялась низкая плотность малоизмененных нейронов при сравнении с группой контроля. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Количественное соотношение различных морфологических видов нейронов в МАЯ гипоталамуса на площади $0,01 \text{ мм}^2$ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

| Группа | Количество и доля нейронов в популяции (количество исследованных площадей, $m = 14$) | | | |
|---|--|---------------|---------------|--------------|
| | малоизменённые | гипохромные | сморщенные | тневидные |
| Контроль, 4 мес. | 18,8±2,4 | 1,0±0,3 | 0,5±0,1 | 1,8±0,5 |
| Хирургическая модель гипогонадизма, 4 мес | 11,3±1,1 * | 4,6±0,6 * | 7,1±0,7 * | 6,0±0,8 * |
| Хирургическая модель с лечением тестостероном, 4 мес. | 12,2±1,4 * | 2,3±0,7 ** | 0,9±0,3 ** | 6,9±1,3 * |
| Примечание: * – различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$); ** – различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы ($p < 0,05$); m - количество наблюдений. | | | | |

Таким образом, гипогонадотропный гипогонадизм способствует развитию выраженных дистрофических, дегенеративных и компенсаторно-приспособительных изменений морфологических характеристик МАЯ гипоталамуса самцов крыс. Терапия эфирами тестостерона частично компенсирует сформировавшиеся изменения, но не влияет на запущенные процессы гибели нервных клеток.

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

Иммуногистохимическим методом была определена экспрессия рецепторов к андрогенам в МАЯ гипоталамуса. Все нейроны этой области экспрессировали рецепторы к андрогенам. В глиальных клетках данные рецепторы не визуализировались. На рисунке 18 представлена экспрессия рецепторов андрогенов.

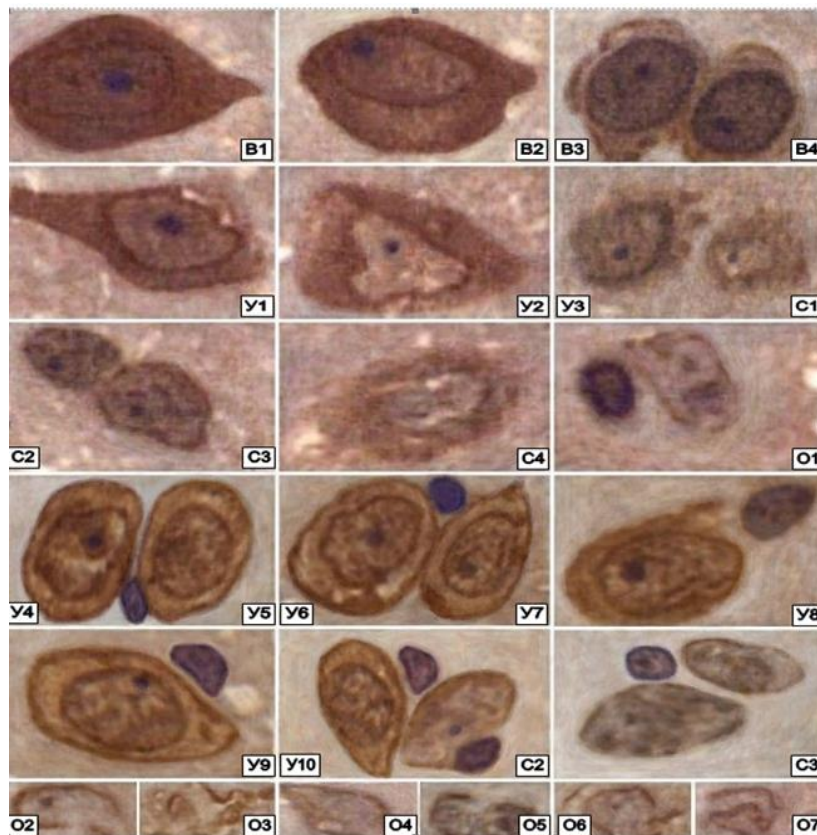


Рисунок 18 - Классификационные признаки нейронов МАЯ по результатам выявления рецепторов к андрогенам и окрашивания ядер клеток гематоксилином.

Ок. x10, об. x100

Примечание к рисунку 18:

1. B1-B4 - клетки с выраженной экспрессией AP;
2. Y1-Y10 - клетки с умеренно выраженной экспрессией AP с участками разреженности на внутренней части ядра и участках цитоплазмы;
3. C1 – C4, O1 –O7 - клетки со слабо выраженной и очень низкой экспрессией AP.

Было установлено, что в физиологических условиях андрогеновые рецепторы преимущественно экспрессируются на внутренней поверхности ядерной оболочки нейронов и редко в цитоплазме. По степени экспрессии исследуемых рецепторов клетки были разделены на несколько видов:

1. большинство клеток имели выраженную экспрессию АР (В1-В4);
2. в меньшей степени были представлены нейроны с умеренно выраженной экспрессией андрогеновых рецепторов с участками разреженности на внутренней части ядра и участках цитоплазмы (У1-У3);
3. редко встречались нейроны со слабо выраженной и очень низкой экспрессией рецепторов (С1 – С4, О1-О7).

Таким образом, оценивая экспрессию АР 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.

В модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма экспрессия андрогеновых рецепторов в клетках МАЯ была снижена, нейроны с выраженной экспрессией отсутствовали ($p < 0,05$); экспрессия АР большинством малоизмененных нейронов была расценена, как умеренная. Доля нейронов со слабой экспрессией (С2 – С3) и очень низкой (О2 – О7) значительно выросла ($p > 0,05$). Локализованы описанные рецепторы были преимущественно на ядерной оболочке и в цитоплазме. Отмечалось компенсаторное явление в виде появления их конгломератов в цитоплазме (У4 – У7 и У8 – У10).

На фоне введения эфира тестостерона отмечались значимые изменения экспрессии андрогеновых рецепторов при сравнении с группой экспериментального гипогонадизма. Появились клетки с выраженной экспрессией (В2, В3), отсутствовавшие в группе гипогонадизма ($p < 0,05$). Преимущественно были представлены нейроны с умеренной экспрессией андрогеновых рецепторов (У2, У8), доля которых была значительно выше в сравнении с таковыми в группе модели гипогонадизма до лечения ($p < 0,05$). Представленность же нейронов со

слабой и очень низкой степенью экспрессии андрогеновых рецепторов (С2, С3) была значительно меньше в сравнении с группой без лечения ($p < 0,05$).

Данные количественных различий нейронов МАЯ по степени экспрессии рецепторов к андрогенам в различных группах представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Количественные различия нейронов МАЯ по степени экспрессии рецепторов к андрогенам на площади $0,01 \text{ мм}^2$ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

| Группа | Степень экспрессии АР (количество исследованных площадей, $n = 8$) | | | |
|---|---|-------------------|----------------|--------------|
| | выражена | умеренно выражена | слабо выражена | очень низкая |
| Контроль, 4 мес. | 20,0±1,1 | 9,5±1,4 | 1,8±0,5 | 0,9±0,3 |
| Хирургическая модель гипогонадизм, 4 мес | 0* | 9,0±1,3 | 14,4±1,2* | 8,3±1,1* |
| Хирургическая модель с лечением тестостероном, 4 мес. | 2,5±0,8** | 16,1±2,0** | 7,9±0,9** | 3,5±0,8** |
| Примечание: * – различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$); ** – различия с параметрами клеток при гипогонадизме значимы ($p < 0,05$). | | | | |

Таким образом, при моделировании гипогонадного состояния отмечалось значимое снижение экспрессии андрогеновых рецепторов в нейронах МАЯ гипоталамуса на фоне происходящих дегенеративно-дистрофических явлений.

Введение тестостерона способствовало частичному восстановлению интенсивности экспрессии андрогеновых рецепторов.

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

Иммуногистохимическим методом была определена экспрессия рецепторов KISS1R в МАЯ гипоталамуса. У здоровых половозрелых крыс все нейроны по степени экспрессии рецепторов к кисспептину были разделены на 2 типа (рисунок 19):

- 1 тип: большинство клеток со слабой экспрессией рецепторов KISS1R, расположенных неравномерно на клеточной мембране. Морфологически данные клетки были меньше по размеру, ядро было светлым и имело круглую форму;
- 2 тип: единичные нейроны с высокой экспрессией рецепторов KISS1R, локализованных на плазматической мембране и в цитоплазме клеток, а также в их отростках. Морфологически тело и ядро этих клеток были крупными, форма ядра была овальной.

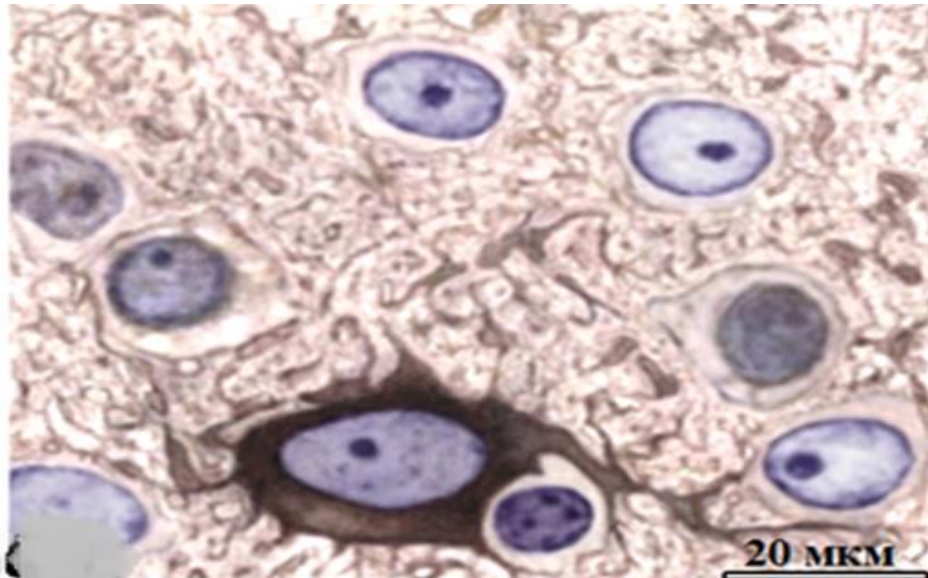


Рисунок 19 - Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у здоровых половозрелых крыс. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100

В модели гипогонадотропного гипогонадизма отмечалось снижение экспрессии рецепторов KISS1R, которые локализовались на небольших отдельных участках плазмолеммы. В цитоплазме же рецепторы практически не визуализировались. Лишь единичные нейроны имели умеренно выраженную экспрессию рецепторов KISS1R, локализованных преимущественно на плазматической мембране тела и отростков. Данные представлены на рисунке 20.

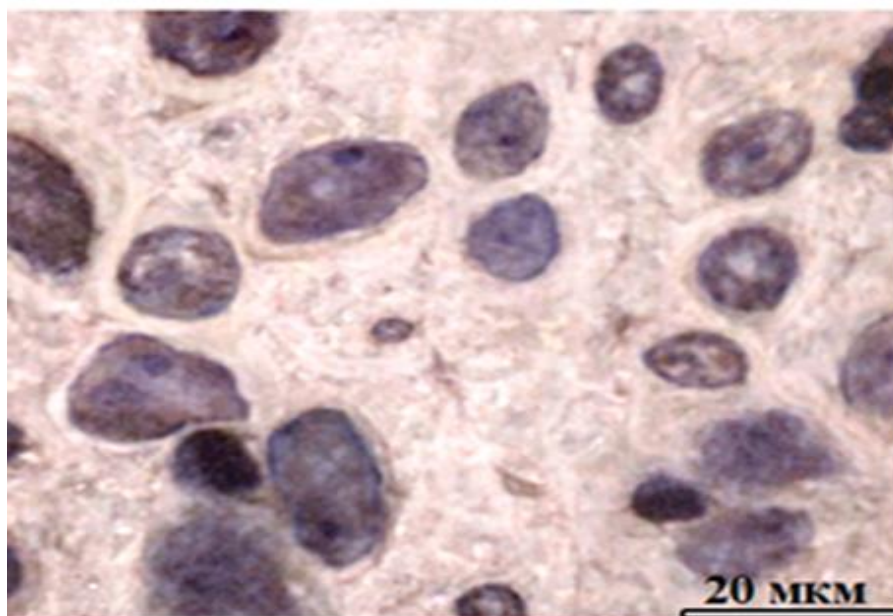


Рисунок 20 - Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 мес. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином. Ок. x10, об. x100

Таким образом, получены данные о снижении степени экспрессии кисспептиновых рецепторов KISS1R нейронами МАЯ гипоталамуса при гипогонадотропном состоянии.

Таким образом, суммируя полученные результаты, следует подчеркнуть, что при гипогонадотропном гипогонадизме в условиях устойчивого дефицита тестостерона в нейронах МАЯ гипоталамуса развиваются дегенеративно-дистрофические изменения, с точки зрения морфологии клеток, и снижается экспрессия андрогеновых и кисспептиновых рецепторов, с точки зрения функциональной активности клеток.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R ПРИ ЗАДЕРЖКЕ СТАРТА ПУБЕРТАТА И ГИПОГОНАДОТРОПНОМ ГИПОГОНАДИЗМЕ У МАЛЬЧИКОВ. КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

4.1. Клиническая характеристика мальчиков с задержкой старта пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом

В клинический раздел исследования было включено 75 детей и подростков мужского пола, постоянно проживающих в Северо-Западном регионе РФ, проходивших обследование на базах ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» в период с 2014 по 2018 год. Пациенты были разделены на 3 группы. Основная группа задержки полового созревания включала в себя 22 мальчика-подростка с отсутствием клинических и лабораторных признаков старта пубертата в возрасте старше 14 лет. Пациенты имели стадию полового созревания Таннер I, объем гонад составил менее 4 мл. Лабораторно были низкие значения уровня тестостерона и ЛГ $<0,01$ МЕ/л. В процессе обследования 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.

Учитывая изучение патологии, имеющей центральные механизмы дисрегуляции пубертатной активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, был проведен сравнительный анализ ряда перинатальных характеристик и раннего анамнеза развития, встречавшихся в группах мальчиков с задержкой полового развития и физиологического его течения. Преждевременных родов в основной группе и группе сравнения подростков в стадии полового развития Таннер III-V не отмечалось, в группе сравнения 2 составила 10,7 % случаев, что явилось статистически не значимым ($p=0,11$). Процент оперативных родов в группах также не имел статистически значимых различий ($p=0,98$) и составил в основной группе 27% и соответственно в группах сравнения 1 и 2 - 23% и 25%. Состояние преэклампсии зафиксировано в 35% случаев основной группы и 29% и 33% у мальчиков и подростков с физиологическим течением пубертата, что не имело значимых различий ($p=0,9$). Анемия во время беременности присутствовала в равной степени во всех группах исследования ($p=0,63$) и составляла в основной и группах сравнения 1 и 2 соответственно 18%, 14% и 25%. Внутриутробная инфекция в группе мальчиков с задержкой полового созревания составила 6% случаев и в группах сравнения 5% и 4% (группа 1 и 2) ($p=0,94$). Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 - 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. | | | | |

Таким образом, следует заключить, что в группе детей с центральным генезом задержки полового развития, при сравнении со здоровыми детьми, не было установлено значимых отличий воздействий перинатальных факторов, что свидетельствует о валидности формирования групп, а также определяет значимость поиска других факторов, влияющих на гонадную ось в возрасте пубертата.

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, что было статистически не значимо ($p > 0,05$).

С учетом полученных данных, для исключения искажающего действия различающихся факторов в группах, выполнен многофакторный статистический анализ с использованием критерия ANCOVA, который показал отсутствие значимых влияний на исходную ассоциацию. Таким образом, имеющиеся различия не повлияли на достоверность полученных результатов исследования.

Таким образом, подростки, имеющие задержку полового развития центрального генеза, были представлены в большей части синдромом позднего пубертата (73%), в меньшей - гипогонадотропным гипогонадизмом (27%). Имели сопоставимо низкие, соответствующие допубертатным, уровень тестостерона и активность гонадотропинов. Также имели более низкие параметры линейного роста 36% (SDS роста < 1) при сравнении с подростками того же возраста с физиологическим течением полового созревания. При этом не было выявлено значимых факторов перинатального риска в сравнении с детьми, имеющими физиологическое течение полового созревания, что обусловило поиск других факторов, влияющих на механизмы запуска старта пубертата.

4.2. Характеристика функциональной активности системы кисспептина KISS1/KISS1R у мальчиков с задержкой старта пубертата и гипогонадотропным гипогонадизмом

Следующими задачами клинической части исследования было изучение степени функциональной активности лиганд-рецепторной системы кисспептина при сопоставлении с центральными и периферическими половыми гормонами и оценка потенциальных диагностических возможностей кисспептина при задержке

полового созревания. С этой целью был определен уровень кисспептина в крови мальчиков всех групп.

Перед изучением уровня кисспептина в группах задержки полового созревания и группах с физиологическим течением полового развития был проведен сравнительный анализ кисспептина крови в подгруппах синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма. Уровень кисспептина в этих подгруппах не имел различий: медиана составила 29,5 пг/мл 44,5 пг/мл соответственно ($p=0,63$). Данные представлены на рисунке 21.

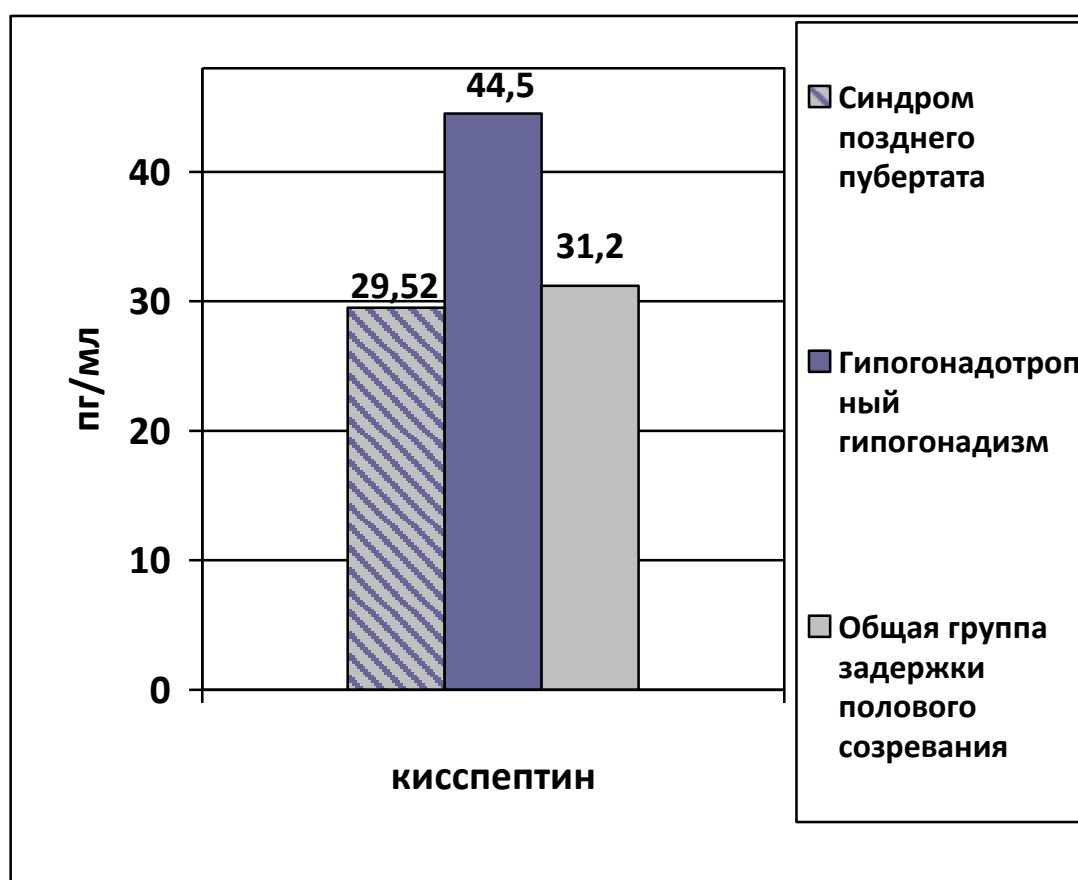


Рисунок 21 - Уровень кисспептина плазмы крови основной группы (пг/мл)
($p=0,63$)

Полученные результаты подтверждают возможность объединения синдрома позднего пубертата и органической задержки полового созревания в общую группу задержки полового развития по признаку отсутствия активации центральных отделов гонадостата в должном для этого возрасте.

Медиана кисспептина в основной группе составила 31,2 пг/мл, в группах контроля медианы кисспептина оказались одинаковыми и составили 13,8 пг/мл. Статистически значимое различие было обнаружено для общего распределения в группах (Крускал-Уоллис, $p < 0,05$). При попарном сравнении между группами были выявлены значимые различия между основной группой и группой контроля 1 ($p = 0,02$) и группой контроля 2 ($p = 0,02$). Было установлено, что у мальчиков с задержкой полового созревания уровень кисспептина был значимо выше, чем у детей и подростков, у которых пубертат состоялся или отсутствовал в физиологически допустимом возрастном диапазоне. Результаты представлены на рисунке 22.

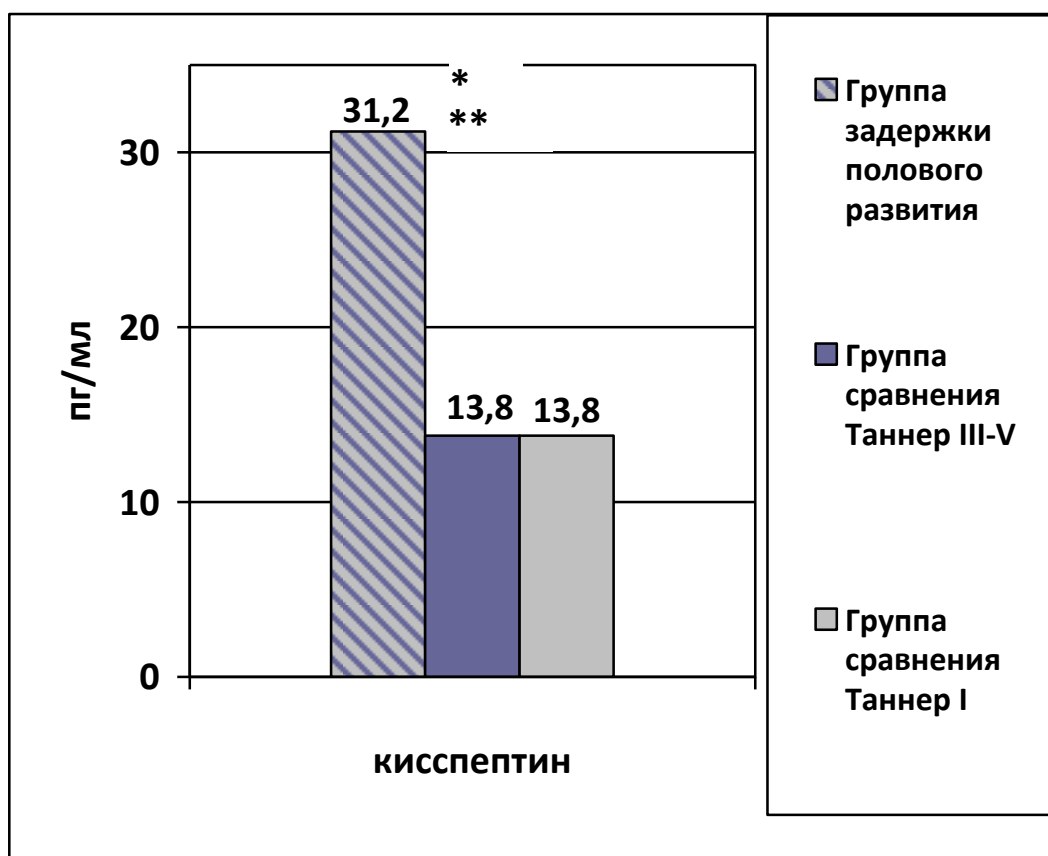


Рисунок 22 - Сравнительный анализ уровня кисспептина плазмы крови в различных группах (пг/мл)

Примечание к рисунку 22: *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 низкий при физиологическом течении пубертата, независимо от его стадии, однако при задержке полового развития в соответствующем старту пубертата возрасте значительно повышается.

Опираясь на полученные результаты, позволяющие предположить взаимосвязь между уровнем кисспептина и плазменным уровнем тестостерона в возрасте спонтанного пубертата, нами был проведен корреляционный анализ. Получены данные аналогичные с экспериментальными, показавшие умеренную обратную зависимость ($r=-0,50$, $p<0,01$). Отмечалось снижение показателей кисспептина при повышении уровня тестостерона крови. Таким образом, направленность изменений концентрации тестостерона и кисспептина крови не зависит от количественного показателя и является противоположной по отношению друг к другу. Подобные данные ранее были получены на экспериментальном материале.

Таким образом, наличие стойкой обратной взаимосвязи между уровнями тестостерона и кисспептина крови, наряду с установленным клинко-биохимическим фенотипом подростков, имеющих значимо более высокий уровень кисспептинемии при задержке полового развития центрального генеза по сравнению с мальчиками, не имеющими нарушений полового развития, позволяют обозначить новые регуляторные механизмы стероидогенеза со стороны кисспептина по принципу «обратной связи».

Для оценки дискриминационных свойств уровня кисспептина в плазме крови при дифференцировке пациентов с задержкой полового созревания и подростков с физиологическим течением пубертата, был проведен анализ распределения под кривой (ROC). Построенная кривая ROC представлена на рисунке 23. Площадь под кривой ROC (AUC) составила 0,854 (95% CI: от 0,720 до 0,940), что позволило отвергнуть нулевую гипотезу (область 0,5) ($p < 0,0001$). Значение критерия, обеспечивающее оптимальный баланс между чувствительностью и специфичностью, было равно 16,9 пг/мл. Это соответствует значению индекса Youden J. 0,6473, с тестовой чувствительностью 72,7% и

специфичностью 92,0%. Таким образом, оптимальным порогом уровня кисспептина в плазме крови для прогнозирования задержки полового созревания, по данным ROC анализа, можно считать 16,9 пг/мл.

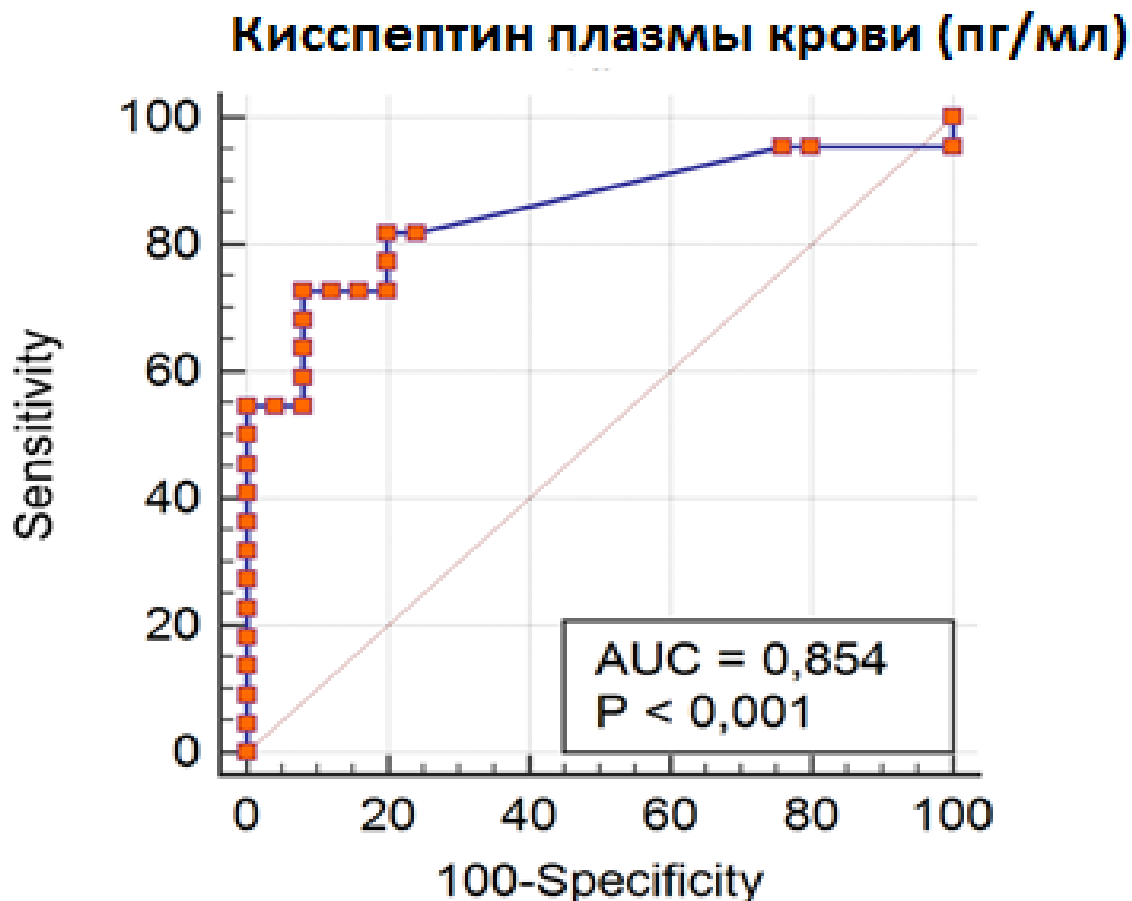


Рисунок 23 – ROC анализ уровня кисспептина плазмы крови в основной группе

Для уточнения возможных дифференциальных различий в значениях кисспептина для прогноза синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма подобные ROC-кривые были построены отдельно для значений кисспептина крови при каждом из названных состояний в сравнении со значениями в группе контроля 1.

Для пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом площадь под кривой ROC (AUC) составила 0,82 (95% CI: от 0,64 до 0,93), что позволило отвергнуть нулевую гипотезу (область 0,5) ($p < 0,0001$). Получены данные, что дискриминационным значением уровня кисспептина крови для

гипогонадотропного гипогонадизма явился 16,9 пг/л, что соответствует значению индекса Youden J. 0,59 со специфичностью 92% и чувствительностью 66,7%. Данные представлены на рисунке 24.

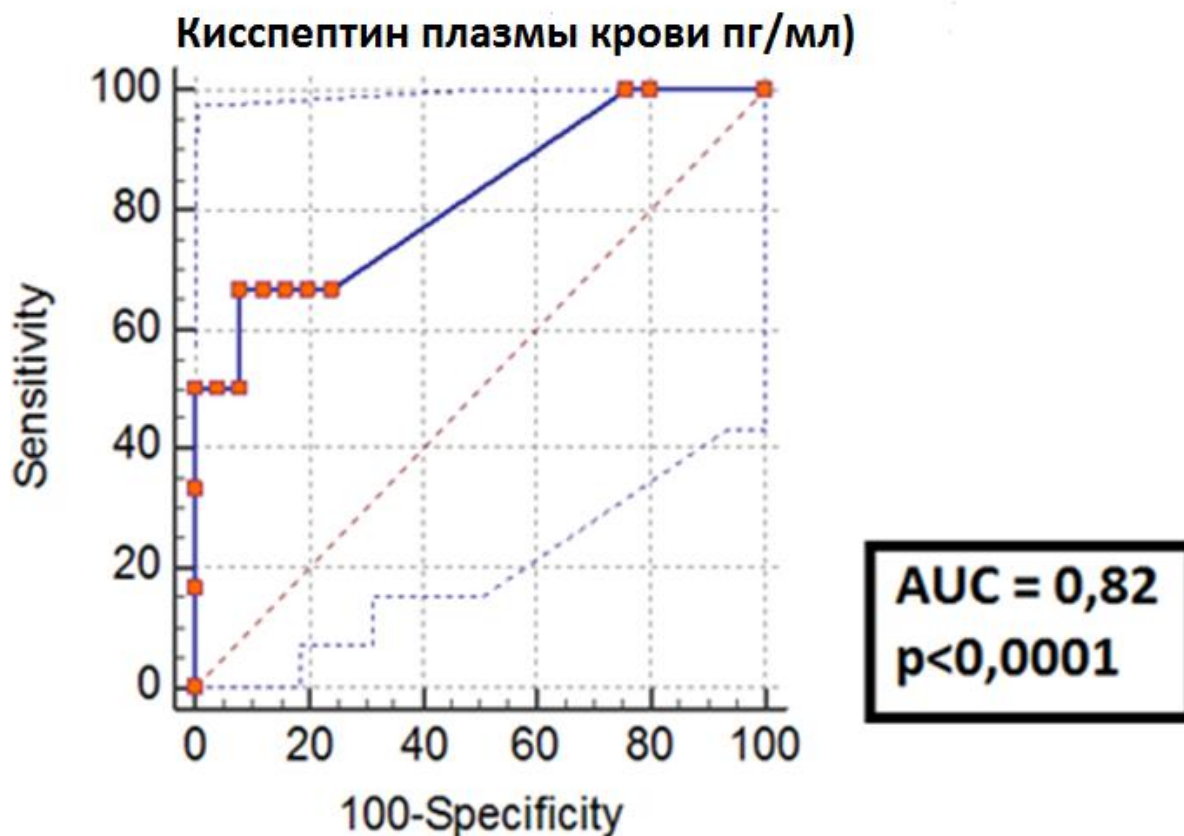


Рисунок 24 - ROC анализ уровня кисспептина плазмы крови в подгруппе подростков с гипогонадотропным гипогонадизмом

Для синдрома позднего пубертата площадь под кривой ROC (AUC) составила 0,89 (95% CI: от 0,74 до 0,97), что позволило отвергнуть нулевую гипотезу (область 0,5) ($p < 0,0001$). Пороговый показатель составил также 16,9 пг/л, что соответствует значению индекса Youden J. 0,69 с чувствительностью 77,7% и специфичность 92%. Данные представлены на рисунке 25.

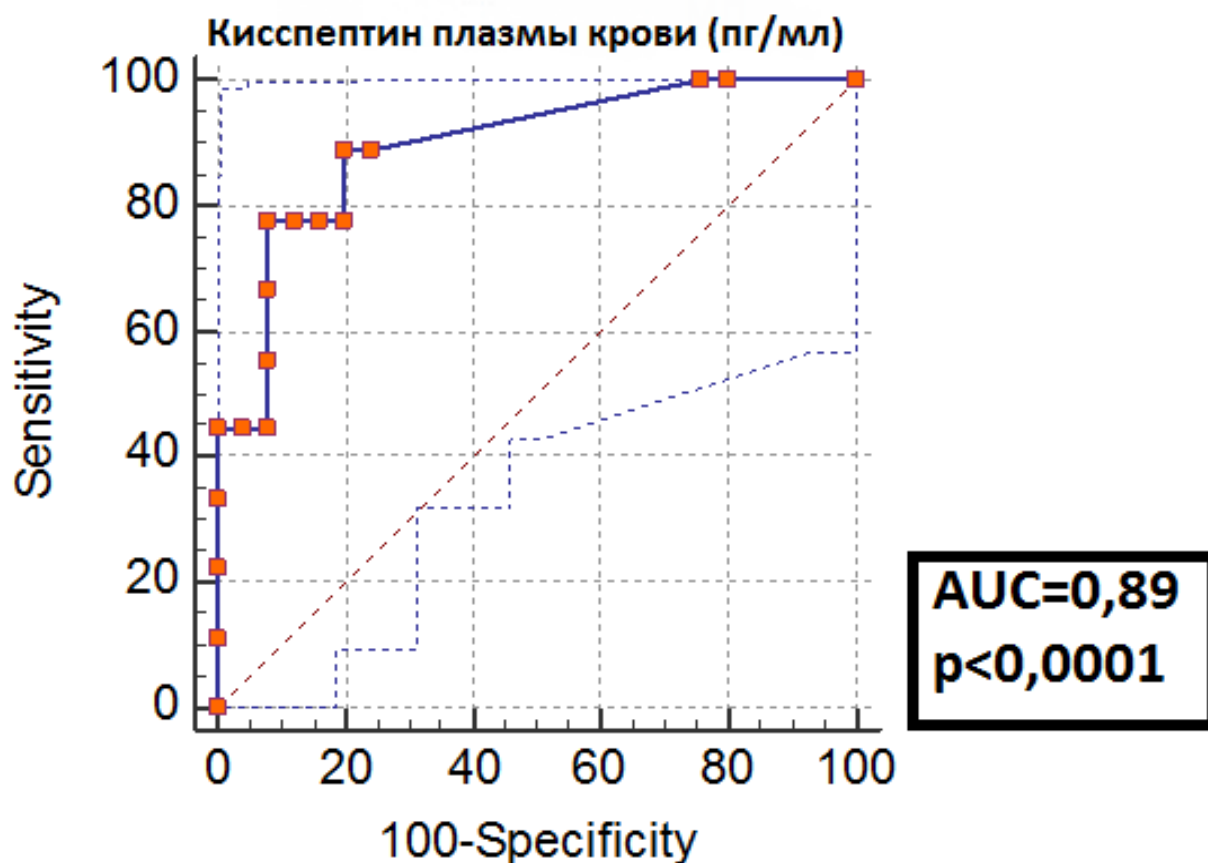


Рисунок 25 - ROC анализ уровня кисспептина плазмы крови в подгруппе подростков с синдромом позднего пубертата

Таким образом, пороговое значение плазменного уровня кисспептина в группе задержки полового созревания не изменяется для подгрупп с гипогонадотропным гипогонадизмом и 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.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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. Нарушения на любом регуляторном уровне ведут к функциональной либо органической патологии полового развития, исходом которой может стать гипогонадизм и бесплодие. Значимым открытием второго тысячелетия явилась идентификация роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS1/KISS1R, как ключевого регулятора активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [195]. 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 наиболее эффективного нового метода терапии болезней, связанных с нарушениями репродуктивной функции.

Старт пубертата и последующее созревание репродуктивной системы до достижения половой зрелости являются эссенциально 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 названных состояний, выбора терапии и определения прогноза репродукции. Существующие методы диагностики и лечения не всегда эффективны, что определяет актуальность

исследований, направленных на уточнение новых механизмов регуляции полового развития.

Таким образом, основной целью проведенного нами исследования явилось изучение функциональной активности лиганд-рецепторной системы ксиспептина и ее роли в генезе задержки старта пубертата, включая развитие мужского гипогонадотропного гипогонадизма, для теоретического обоснования новых диагностических и терапевтических подходов к коррекции данной патологии. Задачи исследования последовательно решались посредством проведения экспериментальной и клинической части работы.

Основные задачи экспериментального раздела включали оценку влияния низкого уровня тестостерона, индуцированного в модели гипогонадотропного гипогонадизма у самцов крыс линии Wistar, на изменения системы ксиспептина в центральных (медиальное аркуатное ядро) и периферических андрогензависимых тканях (тестикулы, скелетные мышцы, кровь). Анализ проводился с учетом соответствия возрастных периодов лабораторных животных и человека, для чего были выделены группы лабораторных животных допубертатного возраста (1 мес.), возраста старта пубертата (2 мес.), половозрелых особей (4 мес.). В каждой возрастной группе были изучены физиологические особенности системы ксиспептина и изменения ее при моделировании гипогонадизма.

При анализе возрастных изменений уровня тестостерона в крови животных установлены значимые различия в допубертатном возрасте, возрасте старта пубертата и достижении половой зрелости (медианы 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. 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 против 20,02 нг/мл, $p < 0,01$). Что касается количественных характеристик ксиспептиновых рецепторов в гонадах, то в группе интактных животных было отмечено их увеличение в

зависимости от возраста. Так, изменения в тестикулах от возраста допубертата (1 мес.) к возрасту половой зрелости (4 мес.) составили 0,92 нг/мг против 1,13 нг/мг 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 и 0,11 нг/мг, $p > 0,05$), 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, моделирование гипогонадизма приводило к снижению уровня тестостерона крови до уровня, соответствовавшего началу пубертата, а 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.

На следующем этапе исследования было изучено влияние экспериментально индуцированной гипотестостеронемии на количественные изменения кисспептиновых рецепторов в гонадах и скелетных мышцах, а также кисспептина в крови. В тестикулах половозрелых особей модели гипогонадотропного гипогонадизма представленность рецепторов KISS1R снижалась до уровня крыс допубертатного возраста 1 мес., не имея существенных различий (медианы соответственно 0,88 нг/мг и 0,92 нг/мг, $p > 0,05$), и будучи значимо ниже по сравнению с данными в контрольной группе половозрелого возраста (0,88 нг/мг и 1,13 нг/мг, $p < 0,05$). При подобном исследовании в отношении мышечной ткани, вероятно, вследствие физиологически более низкой представленности кисспептиновых рецепторов, не было выявлено значимых различий исходно

низкой плотности KISS1R при гипогонадизме, индуцированном хирургическим путем, несмотря на статистически более низкие значения уровня тестостерона. Лишь в комбинированной модели, сочетавшей хирургическую и химическую кастрацию и характеризовавшейся еще более низким уровне тестостерона крови, удалось установить значимые различия между половозрелыми особями с индуцированным гипогонадизмом и в его отсутствие, заключающиеся в снижении рецепторов кисспептина (медианы 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно, $p < 0,01$), причем различия также имели место при сравнении количества рецепторов в двух моделях (соответственно 0,06 нг/мг в комбинированной модели и 0,1 нг/мг в хирургической модели, $p < 0,05$). Было сделано заключение о влиянии выраженности гипотестостеронемии на снижение количества рецепторов кисспептина в 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.

Обсуждая результаты данного раздела исследования, следует заключить, что представленность кисспептиновых рецепторов неодинакова в разных андрогензависимых тканях. В ткани гонад установлено наибольшее количество KISS1R, увеличивающееся на фоне взросления и прогрессии полового развития. Индуцированный гипогонадизм приводил к регрессу данной группы рецепторов до препубертатного уровня в гонадах, в скелетных мышцах снижение отмечалось только в модели комбинированного гипогонадизма. Также было сделано заключение, что, в отличие от изменений на тканевом уровне, где плотность кисспептиновых рецепторов изменяется однонаправленно с уровнем тестостерона, в крови данные ассоциации носят разнонаправленный характер. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствовавшими, что при старте стероидной терапии снижается KISS1R

mRNA, а также позволяют сделать заключение о регуляторных механизмах по типу «обратной связи» [196].

Терапия тестостероном состояний, возникающих вследствие его дефицита, является классическим примером заместительной гормональной терапии. Было исследовано, насколько восстановление плазменного уровня тестостерона способно восстановить ранее выявленные нарушения кисспептиновой рецепции. Получены результаты, показавшие, что на фоне терапии тестостероном, несмотря на восстановление его уровня в крови до уровня половозрелых особей, количество KISS1R у 4-х месячных самцов крыс не претерпевало значимых изменений в гонадах и скелетных мышцах, оставаясь в количественном отношении соответствующим таковому у особей, не вступивших в пубертат. В крови кисспептин также оставался низким без существенных изменений, несмотря на пубертатный уровень тестостерона.

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.

Вопросы, связанные с исследованием центральных механизмов регуляции половой дифференцировки мозга, активации гипоталамических нейросекреторных ядер, секретирующих гонадолиберины, представляют высокую актуальность и исследовательский интерес. В последние годы произошло значительное расширение понимания роли генетических и эпигенетических факторов, определяющих иерархическую регуляцию отделов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Согласно современным представлениям, наиболее важная роль в регуляции старта пубертата состоит в эпигенетическом контроле групп генов, обеспечивающих супрессию/активацию трансинаптического межнейронального сигналинга в пределах кисспептиновых нейронов,

синхронизированных с нейронами системы KNDy (кисспептин, нейрокинин В, диноρφин), информация с которых поступает в ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса. В настоящее время идентифицированы 2 группы генов – Polycombgroup (PcG), транскрипционные ингибиторы, и Trithoraxgroup (TrxG), транскрипционные активаторы, которые подвергаются эпигенетическому контролю (гиперметилирование ДНК, деацетилирование гистонов, некодируемые микро-РНК и др.) [197, 198]. В процессах транссинаптического сигналинга в настоящее время важная роль отводится пре- и постсинаптическим эффектам белков семейства кисспептинов, некоторых других протеинов и глутамата, которые синтезируют нейроны преоптического и медиобазального комплексов гипоталамических ядер [199, 200, 201]. В качестве возможных механизмов действия кисспептинов описано усиление электрического возбуждения гонадолиберин – секретирующих нейронов, и, тем самым, потенцирование влияния ГАМК на G-белки их мембран [88, 202], что влечет активацию экспрессии мРНК и секреторной активности данной группы нейронов [203]. Описаны и другие механизмы, основанные на влиянии макроглии, клетки которой вырабатывают факторы роста и малые молекулы, необходимые для поддержания электрического потенциала, высокого уровня пластичности и процессов синтеза в ГнРГ-нейронах [194, 200].

Базируясь на вышеописанном, представилось важным изучение некоторых центральных механизмов кисспептиновой регуляции полового развития, которые были исследованы на экспериментальной модели гипогонадотропного гипогонадизма половозрелых самцов крыс линии Wistar посредством морфологического и иммуногистохимического анализа области медиальных аркуатных ядер гипоталамуса, представляющих собой наиболее крупный подотдел аркуатного ядерного комплекса. 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. 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 [191]. Также в группе гипогонадизма многократно увеличилось число гибнущих и погибших, или тeneвидных, клеток. В целом описанные изменения морфологии нейронов расценены, как дегенеративные. Наряду с вышеописанными изменениями, 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 [194], что в условиях развития дистрофических процессов может трактоваться, как компенсаторный механизм.

На этапе иммуногистохимического исследования были изучены изменения экспрессии андрогеновых рецепторов и кинесиптиновых рецепторов KISS1R в нейронах медиального аркуатного комплекса при гипогонадотропном гипогонадизме.

Оценивая экспрессию AR 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 AR. Так, признаки выраженной экспрессии в нейронах МАЯ отсутствовали; экспрессия AR большинством малоизмененных нейронов была расценена, как умеренная. Доля нейронов со

слабой экспрессией выросла в 8,6 раза, также определялись тeneвидные клетки с экспрессией, градирующей, как «очень слабая». Подобные изменения определялись в отношении экспрессии кисспептиновых рецепторов. В МАЯ интактных крыс были выявлены 2 группы нейронов – с очень выраженной и слабо выраженной экспрессией KISS1R. В клетках с высокой экспрессией рецепторы KISS1R локализовались в плазматической мембране и цитоплазме тел и в отростках, отходящих от тела данных клеток. В плазмолемме экспрессия KISS1R 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. В условиях гипогонадизма экспрессия KISS1R значительно снижалась, сохраняясь лишь на отдельных участках плазмолеммы и практически отсутствуя в цитоплазме нейронов.

Таким образом, суммируя полученные результаты, следует подчеркнуть, что при гипогонадотропном гипогонадизме, в условиях устойчивого дефицита тестостерона в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса развиваются изменения с точки зрения морфологии клеток (дегенеративно-дистрофические) и с точки зрения функциональной активности клеток (снижение экспрессии андрогеновых и кисспептиновых рецепторов).

Представило интерес изучение гистоморфологических характеристик нейронов МАЯ на фоне заместительной терапии тестостероном. 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, на фоне терапии тестостероном, не претерпели существенных изменений. Степень экспрессии AR и KISS1R на фоне терапии тестостероном 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, заместительная терапия гипогонадизма тестостероном подвергает частичному обратному развитию дегенеративно-дистрофические процессы и восстановлению интенсивности 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.

На этапе клинического раздела нашего исследования были обследованы 75 мальчиков с физиологическим половым развитием и задержкой его старта в возрасте старше 14 лет. Учитывая интерес преимущественно к центральным механизмам регуляции, из исследования были исключены случаи гипергонадотропного гипогонадизма. Все обследованные были жителями Санкт-Петербурга, не имели на момент обследования острых и хронических заболеваний в стадии декомпенсации, а также не получали медикаментов, влияющих на стероидогенез. Первичной гипотезой данной части исследования явилось предположение возможности использования уровня кисспептина крови в качестве биохимического критерия стадии полового развития. В настоящее время хорошо

изучены механизмы взаимодействия в пределах гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в различные периоды детского и подросткового возраста. Процессы активации/реактивации половой системы регулируются импульсной секрецией ГнРГ, однако регуляторы частоты, силы импульсов, равно как и степень чувствительности гонадолиберинового нейрона к уровню периферических половых стероидов, регулирующих функциональную активность системы по типу «обратной связи», продолжают оставаться предметом научных исследований. В последние годы были идентифицированы генетические и эпигенетические активаторы и супрессоры гонадолибериновой секреции, продуктами экспрессии и трансляции которых являются группа нейромедиаторов, обозначенных «система KNDy» (нейрокинин В, динорфин и кисспептин). Сигнальные продукты этой системы в ко-экспрессии обеспечивают трансляцию информации на ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса. Учитывая, что физиологический возрастной диапазон пубертатной активации гонадной оси достаточно велик и составляет для мальчиков-подростков от 9 до 14 лет, представляет интерес изучение индивидуальных предикторов возраста старта пубертата. С другой стороны, отсутствие старта полового развития у юношей старше 14 лет в отсутствие гипергонадотропного гипогонадизма может представлять определенную сложность с точки зрения дифференцирования функциональной задержки и гипогонадотропного гипогонадизма, особенно в случаях гипоталамического уровня поражения. Так называемый «синдром позднего пубертата», несмотря на преходящий характер, может сопровождаться определенными психологическими и социальными проблемами, связанными с отставанием в биологическом развитии от большинства сверстников и потребностью прогнозирования перспектив развития. Учитывая вышеописанное, а также базируясь на ранее полученных в экспериментальной части сведениях о значимости и частичной необратимости ряда изменений, индуцированных устойчивой гипотестостеронемией, является важным поиск новых диагностических и обоснование терапевтических возможностей при задержке полового развития, к которым можно отнести изучение системы кисспептина.

Исследования в этой области немногочисленны, результаты достаточно противоречивы и неоднозначны. В 2014 году опубликовано исследование Kotani M и соавторов, посвященное определению уровня кисспептина крови у небольшого числа мальчиков с гипогонадизмом в сравнении со здоровыми сверстниками. Получены данные о значительной вариабельности и в целом более высоком уровне кисспептина при гипогонадизме [204]. В другом исследовании, проведенном Jayasena Ch N и соавторы, сделано заключение о более высоком уровне кисспептина крови у детей в возрасте 2-18 лет, с наивысшим уровнем в возрасте 9-12 лет, по сравнению со взрослыми [205]. Полученные в обоих работах результаты свидетельствуют о высокой вариабельности уровня кисспептина крови, при этом в первом исследовании очень немногочисленны обследованные (4 и 7 чел.), а во втором включены дети больших возрастных различий. Неоднозначность данных обозначила актуальность проведения настоящего исследования.

Исходно в проведенном нами исследовании были сформированы 3 группы мальчиков, различного возраста: основная группа – мальчики старше 14 лет с отсутствием вторичных половых признаков, допубертатным объемом тестикул и низким уровнем тестостерона и ЛГ крови, 22 чел.; группа контроля 1 – здоровые мальчики сопоставимого с основной группой возраста и физиологическим течением пубертата (стадия по Таннер III-V), 25 чел.; группа контроля 2 – здоровые мальчики в возрасте 8 – 10 лет с физиологическим отсутствием признаков пубертата (стадия по Таннер I), 28 чел. 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. Что касается параметров физического развития в группах на момент

обследования, то количество мальчиков с задержкой роста в основной группе было значимо больше по сравнению с сопоставимой по возрасту группой контроля мальчиков в пубертате, при этом статистически значимых различий по весу тела в этих группах не наблюдалось.

Группа мальчиков с задержкой полового развития была подвергнута более глубокому анализу. Пик стимулированной секреции ЛГ в пробе с трипторелином <10 МЕ/л имел место у 6 подростков, у которых был диагностирован гипогонадотропный гипогонадизм. У остальных мальчиков стимулированный уровень ЛГ превышал 10 МЕ/л, свидетельствуя о синдроме позднего пубертата. Медианы тестостерона в обеих подгруппах были сопоставимо низкими, без статистических различий (соответственно 0,22 нмоль/л при позднем пубертате и 0,09 нмоль/л при гипогонадизме, $p=0,11$), значения ЛГ в данных подгруппах было $<0,01$ МЕ/л. Полученные результаты, свидетельствующие об отсутствии старта пубертата в физиологический возрастной период вследствие нарушений центральных механизмов активации гонадостата, подтвержденные сопоставимо низкими значениями половых стероидов и ЛГ, позволили объединить обе подгруппы в общую группу по признаку центральной задержки полового развития.

На следующем этапе был выполнен анализ уровня кассептина в группах сравнения, что явилось решением основной задачи данной части исследования. Поскольку, как было отмечено выше, первоначальная гипотеза состояла в установлении роли кассептина крови, как критерия стадии пубертата, уровень данного пептида был определен как в группе задержки полового развития, так и в обеих группах контроля, включавших мальчиков с физиологическим для возраста половым развитием. Полученные нами результаты опровергли первоначальное предположение и изменили представление о значимости уровня кассептина в крови. Так, в группах мальчиков с физиологическим для возраста сценарием полового развития, независимо от его стадии, были установлены сопоставимые значения уровня кассептина 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 кинспептина составила 31.2 пг/мл ($p=0.02$). При анализе уровня кинспептина внутри основной группы, где ранее не было выявлено статистических различий по клинико-биохимическим параметрам, также не было установлено различий кинспептина 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 подгруппы синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма в общую группу задержки полового развития по признаку отсутствия реактивации центральных отделов гонадостата в должном для этого возрасте. Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа показано, что уровень кинспептина 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 кинспептина 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 кинспептина крови наряду с установленным клинико-биохимическим фенотипом подростков, имеющих значимо более высокий уровень кинспептинемии при задержке полового развития центрального генеза по сравнению с мальчиками, не имеющими нарушений полового развития, позволяют обозначить новые регуляторные механизмы стероидогенеза со стороны кинспептина по принципу «обратной связи».

Полученные данные о повышении кинспептина 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 значений кинспептина при задержке полового развития и физиологическом течении пубертата (основная группа и группа контроля 1) под кривой ROC был установлен оптимальный

пороговый уровень кисспептина в крови для прогнозирования задержки полового созревания. Таким уровнем по данным ROC анализа, можно считать уровень кисспептина 16,9 пг/мл (чувствительность 73%, специфичность 92%, $p < 0,0001$).

Для уточнения возможных дифференциальных различий в значениях кисспептина для прогноза синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма подобные ROC-кривые были построены отдельно для значений кисспептина крови при каждом из названных состояний в сравнении со значениями в группе контроля 1. Пороговые значения кисспептина 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%, $p < 0,0001$).

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.

В заключение следует подчеркнуть, что основной идеей проведенного исследования явилось изучение роли кисспептинового сигналинга, играющего важную роль в физиологической регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, в части его влияния на центральные и периферические стероидчувствительные ткани, для расширения понимания механизмов патологии и поиска новых диагностических и терапевтических возможностей при нарушениях полового развития детей и подростков. Получены новые данные о значимом негативном влиянии дефицита андрогенов на рецепцию кисспептина в центральных и периферических отделах гонадостата, о регуляторной функции кисспептина по отношению к тестостерону по принципу «обратной связи», а также о недостаточной эффективности заместительной терапии дефицита андрогенов эфирами тестостерона с точки зрения репарации ранее произошедших дегенеративных и атрофических процессов. Транслируя полученные результаты в клиническую практику, рекомендованы оптимальные для прогнозирования

задержки полового развития у мальчиков пороговые значения кисспептина крови, не позволяющие, однако, дифференцировать функциональный либо органический генез патологии, и теоретически обоснована целесообразность апробации и внедрения новых терапевтических технологий лечения с включением кисспептина задержки полового развития в мужском поле.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально индуцированный гипогонадотропный гипогонадизм у самцов крыс ведет к нарушению периферического сигналинга лиганд-рецепторной системы кинспептина KISS1/KISS1R, представленного значительным снижением количества кинспептиновых 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 кинспептина.
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 кинспептиновых 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 кинспептиновых рецепторов в периферических андрогензависимых тканях у самцов крыс. На центральном уровне терапия тестостероном оказывает частичный положительный эффект на дегенеративные изменения в нейронах МЛН гипоталамуса, выражающийся в увеличении площади тел нейронов с 29,6 мкм² до 41,9 мкм², но не достигении 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 патологическая физиология, эндокринология, андрология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

АР – андрогеновые рецепторы

ГГГ ось – гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось

ГГ – гипогонадотропный гипогонадизм

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ИМТ - индекс массы тела

ИПФР-3 – инсулиноподобный фактор роста 3

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МАЯ – медиальное аркуатное ядро

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЦНС – центральная нервная система

HRP - пероксидаза хрена

KISS1R – рецептор кисспептина

KOR - κ-опиоидный рецептор

Me – медиана

SDS - Standart Deviation Score

TAC3 - тахикинин 3

TACR3 – рецептор тахикинина 3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Central Mechanism Controlling Pubertal Onset in Mammals: A Triggering Role of Kisspeptin / Y. Uenoyama [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2019. - Vol. 10. – P. 312.
2. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse / V.M. Navarro [et al.] // *J Neurosci*. – 2009. – Vol. 29, № 38. – P. 11859–11866.
3. New concepts on the control of the onset of puberty / S.R. Ojeda [et al.] // *Endocr Dev*. – 2010. – Vol. 17. – P. 44-51.
4. Дефект стероидогенного фактора 1 (SF1) как причина нарушения формирования 46XY (первое описание в отечественной литературе) / Н.Ю. Калинин [и др.] // *Проблемы эндокринологии*. - 2016. - Т. 62, № 1. - С. 55-59.
5. Болотова, Н.В. Задержка полового развития мальчиков / Н.В. Болотова, Н.Ю. Райгородская // *Проблемы эндокринологии*. - 2009. - Т. 55, № 5. - С. 19-23.
6. Болотова, Н.В. Психоэмоциональное состояние подростков с патологией репродуктивной системы / Н.В. Болотова, О.Л. Коновалова // *Лечащий врач*. - 2015. – Т. 1, № 1. - С. 14.
7. Определение риска развития репродуктивных нарушений у мальчиков подросткового возраста / Е.Ю. Загарских [и др.] // *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. - 2013. - № 6. - С. 10-16.
8. Gonadal Hormone-Dependent vs. -Independent Effects of Kisspeptin Signaling in the Control of Body Weight and Metabolic Homeostasis / I. Velasco [et al.] [Electronic resource] // *Metabolism*. – 2019. - P. S0026-0495(19)30116-7. – Available at: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(19\)30116-7/fulltext](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(19)30116-7/fulltext).
9. Vazquez, M.J. Novel mechanisms for the metabolic control of puberty: implications for pubertal alterations in early-onset obesity and malnutrition / M.J. Vazquez, I. Velasco, M. Tena-Sempere [Electronic resource] // *J Endocrinol*. – 2019.

- P. JOE-19-0223.R1. - <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/242/2/JOE-19-0223.xml>.
10. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54 / N. de Roux [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – Vol. 100, № 19. – P. 10972-10976.
11. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction / A.K. Topaloglu [et al.] // Nat. Genet. – 2009. – Vol. 41, № 3. – P. 354-358.
12. Сапронов, Н.С. Гонадолиберины / Н.С. Сапронов. - СПб.: Арт-экспресс, 2012. – 272 с.
13. Yang, L. Kisspeptin as a therapeutic target in reproduction / L. Yang, W. Dhillon // Expert Opin Ther Targets. – 2016. – Vol. 20, № 5. – P. 567-575.
14. Клинико-гормональная характеристика конституциональной задержки полового развития у мальчиков с ожирением: учеб. пособие / Л.Б. Бржезинская [и др.]. // Эндокринология: новости, мнения, обучение. - 2017. – Т. 20, № 3. - С. 78-84.
15. Морфотипы мальчиков с конституциональной задержкой пубертата / Л.Б. Осипова [и др.] // В книге: Достижения персонализированной медицины сегодня - результат практического здравоохранения завтра сборник тезисов VII Всероссийского конгресса эндокринологов. ФГБУ "Эндокринологический научный центр" Минздрава России; Министерство здравоохранения Российской Федерации; Общественная организация "Российская ассоциация эндокринологов". - 2016. - С. 355.
16. Дедов, И.И. Половое развитие детей: норма и патология / И.И. Дедов, Т.В. Семичева, В.А. Петеркова. - М.: Колорит студио, 2002. – 232 с.
17. Garcia-Falgueras, A. Sexual hormones and the Brain: an essential alliance for sexual identity and sexual orientation / A. Garcia-Falgueras, D.F. Swaab // Pediatric neuroendocrinology. – 2010. - Vol. 17. – P. 22-35.
18. Дедов, И.И. Руководство по детской эндокринологии / И.И. Дедов, Т.В. Семичева. - М.: Универсум Паблишинг, 2006. - 600 с.

19. Sex differences in fetal gonadotropins and androgens / S. Takagi [et al.] // *J Steroid Biochem.* – 1977. – Vol. 8, № 5. – P. 609–620.
20. Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations / F.I. Reyes [et al.] // *Clin Endocrinol Metab.* – 1974. – Vol. 38, № 4. – P. 612–617.
21. Petersen, C. The Sertoli cell: a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size / C. Petersen, O. Söder // *Horm Res.* – 2006. – Vol. 66, № 4. – P. 153–161.
22. Ivell, R. The molecular basis of cryptorchidism / R. Ivell, S. Hartung // *Mol Hum Reprod.* – 2003. – Vol. 9, № 4. – P. 175–181.
23. Wylie, C. Germ cells / C. Wylie // *Cell.* – 1999. – Vol. 96, № 2. – P. 165–174.
24. Pentikäinen, V. Male germ cell apoptosis / V. Pentikäinen, L. Dunkel, K. Erkkila // *Endocr Dev.* – 2003. – Vol. 5, - P. 56–80.
25. Matzuk, M.M. The biology of infertility: research advances and clinical challenges / M.M. Matzuk, D.J. Lamb // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14, № 11. - P. 1197–1213.
26. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor / P. Berta [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 29, № 348. – P. 448-450.
27. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY / R.J. Jäger [et al.] // *Nature.* – 1990. - Vol. 29, № 348. – P. 452-454.
28. Rosenfeld, C.S. Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not? / C.S. Rosenfeld // *Front Neurosci.* – 2017. – Vol. 16, № 11. – P. 1-632.
29. She, Z.Y. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development / Z.Y. She, W.X. Yang // *Semin Cell Dev Biol.* – 2017. – Vol. 63. – P. 13-22.

30. Larney, C. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry / C. Larney, T.L. Bailey, P. Koopman // *Development*. – 2014. – Vol. 141, № 11. – P. 2195-2205.
31. Морфофункциональная характеристика гонад у детей с различными вариантами нарушения формирования пола в период мини пубертата / Н.Ю. Райгородская [и др.] // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. - 2016. - Т. 95, № 1. - С. 46-50.
32. Райгородская, Н.Ю. Референсные значения гонадотропинов и половых гормонов у здоровых мальчиков 1 – 3 месяцев / Н.Ю. Райгородская, Н.В. Болотова, Н.Б. Захарова, О.В. Львова // *Бюллетень сибирской медицины*. - 2014. - Т. 13, № 2. - С. 38-41.
33. Schoonjans, F. MedCalc manual: Easy-to-use statistical software. Independently published. - 2017. – P. 355.
34. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation / K. L. Hu [et al.] // *Hum Reprod Update*. – 2019. – Vol. 25, № 3. – P. 326-343.
35. Negative fetal FSH/LH regulation in late pregnancy is associated with declined kisspeptin/KISS1R expression in the tuberal hypothalamus / F. Guimiot [et al.] // *Clin Endocrinol Metab*. – 2012. – Vol. 97, № 12. - P. 2221– 2229.
36. Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life / I. Bergadá [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. - 2006. - Vol. 91, № 10. - P. 4092 – 4098.
37. Pituitary-gonadal relations in infancy. I. Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee / J.S. Winter [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1975. – Vol. 40, № 4. – P. 545–551.
38. Plasma estrogens in childhood and puberty under physiologic and pathologic conditions / F. Bidlingmaier [et al.] // *Pediatr Res*. – 1973. – Vol. 7, № 11. – P. 901–907.

39. Grinspon, R. P. Anti-Mullerian Hormone and Sertoli Cell Function in Paediatric Male Hypogonadism / R.P. Grinspon, R.A. Rey // *Horm. Research in Pediatrics*. - 2010. - Vol. 73, № 2. - P. 81-92.
40. Testosterone measured in infancy predicts subsequent sex-typed behavior in boys and in girls / A. Lamminmaki [et al.] // *Horm Behav.* – 2012. – Vol. 61, № 4. – P. 611–616.
41. Zivkovic, D. Development of Sertoli Cells during Mini-Puberty in Normal and Cryptorchid Testes / D. Zivkovic, F. Hadziselimovic // *J Urol.* - 2009. - Vol. 82, № 1. - P. 89-91.
42. Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P - 450scc in the human early prepubertal testis / E.B. Berensztein [et al.] // *Pediatr Res.* - 2006. - Vol. 60, № 6. - P. 740 - 744.
43. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells / H.E. Chemes [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2008. – Vol. 93, № 11. – P. 4408–4412.
44. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti - Müllerian hormone repression during early human testis development / K. Boukari [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2009. - Vol. 94, № 5. - P. 1818 - 1825.
45. Ontogeny of the androgen receptor expression in the foetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis / R.A. Rey [et al.] // *Microsc Res Tech.* - 2009. – Vol. 72, № 11. – P. 787–795.
46. Changes in anti - Mullerian hormone (AMH) throughout the life span: a population - based study of 1027 healthy males from birth (Cord Blood) to the age of 69 years / L. Aksglæde [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2010. - Vol. 95, № 12. - P. 5357 - 5364.

47. Early onset of primary hypogonadism revealed by serum anti - Mullerian hormone determination during infancy and childhood in trisomy 21 / R.P. Grinspon [et al.] // *Int J Androl.* – 2011. – Vol. 34, № 35. – P. 487 – 498.
48. Sexual dimorphism in circulating monomeric and dimeric inhibins in normal boys and girls from birth to puberty / I. Bergadá [et al.] // *Clin Endocrinol.* – 1999. – Vol. 51, № 4. – P. 455–460.
49. Andersson, A. Serum inhibin B levels during male childhood and puberty / A. Andersson, N.E. Skakkebaek // *Mol Cell Endocrinol.* – 2001. – Vol. 180, № 1. – P. 103–107.
50. Andersson, A.M. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels / A.M. Andersson, J. Müller, N.E. Skakkebaek // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1998. – Vol. 83, № 12. – P. 4451–4458.
51. Pasqualini, T. Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism / T. Pasqualini, H. Chemes, M.A. Rivarola // *Clin Endocrinol.* – 1981. – Vol. 15, № 6. P. - 545–554.
52. Altered serum profile of inhibin B, Pro - alphaC and anti - Mullerian hormone in prepubertal and pubertal boys with varicocele / R.V. Trigo [et al.] // *Clin Endocrinol.* – 2004. – Vol. 60, № 6. - P. - 758 – 764.
53. Huhtaniemi, I.T. The role of mutations affecting gonadotrophin secretion and action in disorders of pubertal development / I.T. Huhtaniemi // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2002. – Vol.16, № 1. – P. 123–138.
54. Antimüllerian hormone in patients with hypogonadotropic hypogonadism / J. Young [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 8. – P. 2696–2699.
55. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children / J.C. Carel [et al.] // *Pediatrics.* – 2009. – Vol. 123, № 4. – P. 752-762.

56. Terasawa, E. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: mechanism of pulsatile LHRH release / E. Terasawa // *Vitam Horm.* – 2001. – Vol. 63. – P. 91-129.
57. Соловьева, В.С. Морфологические особенности подростков в периоде полового созревания (в этно-территориальном разрезе): автореф. дис. канд. биол. Наук / Соловьева Валентина Сергеевна. - М., 1966. - 20 с.
58. Tanner, J.M. Clinical longitudinal standarts for height and height velocity for North American children / J. M. Tanner, P.S. Davies // *J Pediatr.* – 1985. – Vol. 107, № 3. – P. 317-329.
59. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network / M.E. Herman-Giddens [et al.] // *Pediatrics.* – 1997. – Vol. 99, № 4. – P. 505-512.
60. Current age of onset of puberty / R.L. Rosenfield [et al.] // *Pediatrics.* – 2000. – Vol. 106, № 3. – P. 622– 623.
61. Lee, P.A. Age of puberty among girls and the diagnosis of precocious puberty / P.A. Lee, H.E. Kulin, S.G. Shumei // *Pediatrics.* – 2001. - Vol. 107, № 6. – P. 1493–1494.
62. Властовский, В. Г. Акселерация роста и развития детей: эпохальная и внутригрупповая / В.Г. Властовский. - М.: - Изд-во МГУ, 1976. – 279 с.
63. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones / A.V. Schally [et al.] // *Science.* – 1971. – Vol. 173, № 4001. – P. 1036–1038.
64. Plant, T.M. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades / T.M. Plant // *J Neuroendocrinol.* – 2008. – Vol. 20, № 6. – P. 719-26.
65. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty / K. Sorensen [et al.] // *Horm Res Paediatr.* – 2012. – Vol. 77, № 3. – P. 137–145.

66. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration / A.S. Parent [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2003. – Vol. 24, № 5. – P. 668–693.
67. Никитина, И.Л. Старт пубертата – известное и новое / И.Л. Никитина // *Артериальная гипертензия.* – 2013. – Т. 19, № 3. – С. 227-236.
68. Pulsatile GnRH secretion: roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels / L.Z. Krsmanovic [et al.] // *Moll. Cell. Endocrinol.* – 2010. - Vol. 314, № 2. – P. 158-163.
69. Javed, Z. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis - current perspective / Z. Javed, U. Qamar, T. Sathyapalan // *Endokrynol. Pol.* – 2015. – Vol. 66, № 6. – P. 534-47.
70. The GPR54 gene as a regulator of puberty / S.B. Seminara [et al.] // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 349, № 17. – P. 1614- 1627.
71. Liu, X. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels / X. Liu, K. Lee, A.E. Herbison // *Endocrinology.* – 2008. – Vol. 149, № 9. – P. 4605-4514.
72. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene / J.H. Lee [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 1996. – Vol. 88, № 23. – P. 1731-7.
73. Gottsch, M.L. From KISS1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature / M.L. Gottsch, D.K. Clifton, R.A. Steiner // *Peptides.* – 2009. - Vol. 30, № 1. – P. 4-9.
74. Franssen, D. The kisspeptin receptor: A key G-protein-coupled receptor in the control of the reproductive axis / D. Franssen, M. Tena-Sempere // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2018. – Vol. 32, № 2. – P. 107-123.
75. Molecular evolution of GPCRs: Kisspeptin/kisspeptin receptors / J. Pasquier [et al.] // *J Mol Endocrinol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 101-117.
76. Physical association of GPR54 C-terminal with protein phosphatase 2A / B.J. Evans [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – Vol. 377. – P. 1067–1071.

77. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54 / M. Kotani [et al.] // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 37. – P. 34631-43636.
78. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor / T. Ohtaki [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 411, № 6837. – P. 613-617.
79. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1 / A.I. Muir [et al.] // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 31. – P. 28969–28975.
80. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction / F. Gaytán [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2009. – Vol. 296, № 3. – P. 520-531.
81. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts / M. Bilban [et al.] // *J Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117. – P. 1319–1328.
82. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys / A.M. Rometo [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 7. – P. 2744–2750.
83. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons / E. Hrabovszky [et al.] // *Eur J Neurosci.* – 2010. – Vol. 31, № 11. – P. 1984–1998.
84. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse / M.L. Gottsch [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, № 9. – P. 4073–4077.
85. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse / J.T. Smith [et al.] // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146, № 9. – P. 3686–3692.
86. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain / J. Clarkson [et al.] // *J Neuroendocrinol.* – 2009. – Vol. 21, № 8. – P. 673–682.

87. Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse / J. Kim [et al.] // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152, № 5. – P. 2020–2030.
88. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 / S. Messenger [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – Vol. 102, № 5. – P. 1761–1766.
89. Parhar, I.S. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish / I.S. Parhar, S. Ogawa, Y. Sakuma // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145, № 8. – P. 3613–3618.
90. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat / M.S. Irwig [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 2004. – Vol. 80, № 4. – P. 264–272.
91. Pielecka-Fortuna, J. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol / J. Pielecka-Fortuna, Z. Chu, S.M. Moenter // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149, № 4. – P. 1979–1986.
92. Liu, X. Small-conductance calcium-activated potassium channels control excitability and firing dynamics in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons / X. Liu, A.E. Herbison // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149, № 7. – P. 3598–3604.
93. Three Siblings with Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism in a Nonconsanguineous Family: A Novel KISS1R/GPR54 Loss-of-Function Mutation / O. Nalbantoglu [et al.] [Electronic resource] // *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. – 2019. – P. jcrpe-2018-0230.R1. - Available at: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_25992/JCRPE-0-0-En.pdf.
94. Nonstop mutation in the Kisspeptin 1 receptor (KISS1R) gene causes normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism / M. Moalla [et al.] // *J Assist Reprod Genet*. – 2019. – Vol. 36, № 6. – P. 1273-1280.

95. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism / F. Lanfranco [et al.] // *Eur J Endocrinol.* – 2005. – Vol. 153, № 6. – P. 845–852.
96. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism / M.G. Teles [et al.] // *Eur J Endocrinol.* – 2010. – Vol. 163, № 1. – P. 29–34.
97. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family / R. Nimri [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – Vol. 96, №3. – P. 536–545.
98. Seminara, S.B. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations / S.B. Seminara, F.J. Hayes, W.F. Jr. Crowley // *Endocr Rev.* – 1998. – Vol. 19. – P. 521–539.
99. Bianco, S.D. Molecular biology of the kisspeptin receptor: signaling, function, and mutations / S.D. Bianco, U.B. Kaiser // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. – Vol. 784. – P. 133–158.
100. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system / S. Funes [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 312, № 4. – P. 1357–1363.
101. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice / R. Lapatto [et al.] // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, № 10. – P. 4927–4936.
102. Seminara, S.B. Kisspeptin in reproduction / S.B. Seminara // *Semin Reprod Med.* – 2007. – Vol. 25, № 5. – P. 337–343.
103. Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron / M. Kirilov [et al.] // *Nat Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2492.
104. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54 / V.M. Navarro [et al.] // *J Physiol.* – 2004. – Vol. 561. – P. 379–386.
105. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents / J. Roa [et al.] // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 57–66.

106. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function / J. Roa [et al.] // *Front Neuroendocrinol.* – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 48–69.
107. Oakley, A.E. Kisspeptin signaling in the brain / A.E. Oakley, D.K. Clifton, R.A. Steiner // *Endocr Rev.* – 2009. – Vol. 30, № 6. – P. 713–743.
108. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms / L. Pinilla [et al.] // *Physiol Rev.* – 2012. – Vol. 92, № 3. – P. 1235–1316.
109. Crowley, W.F. New genes controlling human reproduction and how you find them / W.F. Jr. Crowley, N. Pitteloud, S. Seminara // *Trans Am Clin Climatol Assoc.* – 2008. – Vol. 119. – P. 29-37.
110. Direct Actions of Kisspeptins on GnRH Neurons Permit Attainment of Fertility but are Insufficient to Fully Preserve Gonadotropic Axis Activity / S. Leon [et al.] [Electronic resource] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 19206. – Available at: <https://www.nature.com/articles/srep19206.pdf>.
111. Clarkson, J. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons / J. Clarkson, A.E. Herbison // *Endocrinology.* – 2006. – Vol. 147, № 12. – P. 5817–5825.
112. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat / A.S. Kauffman [et al.] // *Endocrinology.* – 2007. – Vol. 148, № 4. – P. 1774–1783.
113. Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women / E. Hrabovszky [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2011. – Vol. 2. – P. 80.
114. Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse / J. Clarkson [et al.] // *J Neuroendocrinol.* – 2012. – Vol. 24, № 6. – P. 907–915.
115. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats / S.

Adachi [et al.] // *Journal of Reproduction and Development*. – 2007. – Vol. 53, № 2. – P. 367–378.

116. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha / I. Franceschini [et al.] // *Neurosci Lett*. – 2006. – Vol. 401, № 3. – P. 225–230.

117. Role of Kisspeptin and Neurokinin B Signaling in Male Rhesus Monkey Puberty / J.P. Garcia [et al.] // *E.Endocrinology*. – 2018. - Vol. 159, № 8. – P. 3048-3060.

118. Role of Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty in Female Non-Human Primates / E. Terasawa [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 9. – P. 148.

119. Kisspeptin nucleus in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B / R.L. Goodman [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148, № 12. – P. 5752-5760.

120. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications / J. Young [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 2013. – Vol. 97, № 2. – P. 193–202.

121. 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. – Vol. 151, № 8. – P. 3479–3489.

122. Rance, N.E. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback / N.E. Rance // *Peptides*. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 111–122.

123. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor / T. Guran [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94, № 10. – P. 3633–3639.

124. Wuster, M. Opiate activity and receptor selectivity of dynorphin1-13 and related peptides / M. Wuster, R. Schulz, A. Herz // *Neurosci Lett.* – 1980. – Vol. 20, № 1. – P. 79–83.
125. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep / R.L. Goodman [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, № 6. – P. 2959–2967.
126. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans / J. Young [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95, № 5. – P. 2287–2295.
127. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications / J. Young [et al.] // *Neuroendocrinology.* – 2013. – Vol. 97, № 2. – P. 193–202.
128. Rometo, A.M. Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women / A.M. Rometo, N.E. Rance // *J Neuroendocrinol.* – 2008. – Vol. 20, № 12. – P. 1376–1381.
129. Gallo, R.V. Kappa-opioid receptor involvement in the regulation of pulsatile luteinizing hormone release during early pregnancy in the rat / R.V. Gallo // *J Neuroendocrinol.* – 1990. – Vol. 2, № 5. – P. 685–691.
130. Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways / M.L. Gottsch [et al.] // *J Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, № 29. – P. 9390–9395.
131. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta / Y. Terao [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2004. – Vol. 1678, №2-3. – P. 102-110.
132. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract / R.A. Cejudo [et al.] // *Fertil Steril.* – 2012. – Vol. 97, № 5. – P. 1213-1219.
133. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? / J.M. Castellano [et al.] // *Endocrinology.* – 2006. – Vol. 147, № 10. – P. 4852-4862.

134. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion / F. Gaytan [et al.] // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155, № 8. – P. 3088-3097.
135. Loss of Ntrk2/Kiss1r signaling in oocytes causes premature ovarian failure / M.D. Dorfman [et al.] // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155, №8. – P. 3098–3111.
136. Intratesticular action of kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) / S. Irfan [et al.] // *Andrologia*. – 2014. – Vol. 46, № 6. – P. 610-617.
137. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa / F.M. Pinto [et al.] // *Int J Androl*. – 2012. – Vol. 35, № 1. – P. 63-73.
138. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa / M.C. Hsu [et al.] // *Reproduction*. – 2014. – Vol. 147, № 6. – P. 835-845.
139. Roseweir, A.K. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells / A.K. Roseweir, A.A. Katz, R.P. Millar // *Placenta*. – 2012. – Vol. 33, № 5. – P. 408-415.
140. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans / Y. Horikoshi [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2003. – Vol. 88, № 2. – P. 914-919.
141. Reduced levels of plasma kisspeptin during the antenatal booking visit are associated with increased risk of miscarriage / C.N. Jayasena [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2014. – Vol. 99, № 12. – P. 2652-2660.
142. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells / J.L. Janneau [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2002. – Vol. 87, № 11. – P. 5336-5339.
143. Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-eclampsia / J.J. Logie [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2012. – Vol. 76, № 6. – P. 887-893.
144. Decreased plasma levels of metastin in early pregnancy are associated with small for gestational age neonates / E.M. Smets [et al.] // *Prenat Diagn*. – 2008. – Vol. 28, № 4. – P. 299-303.

145. Plasma kisspeptin levels in pregnancies with diabetes and hypertensive disease as a potential marker of placental dysfunction and adverse perinatal outcome / A. Cetković [et al.] // *Endocr Res.* – 2012. – Vol. 37, № 2. – P. 78-88.
146. Expression of Kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women with recurrent pregnancy loss / D.W. Park [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2012. – Vol. 67, № 2. – P. 132-139.
147. Association of kisspeptin-10 levels with abortus imminens: a preliminary study / S. Kavvasoglu [et al.] // *Arch Gynecol Obstet.* – 2012. – Vol. 285, № 3. – P. 649-653.
148. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women / W.S. Dhillon [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 10. – P. 3958-3966.
149. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans / C.N. Jayasena [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – Vol. 96, № 12. – P. 1963-1972.
150. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle / Y.M. Chan [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2012. – Vol. 97, № 8. – P. 1458-1467.
151. Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms / R.M. Luque [et al.] // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152, № 3. – P. 957-966.
152. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons / R.E. Szawka [et al.] // *Endocrinology.* – 2010. – Vol. 151, № 7. – P. 3247-3257.
153. Acute and chronic effects of kisspeptin-54 administration on GH, prolactin and TSH secretion in healthy women / C.N. Jayasena [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2014. – Vol. 81, № 6. – P. 891-898.
154. Acute and subacute effects of a synthetic kisspeptin analog, C6, on serum concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and testosterone

in prepubertal bull calves / P.A. Parker [et al.] // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 130. – P. 111-119.

155. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men / J.T. George [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2011. – Vol. 96, № 8. – P. 1228-1236.

156. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis / C.N. Jayasena [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94, № 11. – P. 4315-4323.

157. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea / C.N. Jayasena [et al.] // *Clin Pharmacol Ther*. – 2010. – Vol. 88, № 6. – P. 840-847.

158. Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men / C.N. Jayasena [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2011. – Vol. 96, № 6. – P. 908-915.

159. A single injection of kisspeptin-54 temporarily increases luteinizing hormone pulsatility in healthy women / C.N. Jayasena [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 2013. – Vol. 79, № 4. – P. 558-563.

160. Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of Kisspeptin-54 / C.N. Jayasena [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2014. – Vol. 99, № 6. – P. 953-961.

161. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications / J. Young [et al.] // *Neuroendocrinology*. – 2013. – Vol. 97, № 2. – P. 193-202.

162. Changes in the Responsiveness of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis to Kisspeptin-10 Administration during Pubertal Transition in Boys / G. Nabi [et al.] [Electronic resource] // *Int J Endocrinol*. – 2018. – P. 1475967. - Available at: www.hindawi.com/journals/ije/2018/1475967.

163. Divergent responses to kisspeptin in children with delayed puberty / Y.M. Chan [et al.] [Electronic resource] // JCI Insight. – 2018. – Vol 3, № 8. – P. 99109. - Available at: <https://insight.jci.org/articles/view/99109>.
164. Male hypogonadism: an extended classification based on a developmental, endocrine physiology-based approach / R.A. Rey [et al.] // Andrology. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 3–16.
165. Non - syndromic congenital hypogonadotropic hypogonadism: clinical presentation and genotype - phenotype relationships / F. Brioude [et al.] // Eur J Endocrinol. – 2010. – Vol. 162, № 5. – P. 835 – 851.
166. Rey, R.A. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development / R.A. Rey, R.P. Grinspon // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2011. – Vol. 25, №2. – P. 221–238.
167. Increased activity of the hypothalamic - pituitary - testicular axis in infancy results in increased androgen action in premature boys / T. Kuiri-Hanninen [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2011. – Vol. 96, № 1. – P. 98 – 105.
168. Grumbach, M.M. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant / M.M. Grumbach // J Clin Endocrinol Metab. – 2005. – Vol. 90, № 5. – P. 3122–3127.
169. Investigation, treatment and monitoring of late - onset hypogonadism in males / C. Wang [et al.] // Int J Androl. – 2009. – Vol. 32, № 1. – P. 1 – 10.
170. Insulin - like growth factor I (IGF - I) and IGF - binding protein 3 as diagnostic markers of growth hormone deficiency in infancy / R.B. Jensen [et al.] // Horm Res. – 2005. – Vol. 63, № 1. – P. 15 – 21.
171. Effects of an early postnatal treatment of hypogonadotropic hypogonadism with a continuous subcutaneous infusion of recombinant Follicle - Stimulating hormone and Luteinizing hormone / P. Bougnères [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2008. – Vol. 93, № 6. – P. 2202–2205.

172. Neonatal gonadotropin therapy in male congenital hypogonadotropic hypogonadism / C. Bouvattier [et al.] // *Nat Rev Endocrinol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 172–182.
173. Testicular anti-mullerian hormone secretion is stimulated by recombinant human FSH in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism / J. Young [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – Vol. 90, № 2. – P. 724-728.
174. Plasma inhibin B and antimullerian hormone concentrations in boys: discriminating between congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional pubertal delay / L. Adan [et al.] // *Med Sci Monit.* – 2010. – Vol. 16, № 11. – P. 511–517.
175. Basal Follicle - Stimulating Hormone and peak gonadotropin levels after gonadotropin - releasing hormone infusion show high diagnostic accuracy in boys with suspicion of hypogonadotropic hypogonadism / R.P. Grinspon [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2010. – Vol. 95, № 6. – P. 2811–2818.
176. Hypogonadism in patients with acromegaly: data from the multi - centre acromegaly registry pilot study / L. Katznelson [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf).* – 2001. – Vol. 54, № 2. – P. 183 – 188.
177. Meikle, A.W. The interrelationships between thyroid dysfunction and hypogonadism in men and boys / A.W. Meikle // *Thyroid.* – 2004. – Suppl. 1. – P. 17–25.
178. Rogol, A.D. Drugs of abuse and the adolescent athlete / A.D. Rogol // *Ital J Pediatr.* – 2010. – Vol. 36. – P. 19.
179. Способ лечения конституциональной задержки полового развития у мальчиков (клинический пример) / Синицына А.А. [и др.] // *Вопросы современной педиатрии.* - 2012. - Т. 11, № 6. - С. 138-141.
180. Rastrelli, G. Different medications for hypogonadotropic hypogonadism / G. Rastrelli., L. Vignozzi, M. Maggi // *Endocr. Dev.* – 2016. – Vol. 30. – P. 60–78.

181. Corbier, P. Female sexual behavior in male rats: effect of hour of castration at birth / P. Corbier, J. Roffi, J. Rhoda // *Physiol Behav.* – 1983. – Vol. 30, № 4. – P. 613-616.
182. Effect of post-natal castration on sepsis mortality in rats / J.A. Bernhardt [et al.] // *Acta Cir Bras.* – 2007. – Vol. 22, № 1. – P. 22-29.
183. Мыслицкий, В.Ф. Половая дифференциация некоторых структур лимбической системы головного мозга крыс в онтогенезе: автореф. дис. доктора биол. наук / Мыслицкий Валентин Францевич. – М., 1990. – 32 с.
184. Резников А.Г. Функциональная тератология нейроэндокринной системы: этиология, патогенез, профилактика // *Здоров'я України.* – 2007. – № 22/1. – С. 19–21.
185. Differential effects of the perinatal steroid environment on three sexually dimorphic parameters of the rat brain / R.J. Handa [et al.] // *Biol Reprod.* – 1985. – Vol. 32, № 4. – P. 855-864.
186. Шишкина, И.В. Рецепторы к половым гормонам в гипоталамусе и их роль в половой дифференцировке мозга у крыс: автореф. дис. канд. биол. наук / Шишкина Ирина Владимировна. – М., 1984. – 23 с.
187. Estrogens, But Not Androgens, Regulate Expression and Functional Activity of Oxytocin Receptor in Rabbit Epididymis / S. Filippi [et al.] // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143. – P. 4271–4280.
188. Oxytocin Receptor Is Expressed in the Penis and Mediates an Estrogen-Dependent Smooth Muscle Contractility / L. Vignozzi [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145, № 4. – P. 1823-34.
189. Androgens Regulate Phosphodiesterase Type 5 Expression and Functional Activity in Corpora Cavernosa / A. Morelli [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145. – P. 2253–2263.
190. Байрамов, А.А. Андроген-зависимое влияние М-холинолитика метамизила на биоэлектрическую активность головного мозга / А.А. Байрамов, Н.Н. Кузнецова // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2006, - т. 6, № 1-2. - С. 1197-2003.

191. Жаботинский, Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона / Ю.М. Жаботинский. – Л.: Медицина, 1965. – 328 с.
192. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project / J. Villar [et al.] // *Lancet*. – 2014. – Vol. 384, № 9946. – P. 857-868.
193. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression / A.C. Dalkin [et al.] // *Endocrinology*. – 1989. – Vol. 125. – P. 917–924.
194. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor / A. Wilkins [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, № 12. – P. 4967 – 4974.
195. Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders / H. Clarke [et al.] // *Endocr & Metab.* – 2015. – Vol. 30. – P. 124-141.
196. Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macacamulatta*): a finding with therapeutic implications / S.B. Seminara [et al.] // *Endocrinology*. – 2006. – Vol. 147, № 5. – P. 2122–2126.
197. Lomniczi, A. The emerging role of epigenetics in the regulation of female puberty: in Bourguignon J-P, Parent A-S (eds): *Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders* / A. Lomniczi, S.R. Ojeda // *Endocr Dev. Basel, Karger*. – 2016. – Vol. 29. – P. 1-16.
198. Willemsen, R.H. Normal variations in pubertal timing: genetic determinants in relation to growth and adiposity: in Bourguignon J-P, Parent A-S (eds): *Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders* / R.H. Willemsen, D.B. Dunger // *Endocr Dev. Basel, Karger*. – 2016. – Vol. 29. – P. 17-35.

199. Ojeda, S.R. Neuroendocrine regulation of puberty / S.R. Ojeda, E. Terasawa // *Hormones, Brain and Behavior*. – 2002. – Vol. 4. – P. 589 – 659.
200. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty / S.R. Ojeda [et al.] // *Ann. Med.* – 2003. – Vol. 35, № 4. – P. 244 –255.
201. Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty / S.R. Ojeda [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 324, № 1-2. – P. 3 – 11.
202. Ronnekleiv, O.K. Kisspeptin Excitation of GnRH Neurons / O.K. Ronnekleiv, M.J. Kelly // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 784. – P. 113 – 131.
203. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines / H.J. Novaira [et al.] // *Molec. Cel. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 311. – P. 126 – 134.
204. Plasma kisspeptin levels in male cases with hypogonadism / M. Kotani [et al.] // *Endocrine Journal*. – 2014. – Vol. 61, № 11. – P. 1137-1140.
205. Age-dependent elevations in plasma kisspeptin are observed in boys and girls when compared with adults / C.N. Jayasena [et al.] // *Ann Clin Biochem.* – 2013. – Vol. 51, Pt. 1. – P. 89-96.