

## СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАРТА ПУБЕРТАТА И ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ. ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R

Никитина И. Л., Юхлина Ю. Н., Саракаева Л. Р., Плаксина А. О.,  
Байрамов А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр имени  
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**  
Никитина Ирина Леоровна,  
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России,  
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: nikitina0901@gmail.com

Статья поступила в редакцию 24.09.2020  
и принята к печати 12.10.2020.

### Резюме

**Актуальность.** Система кисспептина играет ключевую роль в нейроэндокринной регуляции репродуктивной оси, механизмов старта пубертата и фертильности. Изучение фундаментальных принципов функционирования системы кисспептина позволит транслировать в клиническую практику новый терапевтический и диагностический подход к лечению гипогонадотропного гипогонадизма и задержки старта пубертата у детей. **Цель.** Оценка функциональной активности системы кисспептина и ее роли в генезе задержки старта пубертата. **Материалы и методы.** В экспериментальную часть исследования включено 53 особи крыс линии Wistar мужского пола. В клиническое исследование было включено 75 соматически здоровых мальчиков. Экспрессия рецепторов к кисспептину в центральных андрогензависимых тканях определялась иммуногистохимическим методом. Концентрацию рецепторов KISS1R и уровень кисспептина в плазме крови определяли методом ИФА. Определение уровня лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминисцентным методом. **Результаты.** Выявлена отрицательная обратная связь между концентрацией кисспептина и тестостерона плазмы как в экспериментальном, так и в клиническом разделе исследования. Гипотестостеронемия приводит к значимому снижению количества кисспептиновых рецепторов в андроген-зависимых тканях. В условиях дефицита тестостерона в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса развиваются дегенеративно-дистрофические изменения, подвергающиеся частичному обратному развитию на фоне терапии тестостероном. Уровень кисспептина значимо повышается при задержке полового развития. Установлен пороговый уровень кисспептина в крови для прогнозирования задержки полового созревания — 16,9 пг/мл. **Заключение.** Полученные результаты указывают на важность трансляции их в клиническую практику с целью анализа кисспептиновой регуляции при центральных вариантах задержки полового развития.

**Ключевые слова:** гипогонадизм, гонадотропин-рилизинг гормон, кисспептин, мальчики, пубертат, тестостерон.

Для цитирования: Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Саракаева Л.Р. и др. Современная концепция нейроэндокринной и эпигенетической регуляции старта пубертата и полового развития. Трансляционные исследования роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 62-80. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-62-80

# MODERN CONCEPT OF NEUROENDOCRINE AND EPIGENETIC REGULATION OF THE ONSET OF PUBERTY AND SEXUAL DEVELOPMENT. TRANSLATIONAL STUDIES ON THE ROLE OF THE KISS/KISS1R SYSTEM

Nikitina I. L., Yuchlina Y. N., Sarakaeva L. R., Plaksina A. O., Bayramov A. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:**

Nikitina Irina L.,  
Almazov National Medical Research Centre,  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,  
197341.

E-mail: nikitina0901@gmail.com

Received 24 September 2020; accepted  
12 October 2020.

## Abstract

**Background.** Kisspeptin system plays a fundamental role in the neuroendocrine control of hypothalamic-pituitary-gonadal axis, initiation of puberty and fertility. These observations suggest that kisspeptin system is a potential novel therapeutic and diagnostic approach for treating children with delayed puberty and hypogonadotropic hypogonadism and is currently a focus of translational research. **Objective.** Estimation of the functional activity of the kisspeptin system and its role in the genesis of delayed puberty. **Design and methods.** The experimental part of the study included 53 male Wistar rats. The clinical part of the study included 75 somatically healthy boys. The expression levels of kisspeptin receptors KISS1R in central androgen dependent tissues were evaluated by immunohistochemical method. Kisspeptin receptor levels and serum levels of kisspeptin were assessed by ELISA. Serum levels of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone were evaluated by chemiluminescent immunoassay. **Results.** A negative regulatory feedback was established between the concentration of kisspeptin and plasma testosterone both in the experimental and clinical parts of the study. Hypotestosteronemia leads to a significant decrease in the number of kisspeptin receptors in androgen-dependent tissues. Low testosterone levels cause degenerative-dystrophic changes in the neurons of the medial arcuate nucleus of the hypothalamus, which undergo partial regression during testosterone therapy. The level of kisspeptin significantly increases in individuals with delayed puberty. Serum kisspeptin levels exceeding 16.9 pg/ml is a reliable predictor of delayed puberty. **Conclusion.** Obtained results indicate the importance of translating them into clinical practice in order to substantiate novel diagnostic and therapeutic approach to the management of central forms of delayed puberty.

**Key words:** boys, gonadotropin-releasing hormone, hypogonadism, kisspeptin, puberty, testosterone.

*For citation: Nikitina IL, Yuchlina YN, Sarakaeva LR, et al. Modern concept of neuroendocrine and epigenetic regulation of the onset of puberty and sexual development. Translational studies on the role of the KISS/KISS1R system. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 62-80. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-62-80*

**Список сокращений:** AP — андрогеновые рецепторы, ГГГ-ось — гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, ГнРГ — гонадотропин-рилизинг-гормон, ИМТ — индекс массы тела, ЛГ — лютеинизирующий гормон, МАЯ — медиальное аркуатное ядро, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ЦНС — центральная нервная система, KISS1R — рецептор кисспептина, KNDу — нейроны системы кисспептин, нейрокинин В, динорфин.

## Актуальность

Процесс функционального формирования репродуктивной системы является мультиэтапным, стартует в раннем эмбриогенезе и завершается по окончании периода пубертата полной анатомической и функциональной зрелостью, а также способностью к воспроизводству и поддержанию вида. Регуляторные механизмы, определяющие последовательность половой дифференцировки и достижение половой зрелости, являются предметом

продолжающихся исследований. В настоящее время хорошо изучены механизмы регуляторной активности иерархически расположенных отделов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГ-оси), клиническими проявлениями этапов активации и реактивации которой являются последовательные смены стадий полового развития. К последним относятся дифференцировка половой системы в эмбриогенезе, минипубертат в раннем возрасте после рождения, за которым следует так называемая «ювенальная пауза», сменяющаяся пубертатом с последующим формированием половой системы взрослого, способной к фертильности. Гормональные механизмы, определяющие смену данных этапов полового развития, представлены изменением пульсаторной секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) нейросекреторными ядрами гипоталамуса [1, 2]. При этом поиск регуляторов, влияющих на возраст, в котором возрастает секреция ГнРГ, на частоту и интенсивность его пульсаторных выбросов, продолжается и представляет важность для дальнейших исследований. Известно, что физиологический пубертат имеет значительные индивидуальные колебания в возрасте старта (женский пол — с 8 до 13 лет; мужской пол — с 9 до 14 лет), а также продолжительности. К числу нормальных вариантов пубертата могут быть отнесены поздний возрастной старт с быстрой прогрессией. Либо, напротив, раннее начало с различными по темпам сценариями прогрессии и достижения половой зрелости. Данные наблюдения привели к попыткам пересмотра возрастных норм физиологического старта пубертата некоторыми обществами детских эндокринологов (США и др.). Однако впоследствии данные рекомендации не нашли подтверждения, и были возвращены прежние сроки старта пубертата. Однако изучение регуляторных процессов, определяющих пубертатную реактивацию гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, продолжается. В исследованиях установлена секреция ГнРГ задолго до начала пубертата, что позволило предположить роль других факторов, кроме ГнРГ, в запуске его старта [3]. Значимым открытием последних лет является разработка новой концепции старта пубертата. Она основана на установлении роли иерархической транскрипционной активности генов, на которую влияет ряд эпигенетических факторов регуляции. Информационный сигналинг при этом реализуется посредством секреции нейротрансмиттеров и гормонов, передающих сигналы на область нейросекреторных нейронов гипоталамуса, секретирующих ГнРГ, запускающего, в свою очередь, гормональную гонадотропную регуляцию нижележащих отделов центральной нервной системы (ЦНС). [1, 2, 4, 5].

Согласно современным представлениям, поступление информации в ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса обеспечивается эпигенетическим контролем групп генов, обеспечивающих супрессию (активацию) трансинаптического межнейронального сигналинга кисспептиновых нейронов, синхронизированных с нейронами системы KNDy (динорфин, нейрокинин В, кисспептин). Супрессия либо активация секреции ГнРГ обеспечивается информацией, поступающей от одной из двух групп генов — Polycombgroup (PcG), транскрипционные ингибиторы и Trithoraxgroup (TrxG), транскрипционные активаторы, подвергающиеся эпигенетическому контролю (деацетилирование гистонов, не кодируемые микроРНК, гиперметилирование ДНК и др.). Преобладание информации с активаторной или супрессорной группы генов на секреторные нейроны, которые продуцируют кисспептин, включающийся в межнейрональный сигналинг в синхронизации с продуктами системы KNDy, определяет характер секреции ГнРГ нейронами гипоталамуса [4, 5]. Следует отдельно остановиться на роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R, открытие которой имело революционное значение для расшифровки генеза нейроэндокринной регуляции репродуктивной системы. Система KISS/KISS1R включает ген кисспептина, который локализуется на длинном плече 1 хромосомы (1q32); его продуктом транскрипционной активности является гидрофобный белок (включающий 145 аминокислот), который может быть расщеплен в процессе протеолитического распада до белков с более низкой молекулярной массой — не теряющие биологической активности кисспептины 54, 14, 13 и 10. Рецептор кисспептина, в настоящее время обозначаемый KISS1R, является лигандом G-протеинового рецептора 54 (GPR54). Установлена локализация KISS1R в различных отделах ЦНС с наиболее высокой представленностью в перивентрикулярных и аркуатных ядрах гипоталамуса. В настоящее время кисспептины представляются ключевыми регуляторами секреции ГнРГ, однако осуществление эффективных глия-нейрональных и межнейрональных взаимодействий возможно только в ко-экспрессии генов системы KNDy [2, 4, 6].

В настоящее время продолжают исследования трансляционного характера, целью которых является дальнейшее изучение механизмов трансинаптической сигнальной передачи на разных регуляторных уровнях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Получены данные, что мутации с потерей функции в генах, кодирующих нейрокинин В (TAC3) и его рецептор (TAC3R), приводили к пубертатным нарушениям [7]. Согласно мнению

большинства исследователей, предполагается, что киспептин напрямую стимулирует секрецию ГнРГ через ГнРГ-содержащие нейроны, большинство из которых экспрессируют рецептор KISS1R. Представляются интересными данные о различной анатомической локализации нейронов, экспрессирующих KISS1 mRNA. В то время как KISS1-нейроны аркуатных (ARC) ядер показали негативную обратную связь, нейроны перивентрикулярных (AVPV) ядер гипоталамуса показали положительную обратную связь регуляции ГнРГ/гонадотропинов половыми стероидами [8].

Другие исследования показали, что киспептины могут участвовать в передаче сигналов от половых стероидов (андрогенов и эстрогенов), кроме того, транслировать информацию между лептином и ГнРГ-секретирующими центрами гипоталамуса, осуществляя таким образом процессы «прямой/обратной связи» в границах гонадной оси не только в центральных, но и в периферических отделах половой системы, и сигнализируя в вышеназванные центры об энергетическом балансе [9–11].

Представляют интерес исследования, уточняющие роль периферических систем (рецепции андрогензависимых тканей, половых стероидов) в осуществлении киспептинового сигналинга, направленного на осуществление связей в границах гонадной оси [12]. Так, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) оказывают воздействие на половые железы, что приводит к увеличению половых стероидов и, соответственно, влияет на физиологические и поведенческие изменения в период половой зрелости. Половые стероиды (эстроген и прогестерон у женщин и тестостерон у мужчин) стимулируют организующее и активирующее геномное воздействие на гипоталамические секс-диморфные центры. Продукты экспрессии генов в указанных гипоталамических центрах инициируют поведение по женскому или мужскому типу, что имеет большое значение для правильной сексуальной самоидентификации подростка. [12, 13]. Многие исследования показали значительную степень колокализации KND- и KISS1-нейронов с рецепторами стероидных гонадных гормонов (особенно андрогена AR и эстрогена ER $\alpha$ ) [7, 14]. Однако уточнение большинства механизмов, опосредуемых киспептинами во влиянии на различные регуляторные процессы репродуктивной системы, а именно понимание роли данной системы как основного регулятора ГнРГ-секреции, трансммиттера сигналов либо сопутствующего участника данных процессов, является предметом активного исследовательского поиска [15]. Это представляется тем более важным в связи с увеличением количества фактических

данных о перспективе применения антагонистов и агонистов киспептинов для совершенствования технологий лечения разнообразных расстройств репродукции и полового развития [16–19]. Другим актуальным направлением является изучение возможностей применения киспептина в роли диагностического маркера патологии и терапевтического препарата для лечения центральных форм гипогонадизма и задержки старта пубертата. Опубликованы результаты исследований использования киспептина для лечения патологии, обусловленной расстройством секреции ГнРГ и гонадотропинов. Проводятся исследования по поиску оптимальных терапевтических схем применения киспептина в целях восстановления физиологической секреции гонадотропинов [20–23]. В исследовании Matsui H., et al. (2004) было изучено влияние метастина (киспептин-54), вводимого подкожно, на уровень гонадотропинов (фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон) самцов и самок крыс. ФСГ и ЛГ повышались и индуцировали овуляцию у самок крыс препубертатного возраста. Сделан вывод о влиянии киспептина-54 на созревание гонад. У самцов крыс введение киспептина-54 также значительно повышало уровень гонадотропных гормонов в плазме крови. Нежелательных побочных эффектов зарегистрировано не было. [24]. Dhillon W. S., et al. (2005) установили, что что инактивирующие мутации гена рецептора киспептина KISS1R ассоциированы с несостоятельностью репродуктивной функции. Внутривенное введение киспептина-54 мужчинам добровольцам в течение 90 минут значительно повышало уровень ЛГ, ФСГ и тестостерона. Предложено рассматривать введение киспептина как новый метод влияния на активацию гонадной оси [25]. В работе George J. T., et al. (2011) были установлены дозозависимые эффекты киспептина-10 на стимуляцию ГнРГ при болюсном введении молодым мужчинам, при этом выявлена пороговая для увеличения ГнРГ доза (1 мкг/кг), превышение которой до 3 мкг/кг приводило к обратному эффекту — снижению ГнРГ, что предостерегает от использования высоких доз этого пептида. Эффекта «десенситизации» гонадотрофов при непрерывном подкожном введении киспептина получено не было [26]. Серьезно продвинулись в данной области Young J., et al. (2013), получившие данные о восстановлении функциональной активности гонадной оси при мутациях гена нейрокина В (НКВ) и его рецептора при введении киспептина-10. Эффективность отмечена как при двукратном в день внутривенном болюсе препарата, так и при непрерывной подкожной инфузии киспептина в течение 3 дней. Резюмировано, что киспептин может быть рекомендован при

гипоталамической аменорее, хронической ановуляции. При повышении ЛГ (при синдроме поликистозных яичников) введение нейрокина В и антагонистов кисспептина может привести к снижению этого гонадотропина. Показано, что непрерывная подкожная инфузия кисспептина может эффективно восстанавливать пульсаторную секрецию ГнРГ при его эндогенной недостаточности [27].

Старт пубертата и его физиологическая прогрессия, завершающаяся достижением половой зрелости, является чрезвычайно значимым периодом для детей и подростков. Качество созревания репродуктивной системы в детстве определяет перспективу фертильности. Задержка старта пубертата, расстройства его динамического развития и гипогонадизм относятся к числу достаточно частых и весьма серьезных проблем как для выбора терапии, так и для прогнозирования репродукции. Рекомендательные в настоящее время подходы к терапии не всегда имеют желаемый эффект, что определяет актуальность поиска новых терапевтических технологий.

#### Цель исследования

Проведение фундаментальных экспериментальных исследований по изучению механизмов регуляции полового созревания и трансляция их результатов в клиническую практику позволят расширить понимание патогенеза нарушений сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме и синдроме позднего пубертата. Также подобные исследования имеют целью оптимизацию существующих диагностических и терапевтических алгоритмов оказания помощи. В Институте эндокринологии Центра Алмазова в течение последнего десятилетия проводятся научные исследования, направленные на углубленное изучение механиз-

мов нейроэндокринной регуляции процессов пубертатной активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси как в физиологическом аспекте, так и при задержке старта пубертата центрального генеза. Исследования носят трансляционный характер, включают экспериментальные и клинические разделы и в целом имеют конечной целью оптимизировать вопросы диагностики и коррекции нарушений полового развития в пубертате. Ниже приводятся некоторые результаты проведенных нами исследований [28–32].

#### Материалы и методы

##### Экспериментальное исследование

Экспериментальная часть исследования проведена на лабораторных крысах линии Wistar мужского пола. Всего было включено 53 особи крыс в возрасте 2–3 дней. Все экспериментальные животные были разделены на 7 групп, по 6–8 особей в каждой. Возрастное экстраполирование было следующим: 1 месяц — допубертатный возраст, 2 месяца — возраст старта пубертата, в 4 месяца — половозрелые особи. Данные представлены в таблице 1.

Экспериментальный гипогонадотропный гипогонадизм был создан 2 способами:

1. Хирургическая модель создавалась путем односторонней гонадэктомии в раннем неонатальном периоде (4–5 день жизни) по стандартам экспериментальных физиологических исследований [Corbier P., et al. (1983); Bernhardt J. A., et al. (2007)]. Основана на том, что односторонняя гонадэктомия новорожденных самцов крыс в раннем постнатальном периоде (1–5 день от рождения) нарушает дифференцировку гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси ЦНС в возрасте «минипубертата» андрогенами [Мыслицкий В. Ф. (1990); Резников А. Г. (2007)].

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

Снижение организующей роли андрогенов на головной мозг ведет к нарушению формирования центров регуляции выброса гонадотропинов и к отсутствию гипофизарного ответа на низкий уровень андрогенов в постнатальном периоде развития животных [Corbier P., et al. (1983); Handa R. J. et al. (1985); Мыслицкий В. Ф. (1990); Шишкина И. В. (1984)]. Валидацию метода гипогонадотропного гипогонадизма проводили измерением в сыворотке крови половых гормонов и гонадотропинов (тестостерон, ЛГ и ФСТ) в двух- и четырехмесячном возрасте, которые соответствовали допубертатным значениям.

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

В группе хирургической модели в возрасте 4 месяцев была выделена подгруппа из 8 особей крыс, которой был проведен курс введения препарата тестостерона пропионата в дозе 5 мг/кг/сут в течение 7 дней [Байрамов А.А. и др. (2006)]. На разных этапах эксперимента были забраны материалы центральных (головной мозг) и периферических (гонады, мышечная ткань, кровь) андрогензависимых тканей на разных сроках полового развития.

Морфологическое исследование проведено на срезах области медиального аркуатного ядра гипоталамуса (МАЯ). Проводился поиск интересующей области путем множественных пробных фронтальных срезов, зафиксированных в парафине образцов головного мозга, в проекции боковых желудочков на уровне bregma  $-3,6$  мм под контролем микроскопии согласно стереотаксическому атласу [Рахинос G., et al. (1986)]. Производилось окрашивание срезов по Нисслию в площади  $0,01$  мм<sup>2</sup> правого и левого МАЯ у каждой особи. С учетом имеющихся в литературе данных классификации клеток определяли фенотип нейронов [Жаботинский Ю. М. (1965)]. Оценивались площадь и форма клеток, размер и расположение ядер, характер окрашивания клеточных структур, расположение клеток, наличие их скоплений. Морфометрию проводили с помощью программы Imagescore (Россия).

Экспрессия рецепторов к киспептину KISS1R в центральных андрогензависимых тканях (МАЯ) определялась иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных кроличьих антител KISS1R (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации  $200$  µg/ml. Экспрессия рецепторов к тестостерону определялась с использованием мышинных

антител клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации  $500$  µg/ml. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток окрашивали гематоксилином Карацци. Определяли число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии рецепторов KISS1R и к тестостерону. Срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия).

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

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

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось под руководством Дробленкова А. В., гистоморфолога, д.м.н., старшего научного сотрудника НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

#### *Клиническое исследование*

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

Критерии включения в основную группу:

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

Группы сравнения составили 2 группы практически здоровых мальчиков со стартом пубертата в физиологические сроки. Группа сравнения 1 была представлена 25 мальчиками 14–18 лет в ста-

дии Таннер III–V; группа сравнения 2 включала 28 мальчиков 6–10 лет в стадии Таннер I. Данные формирования групп представлены в таблице 2.

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

клиническом осмотре по общепринятой методике по шкале Таннер; объем тестикул оценивали с использованием орхидометра.

Лабораторные исследования были направлены на определение уровней кисспептина в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa для Kisspeptin 1 (KISS1) (SEC559Hu) (Cloud-Clone Corp). Определение уровня лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминесцентным методом на анализаторе «Cobas E 411» (Roche, Швейцария).

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 для Windows. Выборки были проверены по гипотезам о нормальном распределении с использованием показателей асимметрии и эксцесса. Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа.

**Таблица 2. Характеристики пациентов, включенных в исследование**

Группа	Количество пациентов, n	Возраст, n (лет)	Стадия полового развития по Таннер
Основная	22	14–17	I
Сравнения 1	25	14–18	III–V
Сравнения 2	28	6–10	I

**Таблица 3. Сравнение перинатальных характеристик в различных группах**

Характеристика	Основная группа задержки полового развития (n = 22)	Группа сравнения 1, Таннер III–V (n = 25)	Группа сравнения 2, Таннер I (n = 28)	P*
Преждевременные роды, %	0	0	10,7	0,11
Оперативные роды, %	27	23	25	0,98
Преэклампсия, %	35	29	33	0,90
Анемия во время беременности, %	18	14	25	0,63
Внутриутробная инфекция, %	6	5	4	0,94

Примечание: \* — Тест Краскела–Уоллиса для всех групп.

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 Краскела–Уоллиса с попарными межгрупповыми посттестами Dunn и двусторонним ANOVA, а также критерий хи-квадрат с коррекцией Yates'. Чтобы скорректировать возможные смешивающие или модифицирующие эффекты нескольких факторов, была выполнена ANCOVA, в которой потенциальные счетчики были введены в модель в качестве ко-вариатов. Анализ под кривой (ROC) был выполнен для оценки возможности уровня кисспептина в плазме крови быть критерием патологии. Различия считали значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ( $p < 0,05$ ). Корреляционный анализ проведен с применением критерия корреляции Пирсона. Для анализа данных использовалось программное обеспечение MedCalc для Windows, версия 18 (MedCalc Software, Остенде, Бельгия) [Schoonjans F. (2017)].

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» Минздрава России. До включения в исследование у всех было получено письменное информированное согласие.

## Результаты

Результаты исследования представлены последовательно, в соответствии с экспериментальным и клиническим этапами.

Цель экспериментального этапа состояла в исследовании динамики изменений лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R в периферических и центральных андрогензависимых тканях у самцов крыс модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма. При анализе возрастных изменений уровня тестостерона в крови животных контрольных групп установлены различия в допубертатном возрасте, возрасте старта пубертата и достижении

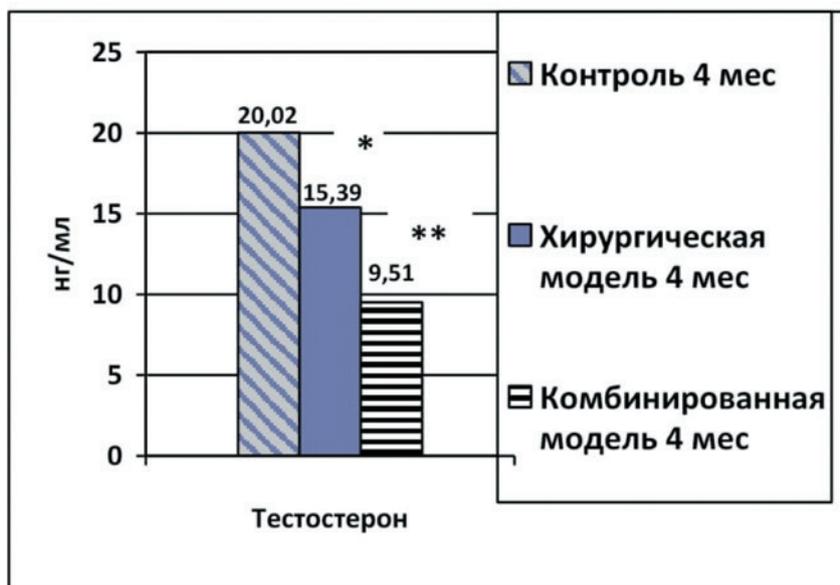
половой зрелости [медиана (Me) тестостерона соответственно 5,99 нг/мл; 14,29 нг/мл и 20,02 нг/мл;  $p < 0,01$ ], что было ожидаемым для данных стадий полового развития. Сделано заключение о закономерном повышении уровня тестостерона плазмы крови у здоровых самцов крыс при прогрессировании полового созревания, достигая максимального значения в возрасте 4 месяцев, соответствующем возрасту достижения половой зрелости.

Что касается количественных характеристик кисспептиновых рецепторов в гонадах, то в группе интактных животных было отмечено их увеличение в зависимости от возраста. Так, изменения в тестикулах от возраста допубертата (1 месяц) к возрасту половой зрелости (4 месяца) составили 0,92 нг/мг/белка против 1,13 нг/мг/белка соответственно,  $p < 0,01$ . В скелетных мышцах подобных изменений получено не было. Даже в физиологических условиях с возрастом не происходило нарастание количества кисспептиновых рецепторов (соответственно медианы в допубертате и периоде половой зрелости 0,12 нг/мг/белка и 0,11 нг/мг/белка;  $p > 0,05$ ). При этом количество данной группы рецепторов как в отсутствие пубертата, так и в периоде полной половой зрелости в тестикулах было значимо выше, чем в мышцах ( $p < 0,05$ ), свидетельствуя о физиологически более низкой представленности кисспептиновых рецепторов в ткани скелетной мускулатуры, несмотря на ее принадлежность также к числу андрогензависимых тканей.

Таким образом, физиологическое распределение рецепторов кисспептина было различным в гонадах и скелетных мышцах. В первых подтверждено статистически достоверное нарастание рецепторов односторонне 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.

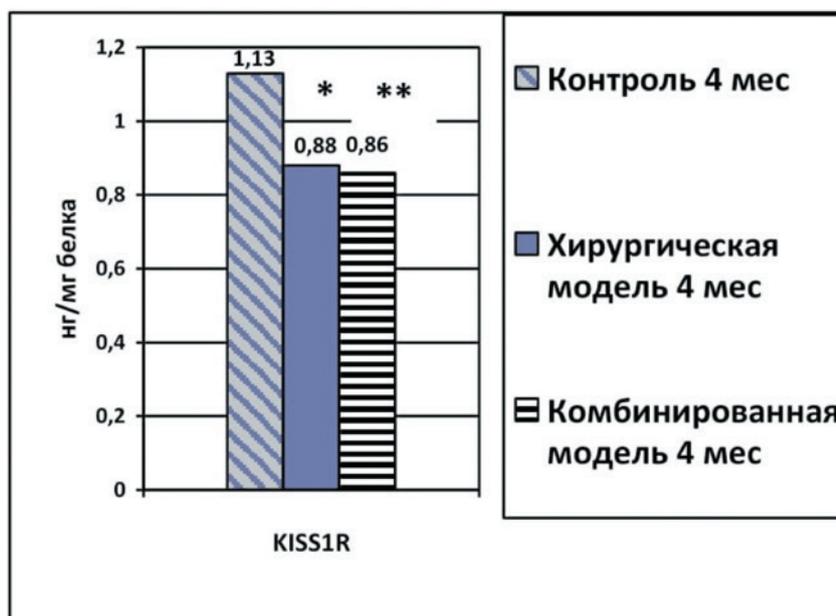
Экспериментально индуцированный гипогонадизм приводил к снижению уровня тестостерона крови у половозрелых особей до допубертатных значений, статистически значимо отличавшихся от тестостеронемии в группе интактных животных соответствующего возраста (медианы 15,39 нг/мл в хирургической модели, 9,51 нг/мл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

Концентрация рецепторов кисспептина в гонадах экспериментальных групп гипогонадизма была значимо ниже, чем у половозрелых интактных крыс (Me соответственно 0,88 нг/мг/белка и 1,13 нг/мг/белка,  $p < 0,05$ ). Плотность рецепторов



**Рис. 1. Сравнительный анализ уровня тестостерона крови на модели гипогонадотропного гипогонадизма и здоровых половозрелых особей (нг/мл):**

\* — сравнение контроль (4 месяца) — хирургическая модель (4 месяца),  $p < 0,01$ ; \*\* — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца),  $p < 0,01$



**Рис. 2. Сравнительный анализ KISS1R в гонадах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля (4 месяца) (нг/мг белка):**

\* — сравнение контроль (4 месяца) — хирургическая модель (4 месяца),  $p < 0,01$ ; \*\* — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца),  $p < 0,01$

KISS1R в модели гипогонадизма (4 месяца) была сопоставима с таковой в группе контроля допубертатного возраста (1 месяц) (Me 0,88 нг/мг/белка против 0,92 нг/мг/белка,  $p > 0,05$ ). Данные представлены на рисунке 2.

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 3.

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

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

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

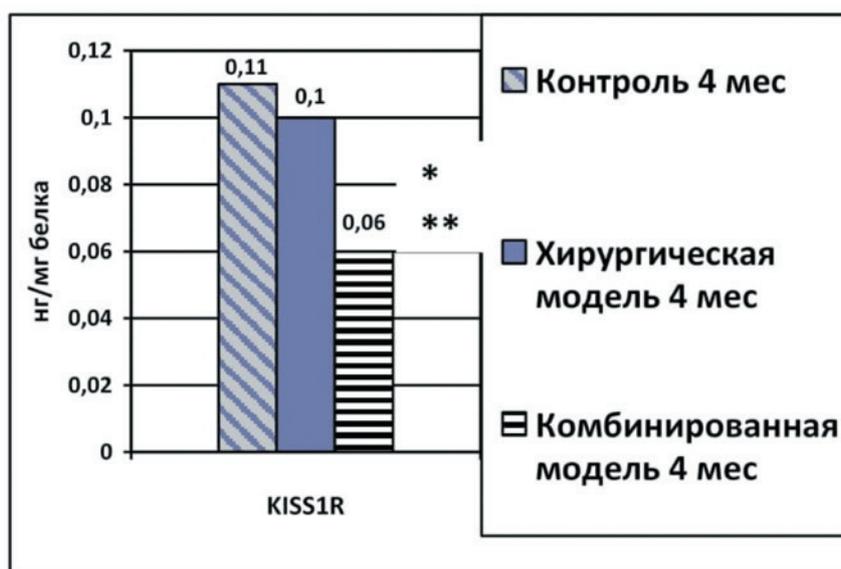
тестостероном гипогонадотропного гипогонадизма в использованной схеме приводила к превышению физиологического уровня тестостерона.

Терапия тестостероном, несмотря на восстановление его уровня в крови до уровня половозрелых особей, не приводила к значимому увеличению количества KISS1R у четырехмесячных самцов крыс в гонадах и скелетных мышцах, которые оставались соответствующими таковым у особей, не вступивших в пубертат. Уровень кисспептина крови на фоне введения тестостерона также не изменялся.

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

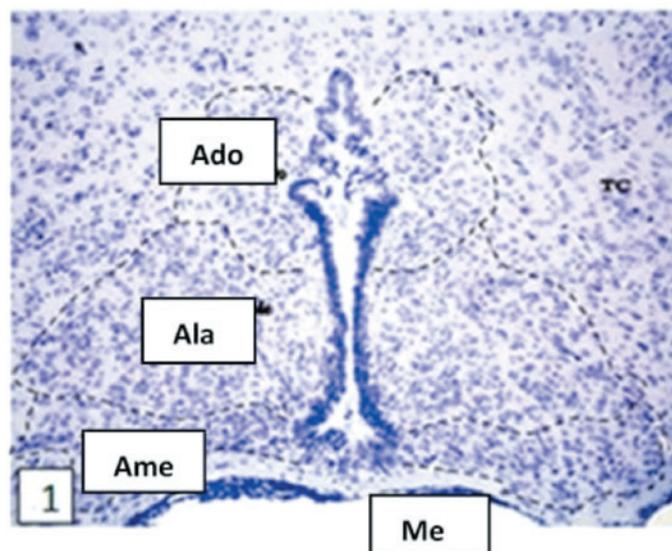
При изучении системы кисспептина KISS/KISS1R на модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма в центральной нервной системе у самцов крыс была выполнена морфологическая оценка нейронов медиального аркуатного ядра. Данные представлены на рисунке 4.

На этапе морфологического исследования был проведен анализ изменения строения нейронов, количества их патологических форм, простран-



**Рис. 3. Сравнительный анализ KISS1R в мышцах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля (4 месяца) (нг/мг белка):**

\* — сравнение хирургическая модель (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца),  $p < 0,05$ ;  
 \*\* — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца),  $p < 0,01$



**Рис. 4. Аркуатный ядерный комплекс. Сопоставление фронтальных срезов промежуточного мозга интактных половозрелых крыс с картами стереотаксического атласа головного мозга крыс (Paxinos G., Watson C.; 1998). Окраска методом Ниссля, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 10$ :**

Ado — аркуатное дорсальное ядро, Ala — аркуатное латеральное ядро, Ame — аркуатное медиальное ядро, Me — срединное возвышение

ственных 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 (рис. 5).

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

При моделировании гипогонадотропного гипогонадизма было установлено возрастание глиоцито-нейронального индекса, что, наряду со склонностью нейронов к группированию в условиях устойчивого снижения тестостерона, позволило расценивать изменения как компенсаторно-приспособительные. Известно, что, объединяясь в группы для более тесного контакта, глиоциты и нейроны способны обмениваться рядом жизненно важных микро- и макромолекул, таких как глюкоза, РНК, нейротрофический глиальный фактор, что в условиях развития дистрофических процессов может

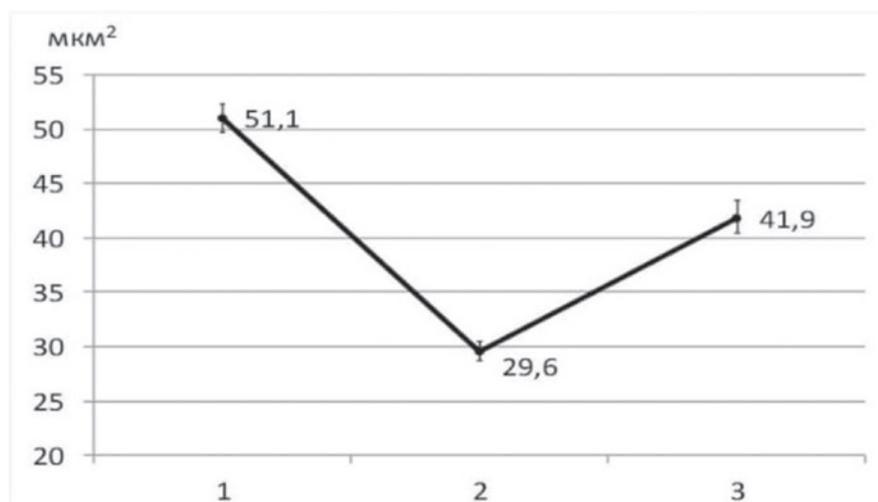
трактоваться как компенсаторный механизм.

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

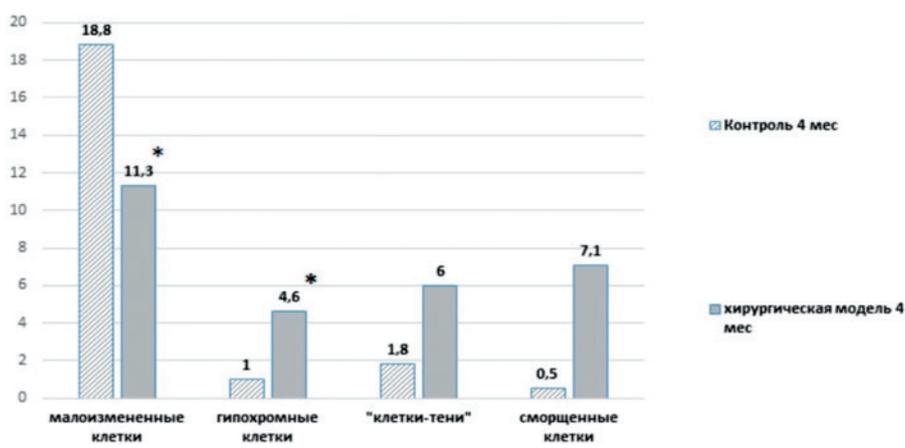
Все нейроны этой области экспрессировали рецепторы к андрогенам. У интактных половозрелых самцов крыс была отмечена преимущественно высокая степень экспрессии с некоторыми вариациями в зависимости от распределения рецепторов в проекции клеточных структур. Умеренная и слабая степень экспрессии имела место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

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

Подобные изменения определялись и в отношении экспрессии рецепторов KISS1R в МАЯ. У интактных крыс были выявлены 2 группы нейронов:



**Рис. 5.** Изменения площади тел малоизмененных нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии тестостероном (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ( $p < 0,05$ )



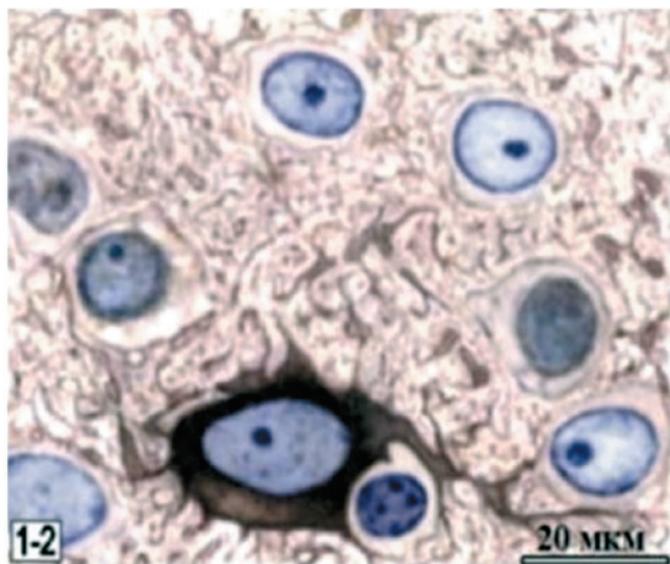
**Рис. 6.** Анализ соотношения нейронов различных видов в разных группах самцов крыс на площади 0,01 мм<sup>2</sup>:

\* — сравнение с группой контроля,  $p < 0,05$

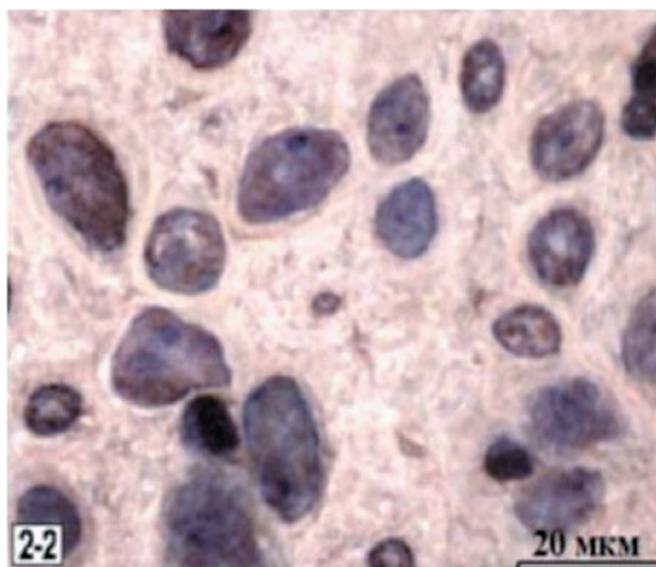
с очень выраженной и слабо выраженной экспрессией KISS1R. В клетках с высокой экспрессией KISS1R локализовались в плазматической мембране и цитоплазме тел и в отростках, отходящих от тела данных клеток. В плазмолемме их экспрессия была непрерывной, а область экспрессии — более широкой, чем у клеток, имеющих низкую экспрессию KISS1R. Последние имели морфологические отличия, представленные меньшими размерами и более светлой окраской ядра и неправильной овальной или полигональной формой плазматической мембраны. Данные представлены на рисунке 7.

При гипогонадизме экспрессия рецепторов KISS1R существенно снижалась, проявляясь лишь на отдельных участках плазмолеммы и отсутствуя в цитоплазме нейронов (рис. 8).

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



**Рис. 7.** Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у здоровых половозрелых крыс. Окраска методом Ниссля, докрашивание ядер клеток гематоксилином, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 100$



**Рис. 8.** Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 месяцев. Окраска методом Ниссля, докрашивание ядер клеток гематоксилином, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 100$

При изучении гистоморфологических характеристик нейронов МАЯ на фоне введения тестостерона получены следующие результаты. Отмечалась позитивная динамика, выражавшаяся в увеличении площади малоизмененных нейронов в основном за счет хорошо выраженной цитоплазмы, а также в снижении тенденции к образованию групп. Однако число гибнущих и погибших клеток, равно как и глиоцито-нейрональный индекс, не претерпели значительных изменений. Степень экспрессии AP

и KISS1R частично восстанавливалась, выражаясь в статистически значимо большей доле нейронов с умеренной и выраженной экспрессией у гипогонадных крыс с лечением по сравнению с не лечеными особями.

Таким образом, введение тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме подвергает частичному обратному развитию дегенеративно-дистрофические процессы и частично восстанавливает интенсивность экспрессии андрогеновых и кис-

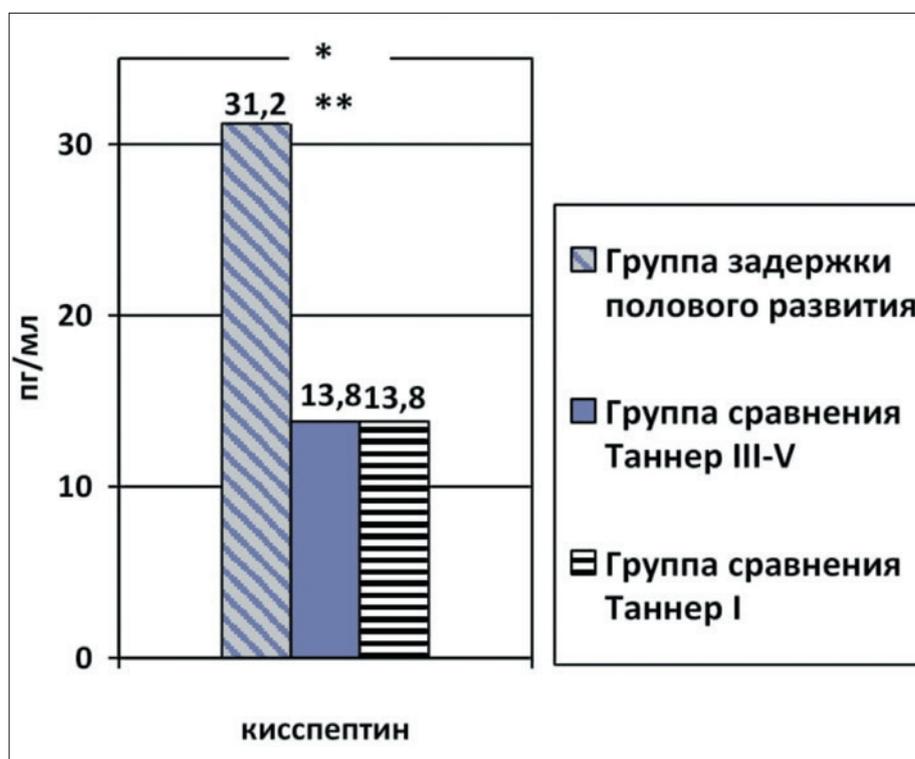
спептиновых рецепторов, однако не влияет на процесс гибели нервных клеток.

Анализируя итоги экспериментальной части исследования и транслируя полученные результаты в клиническую практику, следует подчеркнуть значимое негативное влияние устойчивого снижения уровня тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме на процессы kisspeptin-опосредованной регуляции полового развития, представленные уменьшением количества kisspeptиновых 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 kisspeptиновой регуляции при центральных вариантах задержки полового развития для поиска и обоснования новых диагностических и терапевтических возможностей при данной группе патологии.

В клинический раздел исследования было включено 75 детей и подростков мужского пола. Были сформированы 3 группы мальчиков, различного

возраста: основная группа — 22 мальчика старше 14 лет с отсутствием вторичных половых признаков, допубертатным объемом тестикул и низким уровнем тестостерона и ЛГ  $<0,01$  МЕ/л. Был проведен стимуляционный тест с трипторелином-депо, по результатам которого установлено, что в 6 случаях стимулированный пик ЛГ был ниже 10 МЕ/л, что подтверждало гипогонадотропный гипогонадизм. В 16 случаях максимальное значение ЛГ было выше 10 МЕ/л, что свидетельствовало о синдроме позднего пубертата. Уровень тестостерона у мальчиков с гипогонадотропным гипогонадизмом также, как у мальчиков с синдромом позднего пубертата, был низким, не имея значимых различий (медианы в подгруппах соответственно: 0,09 нмоль/л и 0,22 нмоль/л;  $p = 0,11$ ). Поскольку основной идеей проводимого исследования являлось уточнение механизмов задержки полового развития центрального генеза, пациенты с гипогонадотропным гипогонадизмом и синдромом позднего пубертата были объединены в одну группу задержки полового созревания.

Группы сравнения были представлены мальчиками с физиологическим течением полового развития. Группа сравнения 1 — юноши в возрасте, сопоставимом с основной группой, от 14 до 17 лет,



**Рис. 9.** Сравнительный анализ уровня kisspeptина плазмы крови в различных группах (пг/мл):

\* — сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер III–V ( $p = 0,02$ ); \*\* — сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер I ( $p = 0,02$ )

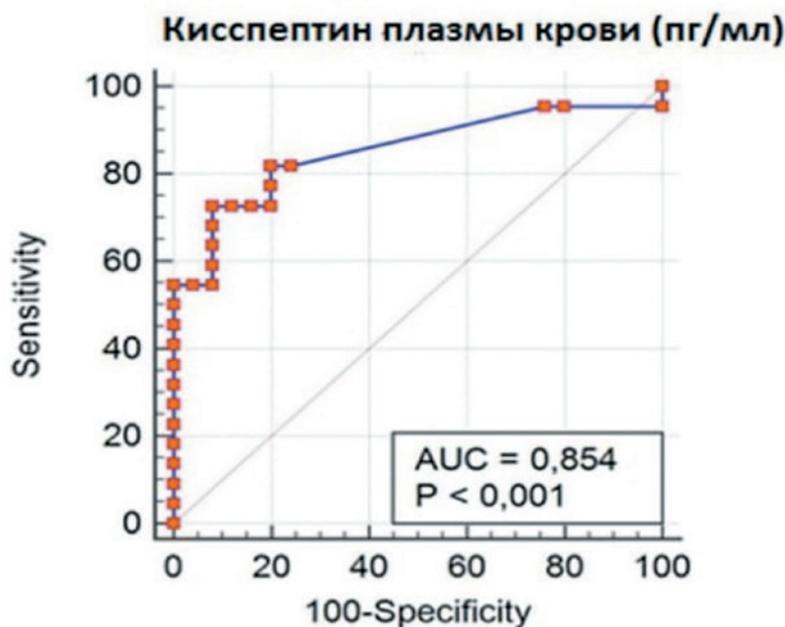


Рис. 10. ROC-анализ уровня ксиспептина плазмы крови в основной группе

имеющие физиологическое половое созревание (Таннер III–V), и группа сравнения 2 — мальчики, не имеющие старт пубертата в физиологически допустимые сроки, в возрасте от 8 до 10 лет (Таннер I). Все включенные в исследование дети и подростки не имели острой и тяжелой хронической соматической патологии, не принимали препараты, влияющие на стероидогенез.

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

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

что избыток веса отмечался у 27 % обследованных основной группы, 40 % группы сравнения 1 и 21 % группы сравнения 2, данные различия были статистически не значимы ( $p > 0,05$ ).

Выполнено определение ксиспептина крови у всех исследуемых. При анализе уровня ксиспептина внутри основной группы, где ранее не было выявлено статистических различий по клинко-биохимическим параметрам, также не было установлено различий ксиспептина крови в группе позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма (медианы соответственно 29,5 пг/мл и 44,5 пг/мл,  $p = 0,63$ ). Полученные результаты подтверждают возможность объединения функциональной и органической задержки пубертата в общую группу задержки полового развития по признаку отсутствия реактивации центральных отделов гонадостата в должном для этого возрасте.

В группах мальчиков с физиологическим для возраста сценарием полового развития, независимо от его стадии, были установлены сопоставимые значения уровня ксиспептина 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 ксиспептина составила 31,2 пг/мл ( $p = 0,02$ ). Данные представлены на рисунке 9.

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

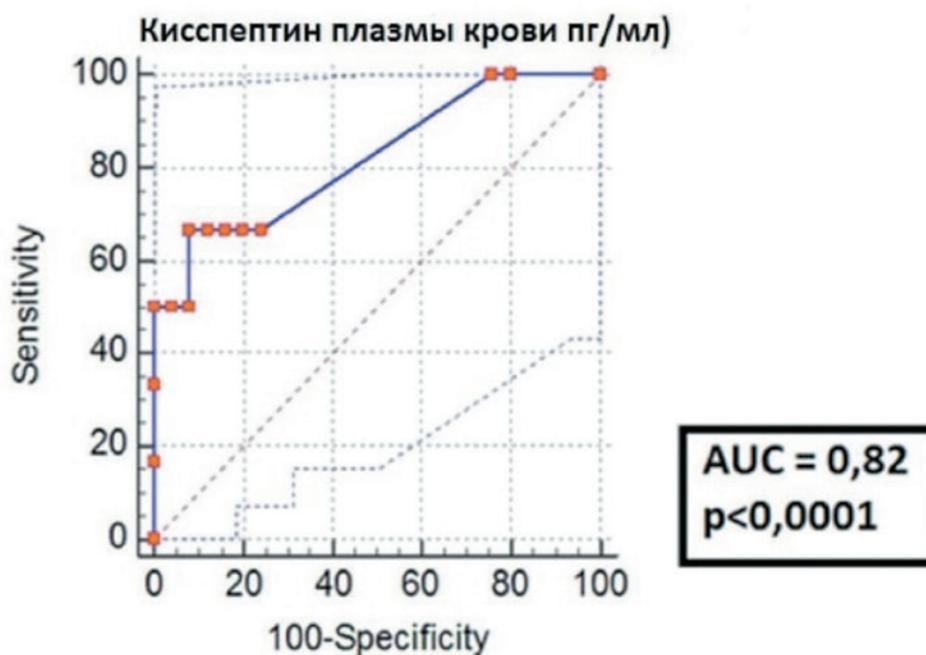


Рис. 11. ROC-анализ уровня кисспептина плазмы крови в подгруппе подростков с гипогонадотропным гипогонадизмом

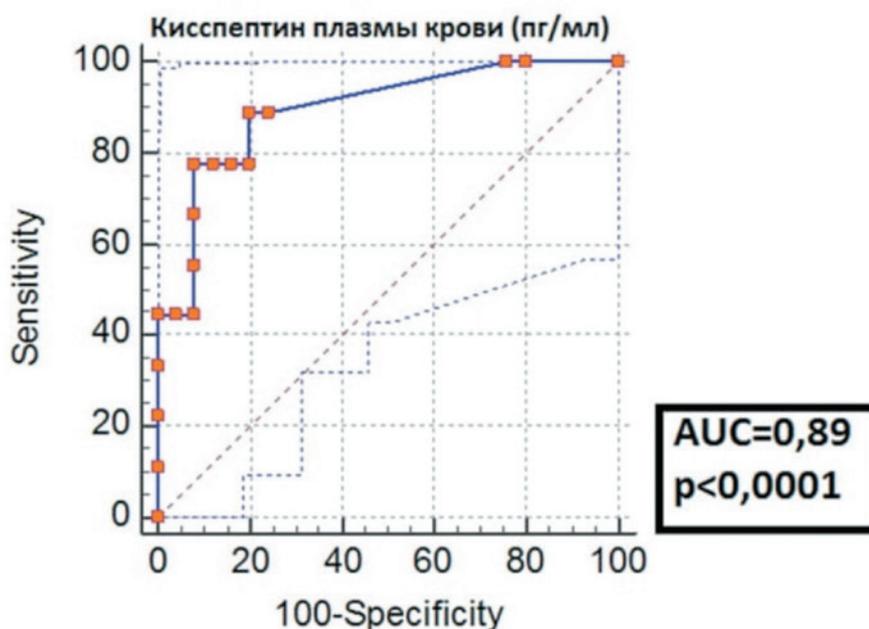


Рис. 12. ROC-анализ уровня кисспептина плазмы крови в подгруппе подростков с синдромом позднего пубертата

Проведенный корреляционный анализ между уровнем тестостерона и кисспептина крови выявил негативную 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 кис-

спептина крови, наряду с установленным клинико-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 стероидоген-

неза со стороны кисспептина по принципу «обратной связи».

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

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 таковых для общей группы задержки полового развития, т. е. соответствовали 16,9 пг/мл (для синдрома позднего пубертата чувствительность 77,7 %, специфичность 92 %; для гипогонадотропного гипогонадизма чувствительность 66,7 %, специфичность 92 %,  $p < 0,0001$ ). Данные представлены на рисунке 11 и 12.

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.

### Заключение

Основной идеей представленного 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 старта пубертата и полового развития детей и подростков. Получены новые данные о значимом негативном влиянии дефицита андрогенов на рецепцию кисспептина в центральных и периферических от-

делах 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.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016; 4 (3): 254–264.
2. Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U, et al. New concepts on the control of the onset of puberty. In: Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, et al., eds. *Pediatric Neuroendocrinology.* Endocr Dev. Basel, Karger, 2010; 17: 44–51.
3. Ojeda SR, Terasawa E. Neuroendocrine regulation of puberty. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, et al., eds. *Hormones, Brain and Behavior.* New York, Elsevier, 2002; 4: 589–659.
4. Lomniczi A, Ojeda SR. 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.* Endocr Dev. Basel, Karger, 2016; 29: 1–16.
5. Ranke MB, Mullis P-E, eds. *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents.* 4th, rev and extended ed. Basel, Karger, 2011:535.
6. Willemsen RH, Dunger DB. 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.* Endocr Dev. Basel, Karger. 2016; 29: 17–35.
7. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet.* 2009; 41 (3): 354–358.
8. Leon S, Barroso A, Vazquez MJ, et al. Direct actions of kisspeptins on GnRH neurons permit attainment

- of fertility but are insufficient to fully preserve gonadotropic axis activity. *Sci Rep.* 2016; 6: 19206.
9. Brown RE, Imran SA, Ur E, et al. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 281 (1–2): 64–72.
  10. Tng EL. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med J.* 2015; 56 (12): 649–656.
  11. Celik O, Celik N, Aydin S, et al. Ghrelin action on GnRH neurons and pituitary gonadotropes might be mediated by GnIH-GPR147 system. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016; 25 (2): 121–128.
  12. Javed Z, Qamar U, Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis - current perspective. *Endokrynol Pol.* 2015; 66 (6): 534–547.
  13. Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 314 (2): 164–169.
  14. Sapronov NS. Gonadoliberins. SPb.: Art-express, 2012. p. 272. In Russian [Сапронов Н.С. Гонадолиберины. СПб.: Арт-экспресс, 2012. с. 272].
  15. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012; 92 (3): 1235–1316.
  16. Guerriero KA, Keen KL, Millar RP, et al. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology.* 2012; 153 (2): 825–836.
  17. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci.* 2009; 29 (12): 3920–3929.
  18. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (8): E1228–1236.
  19. Newton CL, Anderson RC, Millar RP. Therapeutic neuroendocrine agonist and antagonist analogs of hypothalamic neuropeptides as modulators of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr Dev.* 2016; 30: 106–129.
  20. Yarmolinskay MI, Ganbarli NF, Aylamazyan EK. Role of kisspeptin in regulation of reproductive function. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej*= *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2016; 65 (6): 4–18. In Russian [Ярмолинская М.И., Ганбарли Н.Ф., Айламазян Э.К. Значение Кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы. Журнал акушерства и женских болезней. 2016; 65 (6): 4–18].
  21. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (8): E1228–1236.
  22. Chan YM, Butler JP, Pinnell NE, et al. Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (6): 908–915.
  23. Jayasena CN, Abbara A, Narayanaswamy S, et al. Direct comparison of the effects of intravenous kisspeptin-10, kisspeptin-54 and GnRH on gonadotrophin secretion in healthy men. *Hum Reprod.* 2015; 30 (8): 1934–1941.
  24. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, et al. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320 (2): 383–388.
  25. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90 (12): 6609–6615.
  26. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96 (8): 1228–1236.
  27. Young J, George JT, Tello JA, et al. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology.* 2013; 97 (2): 193–202.
  28. Nikitina IL, Khoduleva YuN, Masel AS, et al. System of KISS-KISS1R: focus on peripheral signaling in androgen-dependent tissues in the experimentally induced model hypogonadotropic hypogonadism. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*=*Pathological physiology and experimental therapy.* 2016; 60 (4): 24–33. In Russian [Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С. и др. Система KISS/KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60 (4): 24–33].
  29. Nikitina IL, Bayramov AA, Khoduleva YuN, et al. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*=*Reviews on clinical pharmacology and drug therapy.* 2014; 12 (4): 3–12. In Russian [Никитина И.Л., Байрамов А.А., Ходулева Ю.Н. и др. Кисспептины в физиологии и патологии полового развития — новые диагностические и терапевтические возможности. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014; 12 (4): 3–12].
  30. Nikitina IL. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya*=*Arterial hypertension.* 2013; 19 (3): 227–236. In Russian [Никитина И.Л. Старт пубертата — известное и новое. Артериальная гипертензия. 2013; 19 (3): 227–236].
  31. Nikitina IL, Yuchlina YN, Vasileva EY, et al. Kisspeptin regulation of male sex development: possibilities of diagnosis and treatment of delayed puberty and hypogonadotropic hypogonadism. *Problemy endocrinologii*=*Problems of endocrinology.* 2018; 64 (5): 280–285. In Russian [Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Васильева Е.Ю. и др. Кисспептиновые механизмы регуляции полового развития мальчиков: потенциал диагностики и терапии при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме. Проблемы эндокринологии. 2018; 64 (5): 280–285].
  32. Droblenkov AV, Proshina LG, Yuhlina YuN, et al. Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*=*Pathological physiology and experimental therapy.* 2017; 61 (4): 21–30. In Russian [Дробленков А.В., Прошина Л.Г., Юхлина Ю.Н. и др. Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017; 61 (4): 21–30].

**Информация об авторах:**

Никитина Ирина Леоровна, д.м.н., заведующий НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии, заведующий кафедрой детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Юхлина Юлия Николаевна, ассистент кафедры детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Саракаева Лейла Рамазановна, младший научный сотрудник НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Плаксина Анна Олеговна, старший лаборант кафедры детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрамов Алекбер Азизович, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ клинической эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

**Author information:**

Nikitina Irina L., MD, PhD, Head of Research Laboratory of Pediatric Endocrinology at Institute of Endocrinology, Head of the Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Yuchlina Yulia N., Assistant at the Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Sarakaeva Leyla R., Junior Researcher at Research Laboratory of Pediatric Endocrinology at Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Center;

Plaksina Anna O., Senior Laboratory Assistant, Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Bayramov Alekber A., MD, PhD, Leading Researcher, Research Laboratory of Clinical Endocrinology, Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Center.