

На правах рукописи

ХАБИБУЛЛИНА ДИНА АЛЬБЕРТОВНА

**ГОНАДОТРОПИНЗАВИСИМОЕ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЕ ПОЛОВОЕ
РАЗВИТИЕ: КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ**

3.1.19. Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Безлепкина Ольга Борисовна

доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Райгородская Надежда Юрьевна

доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики детских болезней, детской эндокринологии и диабетологии ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Никитина Ирина Леоровна

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских болезней с клиникой лечебного факультета Института медицинского образования, заведующий научно-исследовательской лабораторией детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России)

Защита состоится «__» _____ 2024 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России - www.endocrincentr.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гонадотропинзависимое (истинное) преждевременное половое развитие (ППР) – появление вторичных половых признаков у девочек до 8 лет, у мальчиков до 9 лет вследствие преждевременной активации механизмов импульсной секреции гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ). Причинами истинного ППР могут быть опухоли хиазмально-селлярной области (гамартома, глиома, астроцитомы), органические поражения ЦНС (арахноидальные кисты, травмы, гидроцефалия), избыток половых стероидов вследствие периферических форм ППР. В 90% случаев среди девочек и в 25–60% случаев у мальчиков генез гонадотропинзависимого ППР остается неясным – идиопатическое ППР. По данным мировой литературы частота ППР составляет 1:5000-1:10000, в 10-25 раз чаще среди девочек (Partsch CJ et al., 2001, Cheuiche AV et al., 2021, Maione L et al., 2021, Дедов И.И. и соавт., 2006, Болмасова А.В. и соавт., 2006).

Большой интерес представляет изучение механизмов активации полового созревания, поскольку его сроки определяются комплексным взаимодействием генетических, эпигенетических и социально-средовых факторов. Доказательства генетической регуляции являются неоспоримыми, что подтверждается рядом исследований, продемонстрировавших корреляцию между возрастом начала полового созревания у детей и родителей, а также сходство сроков полового созревания у монозиготных близнецов (Palmert MR et al., 2001, Palmert MR et al., 2003, Roberts SA et al., 2020). Согласно зарубежным данным каждый четвертый случай (22-27,5%) идиопатического ППР является семейным вариантом, позволяя заподозрить моногенный характер наследования (de Vries L et al., 2004, Tinano FR et al., 2023, Harbulot C et al., 2021).

В настоящее время варианты замены в генах *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, *DLK1* ассоциированы с преждевременной активацией гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГО) и развитием ППР (Roberts SA et al., 2020,

Shim YS et al., 2022, Tajima T, 2022). Мутации в гене *MKRN3* признаны самой частой причиной моногенных форм ППР, описано более 50 вариантных замен, ассоциированных с развитием заболевания (Tajima T, 2022). Среди эпигенетических механизмов описаны аномалии метилирования, различные вариации числа копий вследствие делеций или однородительской дисомии (Roberts SA et al., 2020). На сегодняшний день в РФ есть лишь единичные описания клинических случаев моногенных форм ППР (Зубкова Н.А. и соавт., 2021), данные о частоте семейных и генетически детерминированных вариантов ППР отсутствуют, что определяет актуальность исследования.

Преждевременное половое созревание связано с неудовлетворительным ростовым прогнозом, психосоциальной дезадаптацией и повышенным риском различных метаболических осложнений в будущем. Это диктует необходимость своевременной диагностики и терапии. «Золотым стандартом» терапии центрального ППР являются препараты пролонгированных аналогов ГнРГ. Вопрос о выборе оптимальной дозы и режима введения остается дискуссионным, что обуславливает актуальность проблемы.

Цель исследования

Изучить молекулярно-генетическую основу, клинические и гормонально-метаболические особенности идиопатического гонадотропинзависимого преждевременного полового развития.

Задачи исследования

1. Определить частоту и характер изменений в генах, ассоциированных с гонадотропинзависимым преждевременным половым развитием при семейных и спорадических формах заболевания.
2. Сравнить клинические и гормонально-метаболические проявления преждевременного полового развития в зависимости от формы и молекулярно-генетической основы заболевания.
3. Оценить эффективность различных режимов терапии гонадотропинзависимого преждевременного полового развития пролонгированными аналогами гонадотропин-рилизинг гормона.

Научная новизна

Оценена частота семейных вариантов идиопатического гонадотропинзависимого преждевременного полового созревания у детей в Российской Федерации, составившая 49,0% (95%ДИ [39,5; 58,6]).

Впервые на большой выборке детей с идиопатическим гонадотропинзависимым преждевременным половым развитием проведено молекулярно-генетическое исследование методом NGS (next generation sequencing), изучены генетические основы заболевания. Оценена частота вариантных замен в гене *MKRN3* и других генетических дефектов у детей с гонадотропинзависимым ППР при семейных и спорадических случаях заболевания. Проведена оценка ассоциации генотип-фенотип.

Продемонстрирована эффективность метода молекулярно-генетической диагностики синдрома Темпл у детей с гонадотропинзависимым преждевременным половым развитием и прадероподобными фенотипическими особенностями.

Проведена оценка сравнительной эффективности различных режимов терапии гонадотропинзависимого ППР.

Теоретическая и практическая значимость

Детальный анализ семейного анамнеза с определением характера наследования гонадотропинзависимого ППР позволяет определить показания к проведению молекулярно-генетического анализа. Идентификация генетической основы заболевания является важной для медико-генетического консультирования семей, выделения групп риска по развитию ППР и определения подхода к наблюдению и своевременному лечению.

Оценка ассоциации фенотипических проявлений и результатов молекулярно-генетического анализа позволили продемонстрировать эффективность диагностики синдрома Темпл путем исследования 14 хромосомы методом хромосомного микроматричного анализа (ХМА) или MLPA (метилирование-специфичная мультиплексная лигазозависимая амплификация).

Терапия пролонгированными аналогами ГнРГ в дозе 11,25 мг ежеквартально обладает сопоставимой клинической эффективностью и безопасностью в сравнении с введением 3,75 мг ежемесячно (отсутствие прогрессии вторичных половых признаков, снижение скорости роста, отсутствие прогрессии костного созревания). Выбор ежеквартальных инъекций может повысить приверженность к лечению и добиться лучших терапевтических результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Распространенность семейных вариантов преждевременного полового развития, где у одного и более членов семьи отмечается преждевременное половое развитие составляет 49,0% (95%ДИ [39,5; 58,6]).

2. Молекулярно-генетические дефекты в генах, ассоциированных с регуляцией работы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и фенотипом ППР, идентифицированы в 30,0% случаев (95%ДИ [19,0; 42,8]) при семейных вариантах заболевания и в 21,1% случаев (95%ДИ [12,0; 34,2]) – при спорадических вариантах.

3. Среди однонуклеотидных вариантов преобладали мутации в гене *MKRN3* – 53,8% (95%ДИ [35,4; 71,2]), более чем в половине случаев установлено наследование дефекта по отцовской линии – 64,3% случаев (95%ДИ [38,6; 83,2]).

4. Фенотипы детей с моногенной формой преждевременного полового развития (вследствие дефектов в гене *MKRN3*) и идиопатической (генетически недетерминированной) формой заболевания не отличаются.

5. Терапия пролонгированными аналогами ГнРГ в дозах 11,25 мг и 3,75 мг обладает сопоставимой клинической эффективностью и безопасностью. При ежеквартальном введении препарата отмечена тенденция к большему снижению скорости роста.

Апробация работы

Апробация диссертационной работы состоялась 23 апреля 2024 года на межкафедральном заседании сотрудников кафедр эндокринологии,

диабетологии, детской эндокринологии-диабетологии Института высшего и дополнительного профессионального образования, научных сотрудников клинических и лабораторных подразделений ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты и основные положения диссертационной работы были доложены в виде устных и/или постерных докладов на I Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Достижения науки в практику детского эндокринолога» (4-5 декабря 2021 г., г. Москва); II Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Персонализированный подход в детской эндокринологии» (29-30 марта 2022 г., г. Москва); III Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Молекулярно-генетические исследования в практике детского эндокринолога» (28-29 марта 2023 г., г. Москва); XIX Российской научно-практической конференции детских эндокринологов «Достижения науки в практику детского эндокринолога» (30 апреля 2023 г., г. Санкт-Петербург); IV Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Эндокринная орфанетика: достижения и перспективы» (26–27 марта 2024 г., г. Москва).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 11 работ, из них 2 полнотекстовых оригинальных исследования, опубликованных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 3 публикации в сборниках зарубежных конференций, 6 – в сборниках российских конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах печатного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений. Библиография представлена 15 отечественными и 129 зарубежными источниками. Работа содержит 17 рисунков и 11 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на базе Института детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Источники случаев – пациенты, обследованные с декабря 2021 г. по январь 2023 г., а также архивные данные (медицинская документация пациентов, обследованных с января 2019 г. по ноябрь 2021 г.).

Всего обследовано 132 пациента с преждевременным половым развитием. В процессе обследования были исключены пациенты с неполными формами ППР (изолированное телархе, изолированное адренархе, n=18), с гонадотропиннезависимым ППР (n=7), с гонадотропинзависимым ППР вследствие органической патологии (объемные образования ЦНС, n=5). Группа пациентов с идиопатическим гонадотропинзависимым ППР (n=102) сформирована сплошным способом. На I этапе работы на основании данных о наследственном анамнезе пациенты были распределены на две подгруппы: семейные и спорадические случаи ППР (для анализа молекулярно-генетических, клинических и лабораторно-инструментальных особенностей заболевания). На II этапе исследования проводилась оценка эффективности терапии пролонгированными аналогами ГнРГ (рис 1).

I этап (обследование)

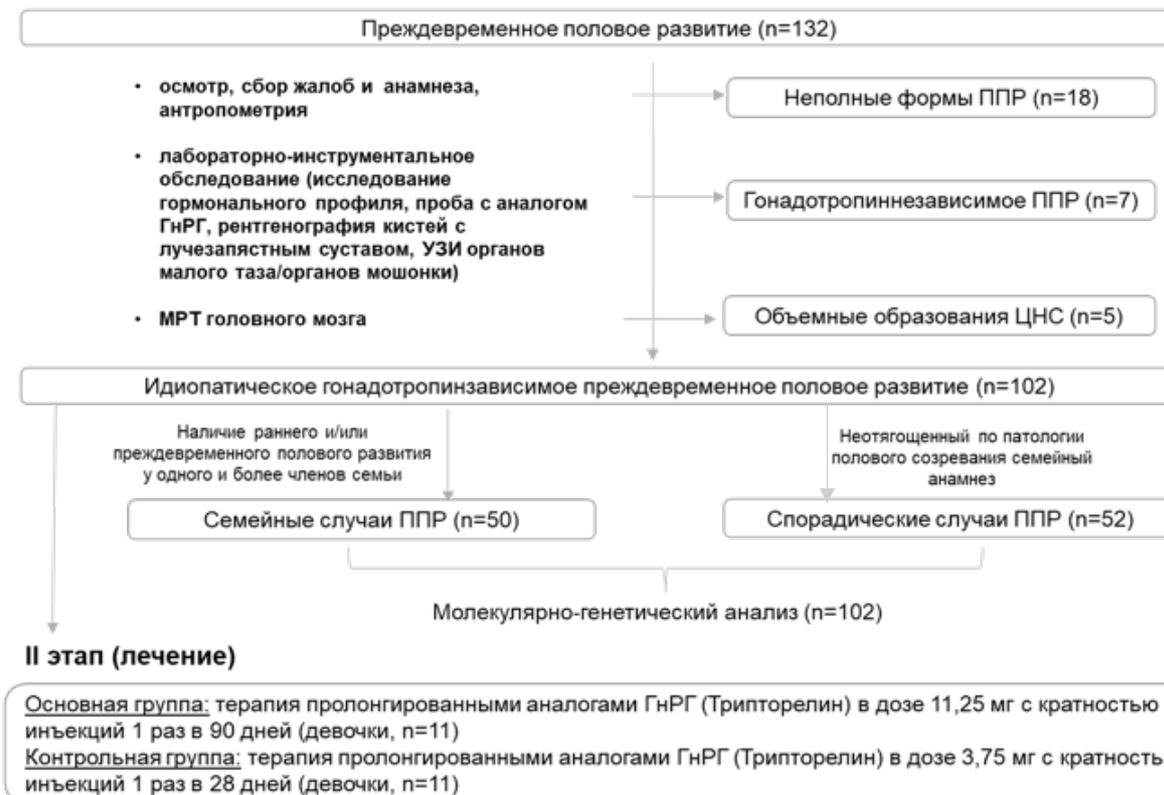


Рисунок 1. Порядок формирования групп пациентов в исследовании
Исследование состояло из двух этапов.

I этап – одноцентровое интервенционное одномоментное сравнительное исследование с использованием ретроспективно полученной информации по оценке молекулярно-генетических, клинических и лабораторно-инструментальных особенностей ППР (задачи 1 и 2).

Критерии включения в основную группу на I этапе исследования

1. Подтвержденное идиопатическое гонадотропинзависимое ППР у девочек в возрасте до 8 лет, у мальчиков в возрасте до 9 лет
2. Письменное информированное согласие родителей или законного опекуна пациента об участии в исследовании.

II этап – проспективное сравнительное исследование по оценке эффективности терапии пролонгированными аналогами ГнРГ (Трипторелин) в различных режимах в течение 1 года у 22 пациенток: 11 девочек получали Трипторелин в дозе 11,25 мг с кратностью инъекций 1 раз в 90 дней (основная

группа), 11 девочек – стандартную терапию Трипторелином в дозе 3,75 мг с кратностью инъекций 1 раз в 28 дней (контрольная группа).

Критерии включения в основную группу (произвольный способ формирования выборки): получение добровольного согласия родителей или законных представителей пациенток на терапию пролонгированными аналогами ГнРГ в дозе 11,25 мг с кратностью инъекций 1 раз в 90 дней.

Контрольная группа сформирована путем подбора пар к пациенткам основной группы по следующим критериям: хронологический возраст (разница возраста на момент начала лечения не более 6 месяцев); костный возраст (разница костного возраста на момент начала лечения не более 12 месяцев).

Через 6 месяцев от начала терапии проводилась оценка полового развития и исследование уровня половых гормонов (ЛГ, эстрадиол за 1-3 дня до очередной инъекции препарата). Критерии эффективности терапии – отсутствие прогрессии полового развития, значения ЛГ менее 0,5 Ед/л, эстрадиола – менее 70 пмоль/л (Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие», ID 648, 2021 г.). Через 12 месяцев от начала терапии проводился контроль антропометрических параметров, УЗИ органов малого таза, рентгенография кистей с лучезапястными суставами и исследование уровня половых гормонов. Критерии эффективности – отсутствие прогрессии полового развития и костного созревания, снижение скорости роста до возрастной нормы (Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие», ID 648, 2021 г.).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое обследование

Всем пациентам проведен сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, анализ наследственного анамнеза. Оценка антропометрических параметров (измерение роста, скорости роста), расчет показателей SDS роста и SDS скорости роста, SDS массы тела и SDS индекса массы тела проведен

посредством компьютерной программы Auhology 1,0 b17 (Pfizer, США). Половое развитие оценивалось по шкале Таннер.

Лабораторное обследование

Исследование уровней ЛГ, ФСГ, эстрадиола и тестостерона проводилось всем пациентам в клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России на автоматическом иммунохемилюминесцентном анализаторе Vitros 3600 Ortho Clinical Diagnostics, «Johnson & Johnson», США (зав. лабораторией – к.м.н. Никанкина Л.В.). За допубертатные нормы половых гормонов принимались уровни ЛГ менее 0,2 Ед/л, эстрадиола менее 55 пмоль/л, тестостерона менее 0,6 нмоль/л (Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие», ID 648, 2021 г.) При проведении функциональной пробы с аналогом ГнРГ (Бусерелин по 150 мкг интраназально) оценивались базальные и стимулированные уровни ЛГ и ФСГ на 60 и 240 минутах. Диагностически значимым считался выброс ЛГ более 6 Ед/л и отсутствие значимого превышения стимулированного ФСГ над ЛГ. Согласно отечественным клиническим рекомендациям «Преждевременное половое развитие» девочкам при стадии полового развития по Таннер 3 и более в сочетании с пубертатными базальными значениями ЛГ, проба с аналогом ГнРГ не проводилась.

Инструментальное обследование

Ультразвуковое исследование проводилось всем пациентам с использованием конвексного датчика с частотой 3,5–5 МГц при проведении УЗИ органов малого таза и с использованием линейного датчика с частотой 1–12 МГц при проведении УЗИ органов мошонки в консультативно-диагностическом центре ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (руководитель – д.м.н. Волеводз Н.Н.). Допубертатными нормами (возраст 2 - 7 лет) считались размеры матки соответствующие 3,2x1,5x0,9 см, объем яичников не превышающий 1,7 см³ (Клинические рекомендации «Преждевременное половое развитие», ID 648, 2021 г.). Объем тестикул

рассчитывался по формуле объема эллипсоида: $0,52 \times d1 \times d2 \times d3$, где $d1$, $d2$, $d3$ — переднезадний, верхненижний размеры яичка и толщина.

Рентгенография кистей с лучезапястными суставами проводилась всем пациентам в референс-центре лучевых методов диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (руководитель – к.м.н. Тарбаева Н.В.) в прямой проекции по стандартной методике с оценкой костного возраста по рентгенологическому атласу Tanner Whitehouse (TW-20).

Магнитно-резонансная томография головы проводилась всем пациентам в референс-центре лучевых методов диагностики ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (руководитель – к.м.н. Тарбаева Н.В.) на аппарате Optima MR450w, (GE Healthcare) с напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла. Исследование проводилось в T1 и T2 взвешенных режимах по стандартной методике.

Специальные методы исследования

Молекулярно-генетический анализ проводился всем пациентам в лаборатории генетики моногенных эндокринных заболеваний Института персонализированной медицины ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (под руководством д.м.н. Тюльпакова А.Н. с 2019 г. по 2021 г., далее – к.м.н. Попова С.В.) методом массового параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS) на платформе Illumina методом парно-концевого чтения (2x100 п.о.) с использованием таргетной панели, включавшей гены *ANOS1*, *BBS1*, *BBS10*, *BBS12*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS7*, *BBS9*, *CHD7*, *DNMT3L*, *DUSP6*, *FEZF1*, *FGF17*, *FGF8*, *FGFR1*, *FLRT3*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *INSL3*, *KISS1*, *KISS1R*, *LEP*, *LEPR*, *LHB*, *MC4R*, *MKKS*, *MKRN3*, *MKS1*, *MTTP*, *NR0B1*, *NSMF*, *NTRK2*, *PCSK1*, *PNPLA6*, *POLR3A*, *POLR3B*, *PROK2*, *PROKR2*, *PROP1*, *RBM28*, *RNF216*, *RXFP2*, *SEMA3A*, *SH2B1*, *SIM1*, *SOX10*, *SPRY4*, *TAC3*, *TACR3*, *TTC8*, *WDR11* – 11 пациентам и методом полноэкзомного секвенирования – 89 пациентам. Обработка данных секвенирования проводилась с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную

последовательность генома человека (HG38), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением компьютерных алгоритмов предсказания патогенности вариантов (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, Polyphen-2 HVAR, PROVEAN, CADD). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использовались данные международного проекта gnomAD Exomes для экзонных вариантов и базы gnomAD Genomes для интронных вариантов. Для предсказания эффекта изменений в сайтах сплайсинга и прилежащих к сайту сплайсинга интронных участках использовались программы SpliceAI и AdaBoost. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использовались базы данных OMIM, HGMD, специализированные базы данных по отдельным заболеваниям при наличии таковых и литературные данные. Заключение о клинической значимости найденных вариантов даны с учетом рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) и российского руководства по интерпретации данных NGS. В заключение включались только те варианты, которые имеют возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента. Полиморфизмы, классифицированные по различным критериям как нейтральные, не включались в заключение. Средняя глубина покрытия составила не менее 70x, процент целевых нуклеотидов с эффективным покрытием >10x — не менее 97%. Двум пациенткам (n=2) с фенотипическими проявлениями синдрома Темпл проведено цитогенетическое исследование методом ХМА в лаборатории молекулярной патологии медико-генетического центра «Геномед».

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, протокол № 26 от 22.12.2021.

Статистический анализ данных

Размер выборки не был рассчитан предварительно. Количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала: Ме [Q1; Q3] для всех параметров, кроме эхографических размеров матки и яичников, которые представлены в виде среднего, минимального и максимального значений (мин; макс). Качественные характеристики представлены в виде абсолютных значений (n) и/или частот (%). Для выявления статистически значимых различий между двумя независимыми группами для всех количественных признаков использован критерий Манна-Уитни. 95% доверительный интервал (ДИ) для относительных частот рассчитан с помощью метода Клоппера-Пирсона (интернет-калькулятор www.graphpad.com/quickcalcs/confinterval11). Частоты категориальных признаков сравнивались между собой с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Расчет данных производился с помощью статистического пакета Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., США). Пороговым уровнем статистической значимости P считались значения менее 0,05. Для нивелирования проблемы множественных сравнений применялась поправка Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В анализ клинико-лабораторных параметров было включено 102 ребенка с идиопатическим ППР: 95 девочек (93,1% случаев, 95% ДИ [86,3; 96,9]) в возрасте от 1 года до 8 лет и 7 мальчиков (6,9% случаев, 95%ДИ [3,1; 13,7]) в возрасте от 1 года 3 месяцев до 9 лет. Медиана (Ме) возраста дебюта заболевания среди всех детей составила 6 [5; 7] лет, Ме возраста на момент постановки диагноза – 7 [6,3; 7,7] лет.

Согласно данным наследственного анамнеза семейные формы ППР, где у одного и более родственников отмечалось ППР, составили 49,0% (n=50, 95%ДИ [39,5; 58,6]). При этом у 24 пациентов ППР отмечалось у родственников по отцовской линии (23,5%, 95%ДИ [16,3; 32,7]), у 16 пациентов – по материнской линии (15,7%, 95%ДИ [9,8; 24,0]), у 10 пациентов

ППР диагностировано у сибсов при клинически здоровых родителях и других членов семьи (9,8%, 95%ДИ [5,2; 17,3]). В 51% случаев (n=52, 95%ДИ [41,4; 60,5]) семейный анамнез не был отягощен по патологии полового развития – спорадическая форма заболевания (рис. 2)

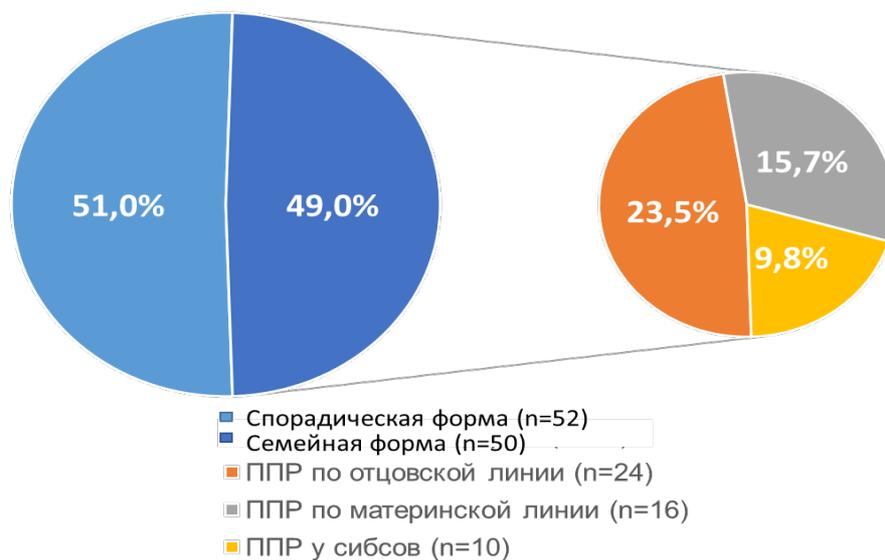


Рисунок 2. Особенности наследования ППР в исследуемой группе детей

Среди 95 девочек у 45 была диагностирована семейная форма ППР (47,4%, 95% ДИ [37,6; 57,3]), у 50 – спорадическая (52,6%, 95%ДИ [42,7; 62,4]). У всех отмечался правильный порядок появления вторичных половых признаков (первый симптом заболевания в 100% случаев – телархе), у 13 девочек к моменту первичного обследования манифестировало менархе: Ме возраста наступления менархе 7 [6,5; 8,7] лет. Установлено, что при спорадической форме ППР отмечается более ранняя диагностика заболевания в сравнении с семейной формой ($p = 0,0002$), что вероятнее обусловлено большей настороженностью родителей, половое развитие которых начиналось в декретированные сроки. Остальные параметры, включая возраст манифестации ППР, были сопоставимы между группами (табл. 1).

Среди 7 мальчиков у 5 пациентов отмечался семейный характер заболевания, у 2 пациентов – спорадический. Учитывая малочисленность данной группы, сравнительный анализ не проводился.

Таблица 1. Клинические и лабораторно-инструментальные характеристики пациенток с семейной и спорадической формой ППР

Показатель	Семейная форма ППР (n=45)	Спорадическая форма ППР (n=50)	p
Возраст манифестации, лет	6,0 [5,0; 7,0]	6,0 [5,0; 6,3]	0,087
Возраст постановки диагноза, лет	7,4 [6,9; 7,8]	6,7 [6,0; 7,1]	0,0002
SDS роста, SD	1,9 [1,1; 2,2]	2,1 [1,2; 2,9]	0,227
Скорость роста, см	8,2 [7,1; 9,4]	9,2 [8,0; 11,0]	0,019
SDS скорости роста, SD	2,9 [1,9; 3,7]	3,3 [2,1; 5,0]	0,086
Костный возраст, лет	10,0 [8,9; 11,0]	9,0 [7,5; 10,4]	0,039
Опережение КВ, лет	2,6 [2,0; 3,3]	2,7 [1,8; 2,7]	0,955
Эхографические размеры матки			
Длина, см	3,4 (2,0; 5,0)	3,3 (1,0; 4,7)	0,796
Ширина, см	2,2 (1,2; 3,9)	1,9 (1,0; 3,5)	0,129
Толщина, см	1,5 (0,3; 2,8)	1,5 (0,8; 2,5)	0,752
Толщина м-эхо, мм	2,1 (0; 8,1)	2,1 (0; 9,0)	0,925
Объем яичников			
Правый яичник, см ³	3,1 (0,9; 9,2)	2,7 (0,9; 6,4)	0,462
Левый яичник, см ³	3,0 (0,6; 7,2)	2,6 (0,6; 6,0)	0,274
Базальные уровни половых гормонов			
ЛГ, Ед/л	1,7 [0,4; 4,0]	1,4 [0,7; 3,6]	0,628
ФСГ, Ед/л	4,7 [2,4; 6,0]	4,0 [3,0; 6,0]	0,586
Эстрадиол, пмоль/л	99,5 [84,0; 142,0]	93,0 [44,0; 125,0]	0,291
Максимальный уровень гонадотропинов на пробе с аналогом ГнРГ			
ЛГ, Ед/л	24,8 [11,0; 44,2], n=32	24,9 [14,7; 43,0] n=41	0,570
ФСГ, Ед/л	25,5 [15,0; 32,1] n=32	26,1 [15,3; 32,7] n=41	0,968

Примечание: количественные данные представлены в виде Ме [Q1; Q3] для всех параметров, эхографические размеры матки и яичников представлены в виде среднего (мин; макс) значений. Для проведения сравнительного анализа двух групп использовался критерий Манна-Уитни. Пороговый P=0,002 (после применения поправки Бонферрони)

Результаты молекулярно-генетического анализа у детей с преждевременным половым развитием

Всем пациентам (n=102) было проведено молекулярно-генетическое исследование, по результатам которого генетические дефекты были идентифицированы у 26 пациенток (25,5%, 95%ДИ [18,0; 34,8]): у 14 – гетерозиготные варианты в гене *MKRN3* (53,8%, 95%ДИ [35,4; 71,2]), у 10 (38,5%, 95%ДИ [22,4; 57,5]) – редкие однонуклеотидные варианты в генах, ассоциированных с нейроэндокринными механизмами работы ГГГО и потенциальной взаимосвязью с фенотипом ППП (*MAP1B, POU1F1, NPFFR1, KISS1R, MYT1L, MAPK8IP3, GPR12, NR3C1, HERC2, TSC2*), у 2 пациенток – делеции участка 14 хромосомы (7,7%, 95%ДИ [1,02; 25,1]), рис. 3.

В общей сложности, среди исследуемой группы детей с семейной формой ППП (n=50) вариантные замены удалось идентифицировать у 15 пациенток (30,0% случаев, 95%ДИ [19,0; 42,8]). При спорадической форме ППП (n=52) генетические дефекты выявлены у 11 пациенток (21,1% случаев, 95%ДИ [12,0; 34,2]).

Все пациентки с идентифицированными заменами (n=24) имели классический симптомокомплекс ППП (табл.2), у 2 пациенток с делециями 14 хромосомы наблюдался фенотип синдрома Темпл – маловесность к сроку гестации, мышечная гипотония и вялость сосания в младенчестве, задержка психо-моторного развития, характерные стигмы дисэмбриогенеза (акромикрия, микрогнатия, клинодактилия), ожирение, гонадотропинзависимое ППП.

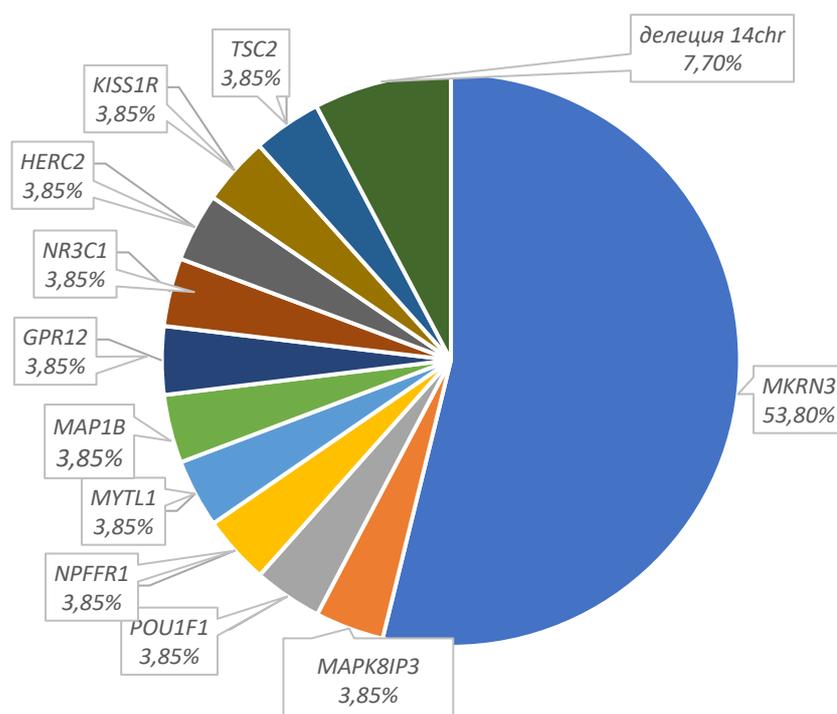


Рисунок 3. Полиморфизм результатов молекулярно-генетического анализа у пациенток с ППР (%)

Согласно данным биоинформатических алгоритмов предсказания патогенности патогенные и вероятно-патогенные варианты замены, ассоциированные с нейроонтогенезом и регуляцией работы ГГГО, были выявлены у 21 из 26 пациенток (80,8%, 95%ДИ [61,7; 91,9], у 3 пациенток идентифицированные варианты имели нейтральный характер (11,5%, 95%ДИ [3,2; 29,8]). Нельзя исключить, что данные варианты способны влиять на эффективность и скорость трансляции, нарушая тем самым функцию белка, что не позволяет отклонить их взаимосвязь с патогенезом заболевания. Патогенными также считались вариации числа копий (делеции длинного плеча 14 хромосомы), диагностированные методом ХМА у 2 пациенток с фенотипом синдрома Темпл (7,7%, 95% ДИ [1,02; 25,3]).

Таблица 2. Результаты молекулярно-генетического анализа у пациенток с ППР

Данные семейного анамнеза	№ пациента	Возраст, годы		Молекулярно – генетический анализ				
		Манифестации	Постановки диагноза	Ген	Вариант, белок	Тип мутации	In silico анализ	Патогенность ACMG
ППР у членов семьи по отцовской линии	1	5,0	6,6	MKRN3 (NM_005664.4)	c.690dupT (p. T230fs)	Fs	П	ВП
	2	6,0	7,8	MKRN3 (NM_005664.4)	c.1091G>C (p. Cys364Ser)	M	П	ВП
	3	5,8	7,0	MKRN3 (NM_005664.4)	c.1091G>C (p. Cys364Ser)	M	П	ВП
	4	4,2	5,1	MKRN3 (NM_005664.4)	c.118G>T (p.E40X)	N	П	ВП
	5	5,0	9,1	MKRN3 (NM_005664.4)	c.118G>T (p.E40X)	N	П	ВП
	6	6,5	8,0	MKRN3 (NM_005664.4)	c.118G>T (p.E40X)	N	П	ВП
	7	5,0	6,9	MKRN3 (NM_005664.4)	c.343T>A (p.Cys115Ser)	M	П	НКЗ
	8	6,5	6,11	MKRN3 (NM_005664.4)	c.343T>A (p.Cys115Ser)	M	П	НКЗ
	9	6,1	7,0	MKRN3 (NM_005664.4)	c.1091G>C (p.Cys364Ser)	M	П	ВП
	10	5,0	5,4	MAP1B (NM_005909.5)	c.1456C>T (p. Arg486Ter)	N	П	ВП
ППР у членов семьи по материнской линии	11	0,4	4,1	POU1F1 (NM_000306.4)	c.370A>G (p.Met124Val)	M	Н	НКЗ
	12	7,2	7,4	NPF1 (NM_022146.5)	c.452A>T (p.Glu151Val)	M	ВП	НКЗ
	13	7,5	7,8	MYT1L (NM_001303052.2)	c.2311G>C (p.Gly771Arg)	M	ВП	НКЗ
	14	4,0	7,5	MAPK8IP3 (NM_001318852.2)	c.3830G>T (p.Gly1277Val)	M	Н	НКЗ
ППР у сибсов	15	6,0	7,3	MKRN3 (NM_005664.4)	c.1199G>C (p.Cys400Ser)	N	ВП	НКЗ

Спорадическая форма ППР	16	7,0	8,0	<i>GPR12</i> (NM_005288.4)	c.166A>G (p. Thr56Ala)	M	ВП	НКЗ
	17	7,0	7,5	<i>NR3C1</i> (NM_001018077.1)	c.862A>T (p. Thr288Ser)	M	ВП	НКЗ
	18	6,0	6,4	<i>HERC2</i> (NM_004667.6)	c.2797_2798del (p.Leu933SerfsTer8)	Fs	П	НКЗ
	19	0,8	1,8	<i>KISS1R</i> (NM_032551.5)	c.220C>G (p.Arg74Gly)	M	Н	НКЗ
	20	6,3	6,7	<i>TSC2</i> (NM_000548.5)	c.2932C>T (p.Arg978Cys)	M	ВП	НКЗ
	21	4,8	7,0	<i>MKRN3</i> (NM_005664.4)	c.982C>T (p.Arg328Cys)	M	П	ВП
	22	7,7	8,3	<i>MKRN3</i> (NM_005664.4)	c.1088A>G (p. Gln363Arg)	M	ВП	НКЗ
	23	6,7	7,0	<i>MKRN3</i> (NM_005664.4)	c.482dup (p.Ala162GlyfsTer15)	Fs	П	НКЗ
	24	6,0	7,0	<i>MKRN3</i> (NM_005664.4)	c.1033C>T (p.Arg345Cys)	M	П	НКЗ

Примечание: П – патогенный, ВП – вероятно патогенный, Н – нейтральный, НКЗ – неопределенная клиническая значимость; М – missense, N – nonsense; Fs – frameshift; ASMG – American College of Medical Genetics and Genomic; in silico анализ – биоинформатические алгоритмы предсказания патогенности

Моногенные формы ППР, обусловленные вариантными заменами в гене *MKRN3*

Частота дефектов гена *MKRN3* в исследуемой выборке пациентов с гонадотропинзависимым ППР (n=102) составила 13,7% (95%ДИ [8,2; 21,9]), которые были детектированы у 14 девочек из 10 семей. У 10 из 14 пациенток заболевание имело семейный характер (71,4%, 95%ДИ [44,9; 88,7]), у 4 пациенток – спорадический (28,6%, 95%ДИ [11,3; 55,0]).

В общей сложности, среди 14 девочек идентифицировано 9 различных вариантных замен, среди которых 7 не были описаны ранее (77,8%, 95%ДИ [44,3; 94,7]), однако миссенс мутация с.1091G>C (p.Cys364Ser) выявлена у трех девочек из двух неродственных семей. Ранее не описанные варианты (p.E40X, p.T230Fs, p.Cys115Ser, p.Cys364Ser, p.Gln363Arg, p.Cys400Ser – выделены красным цветом) находятся в непосредственной близости с критическими регуляторными областями гена, определяющими функциональную активность белка (СЗН1 и СЗНС4) и известными мутациями, описанными в объединенном исследовании Valadares L. et al, что позволяет предположить роль данных вариантов в развитии фенотипа заболевания в исследуемой когорте (рис. 4).

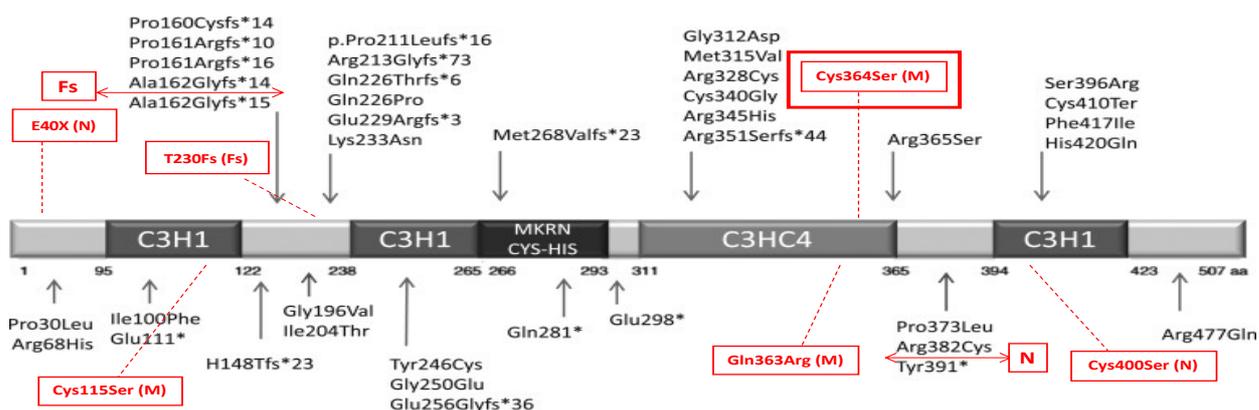


Рисунок 4. Мутации в гене *MKRN3*, идентифицированные у девочек с ППР (Valadares L. et al.,2019).

Таким образом, у 14 из 95 пациенток диагностирована моногенная форма ППР (вследствие гетерозиготных мутаций в гене *MKRN3*), у 69 из 95 пациенток – идиопатическая (генетически недетерминированная) форма

заболевания. При моногенной форме ППР отмечена тенденция к более выраженной прогрессии полового развития по шкале Таннер ($p=0,025$) и тенденция к большему ускорению роста ($p=0,0055$) на момент первичного обследования (рис. 5 и 6). Остальные параметры (возраст манифестации, возраст постановки диагноза, лабораторно-инструментальные характеристики) были сопоставимы между группами.

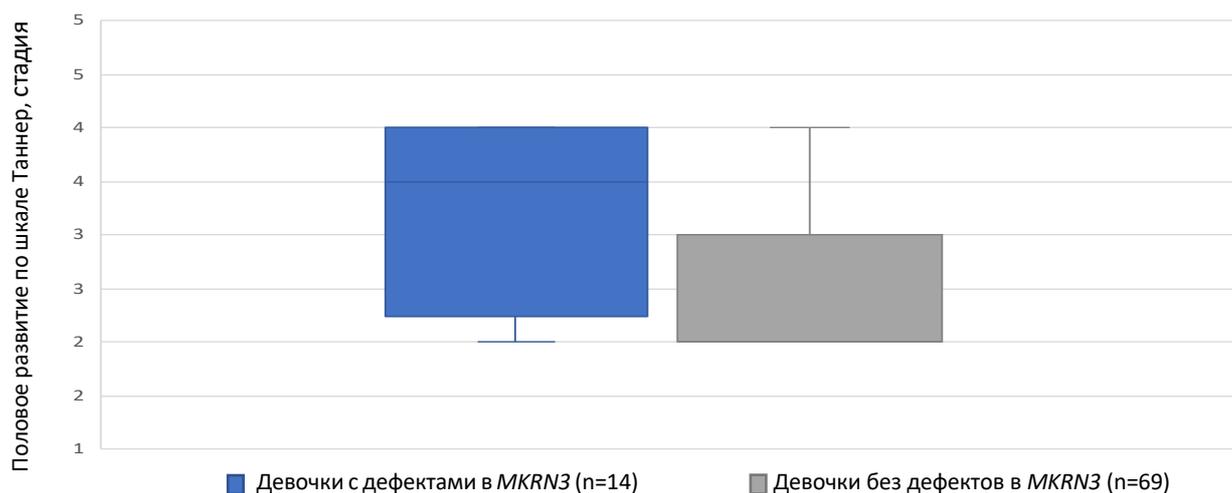


Рисунок 5. Стадия полового развития по шкале Таннер при первичном обследовании, Me [Q1; Q3].

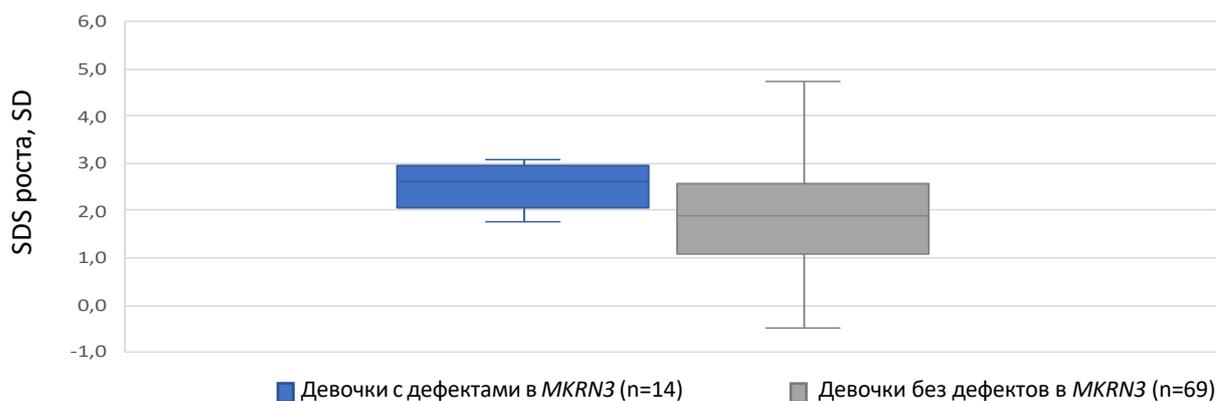


Рисунок 6. SDS роста при первичном обследовании, Me [Q1; Q3].

В большинстве случаев среди пациенток с семейной формой ППР при мутациях в гене *MKRN3* прослеживался аутосомно-доминантный характер наследования с неполной пенетрантностью, зависящей от пола. Анализ семейного анамнеза позволил проследить наличие феномена импринтинга, характерного для дефектов в *MKRN3* – в 64,3% случаев (95%ДИ [38,6; 83,2])

вариантные замены выявлены у пациенток с анамнезом, отягощенным по отцовской линии (рис.7).

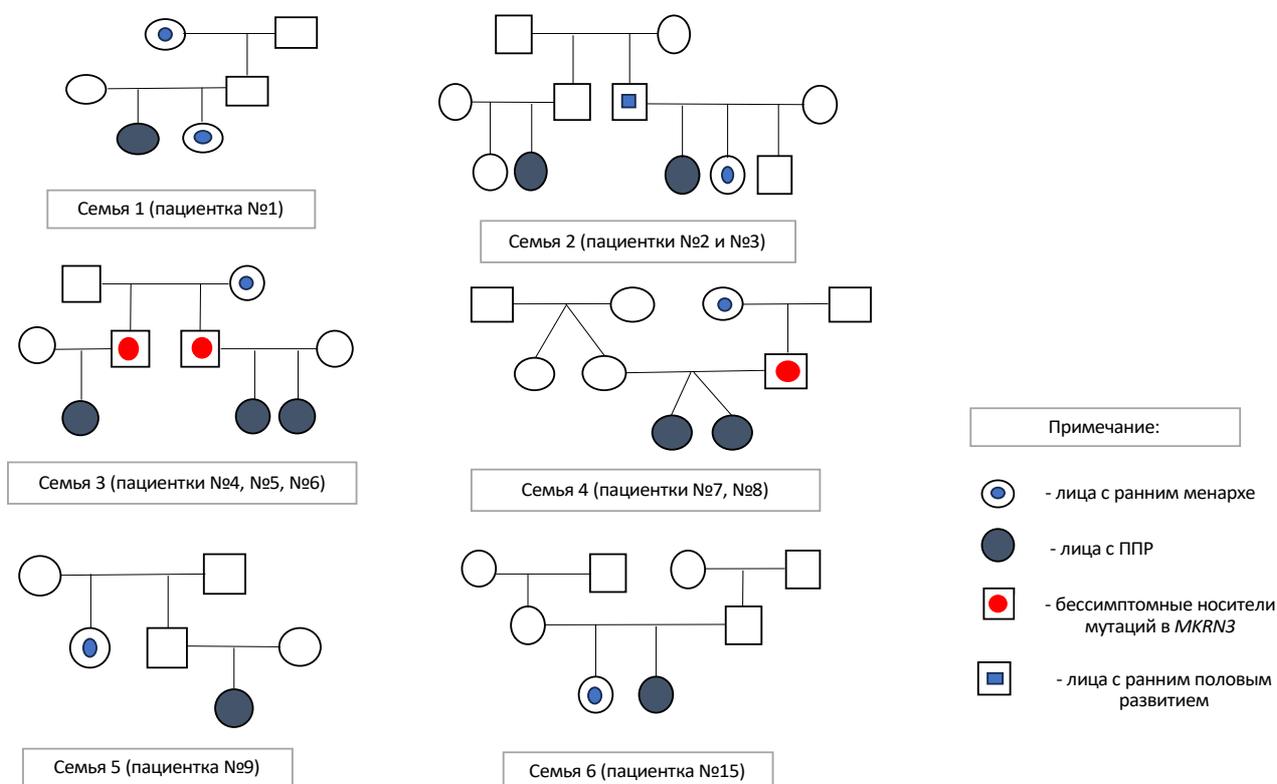


Рисунок 7. Особенности наследования мутаций в гене *MKRN3* при семейных вариантах ППР

Медикаментозная терапия ППР пролонгированными аналогами ГнРГ

Второй этап исследования заключался в сравнении эффективности различных режимов терапии пролонгированными аналогами ГнРГ в течение 1 года непрерывной терапии.

За 1 год терапии у всех пациенток удалось достичь компенсации основного заболевания (отсутствие прогрессии вторичных половых признаков, снижение скорости роста, отсутствие прогрессии костного созревания). Тем не менее, на терапии 11,25 мг 1 раз в 90 дней (в сравнении с введением 3,75 мг 1 раз в 28 дней) отмечена тенденция к большему замедлению темпов роста (5,0 [4,5; 6,0] см/год против 3,0 [1,5; 4,0] см/год, $p=0,008$) и SDS скорости роста (5,1 [3,9; 6,2] SD/год против 1,8 [0,9; 3,6]

SD/год, $p=0,003$), рис. 8 и 9. За 12 месяцев наблюдения нежелательные реакции не были зафиксированы ни в одной из групп лечения.

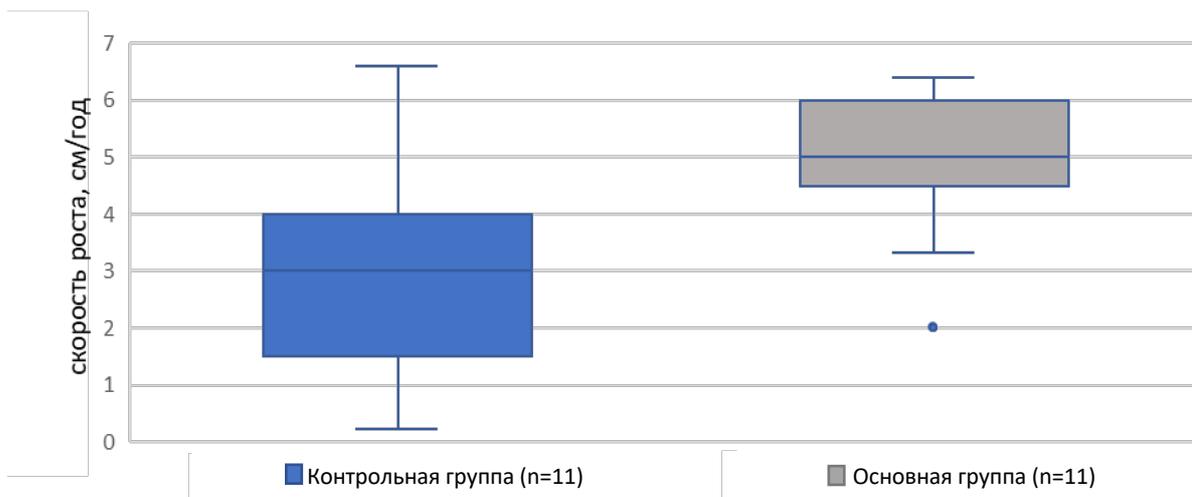


Рисунок 8. Динамика снижения скорости роста (см/год) за год терапии, Me [Q1; Q3])

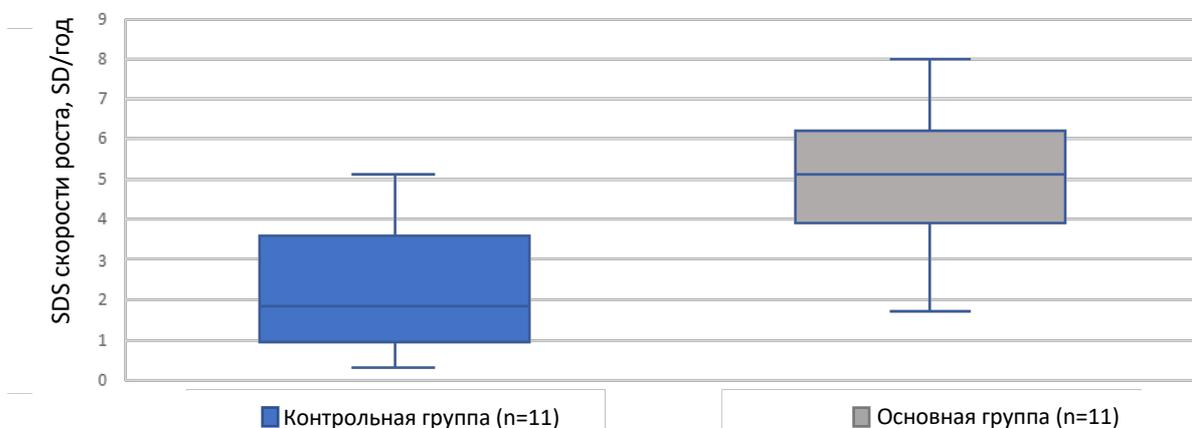


Рисунок 9. Динамика снижения SDS скорости роста (SD/год) за 1 год терапии, Me [Q1; Q3].

При оценке параметров лабораторной компенсации через 6 и 12 месяцев от начала лечения не все пациентки соответствовали критериям полной биохимической компенсации как в основной, так и в контрольной группах (табл. 3). Учитывая полный клинический ответ на проводимое лечение у всех пациенток, оба режима терапии были признаны эффективными.

Таблица 3. Сравнение эффективности медикаментозной терапии у пациенток с ППР по параметрам лабораторной компенсации

Параметры	Основная группа (n=11)	Контрольная группа (n=11)	p
Гормональный профиль через 6 месяцев терапии			
Снижение эстрадиола ниже 70 пмоль/л	10 (90,9%)	8 (72,7%)	0,760 ²
Снижение ЛГ ниже 0,5 Ед/л	7 (63,6%)	10 (90,9%)	0,747 ²
Гормональный профиль через 1 год терапии			
Снижение эстрадиола ниже 70 пмоль/л	9 (81,8%)	10 (90,9%)	1,000 ²
Снижение ЛГ ниже 0,5 Ед/л	10 (90,9%)	11 (100,0%)	1,000 ²

Примечание: описательная статистика качественных в виде абсолютных и относительных частот (n, %). Частоты категориальных признаков сравнивались с помощью двустороннего точного критерия Фишера (p^2). Пороговый $P=0,0125$ (после применения поправки Бонферрони)

Таким образом, терапия пролонгированными аналогами ГнРГ в дозе 11,25 мг ежеквартально обладает сопоставимой эффективностью и безопасностью в сравнении с введением 3,75 мг ежемесячно.

ВЫВОДЫ

1. Семейные варианты гонадотропинзависимого ППР встречаются в 49,0% случаев (95%ДИ [39,5; 58,6]), среди которых в 30,0% случаев (95%ДИ [19,0; 42,8]) обнаружены вариантные замены в генах, ассоциированных с регуляцией работы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и фенотипом ППР. При спорадических вариантах ППР генетические дефекты выявлены в 21,1% случаев (95%ДИ [12,0; 34,2]).
2. Среди идентифицированных дефектов в генах-кандидатах преобладали варианты в гене *MKRN3* – 53,8% случаев (95%ДИ [35,4; 71,2]), редкие однонуклеотидные варианты в генах-кандидатах, ассоциированных с нейроонтогенезом (*MAP1B, POU1F1, NPFFR1, KISS1R, MYT1L, MAPK8IP3, GPR12, NR3C1, HERC2, TSC2*) составили 38,5% случаев (95%ДИ [22,4; 57,5]), в 7,7% случаев (95%ДИ [1,02; 25,1]) выявлены делеции участка 14 хромосомы (синдром Темпл).
3. Различий в фенотипах у детей с моногенной и генетически недетерминированной формой ППР не выявлено. При спорадических формах ППР отмечается более ранняя диагностика заболевания в сравнении с семейными формами (6,7 [6,0; 7,1] лет против 7,4 [6,9; 7,8] лет).
4. Терапия пролонгированными аналогами ГнРГ в дозе 11,25 мг ежеквартально обладает сопоставимой клинической эффективностью и безопасностью в сравнении со стандартным введением 3,75 мг ежемесячно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с семейной формой преждевременного полового развития целесообразно проведение молекулярно-генетического исследования. Идентификация генетической основы позволит осуществлять медико-генетическое консультирование семей, выделять группы риска по развитию ППР, персонифицировать план наблюдения и своевременно инициировать патогенетическую терапию.

2. У детей с гонадотропинзависимым преждевременным половым развитием, маловесностью к сроку гестации и мышечной гипотонией на первом году жизни в сочетании с прадероподобными фенотипическими особенностями (избыточная масса тела и/или ожирение, акромикрия, микрогнатия, клинодактилия) целесообразно исключить аномалии 14 хромосомы методами ХМА или МЛРА.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Хабибуллина Д.А.**, Колодкина А.А., Визеров Т.В., Зубкова Н.А., Безлепкина О.Б. Гонадотропинзависимое преждевременное половое развитие: молекулярно-генетические и клинические характеристики. Проблемы Эндокринологии. 2023;69(2):58-66. <https://doi.org/10.14341/probl13215>

2. **Хабибуллина Д.А.**, Колодкина А.А., Визеров Т.В., Зубкова Н.А., Безлепкина О.Б. Генетические аспекты и клинические характеристики наследственных форм гонадотропинзависимого преждевременного полового развития // Репродуктивное здоровье детей и подростков. 2023. Т. 19, № 3. С. 74–85. <https://www.doi.org/10.33029/1816-2134-2023-19-3-74-85>

3. **Хабибуллина Д.А.**, Карева М.А., Калинин Н.Ю. Низкорениновая артериальная гипертензия, как осложнение терапии Трипторилином гонадотропинзависимого преждевременного полового развития. Сборник тезисов Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Достижения науки в практику детского эндокринолога», 4–5 декабря 2021 года. – М., 2021, С.65/
<https://doi.org/10.14341/ISAPPE-2021-62>

4. **Хабибуллина Д.А.**, Новокрещенных Е.Э., Колодкина А.А. Клинический случай синдрома Палистера-Холла. Сборник тезисов II Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Персонализированный подход в детской

эндокринологии», 29–30 марта 2022 года. – М., 2022, С.84/
<https://doi.org/10.14341/PMPE-2022-71>

5. **Хабибуллина Д.А.**, Колодкина А.А. Гонадотропинзависимое преждевременное половое развитие, обусловленное мутациями в гене *MKRN3*. Сборник тезисов III Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Молекулярно-генетические исследования в практике детского эндокринолога», 28–29 марта 2023 года. – М., 2023, С.87/ <https://doi.org/10.14341/MGSPPE-2023-90>

6. **Хабибуллина Д.А.**, Зубкова Н.А., Колодкина А.А. Терапия центрального преждевременного полового развития пролонгированными аналогами гонадотропин-рилизинг гормона длительного действия у девочек. Сборник тезисов III Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Молекулярно-генетические исследования в практике детского эндокринолога», 28–29 марта 2023 года. – М., 2023, С.88/ <https://doi.org/10.14341/MGSPPE-2023-91>

7. **Хабибуллина Д.А.**, Колодкина А.А., Безлепкина О.Б. Клинический случай синдрома Темпл. Сборник тезисов IV Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Эндокринная орфанетика: достижения и перспективы», 26–27 марта 2024 года. – М., 2024, С.99/ <https://doi.org/10.14341/EOAP2024-102>

8. **Хабибуллина Д.А.**, Колодкина А.А., Безлепкина О.Б. Сравнение эффективности терапии гонадотропинзависимого преждевременного полового развития пролонгированными аналогами гонадотропин-рилизинг гормона в виде ежемесячных и ежеквартальных инъекций. Сборник тезисов IV Конференции по орфанным и детским эндокринным заболеваниям с международным участием «Эндокринная орфанетика: достижения и перспективы», 26–27 марта 2024 года. – М., 2024, С.100
<https://doi.org/10.14341/EOAP2024-103>

9. **Khabibullina Dina**, Kolodkina Anna, Bezlepkina Olga, Peterkova Valentina. Genetic bases of familial central precocious puberty. 61st Annual ESPE,

21-23 September 2023, ESPE Abstracts, 97 P1-555,
<https://doi.org/10.1159/000533803>

10. **Khabibullina Dina**, Evgeniya Novokreshennyx, AnnaKolodkina. A rare case of Cystic fibrosis and Pallister-Hall syndrome combination in a 3-year-old boy. 60st Annual ESPE, 15-17 September 2022 ESPE Abstracts, 95 P2-217, <https://doi.org/10.1159/000525606>

11. Anna Kolodkina, **Dina Khabibullina**, Olga Bezlepkina, Valentina Peterkova. Genetic bases of hereditary gonadotropin-dependent precocious puberty. 25th European Congress of Endocrinology, 13-16 May 2023, Endocrine Abstracts, 90 EP915 | Doi: 10.1530/endoabs.90.EP915

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг гормон

ГГГО – гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ППР – преждевременное половое развитие

СТ – синдром Темпл

СТГ – соматотропный гормон

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХМА – хромосомный микроматричный анализ

ЦНС – центральная нервная система

MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification, метилирование-специфичная мультиплексная лигазозависимая амплификация

SDS – число стандартных отклонений от среднего