МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ

Д-Р ДИАНА ИВАНОВА ХРИСТОВА

ХОРМОНАЛЕН СТАТУС И КОСТНО ЗДРАВЕ ПРИ ДЕВОЙКИ В ПУБЕРТЕТНО-ЮНОШЕСКАТА ВЪЗРАСТ В НОРМА И РАЗЛИЧНИ ХИПОМЕНСТРУАЛНИ НАРУШЕНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Област на висше образование: Здравеопазване и спорт

Професионално направление : Медицина

Научна специалност: Акушерство и гинекология

Научен ръководител: проф. д-р Милко Маринов Сираков, д.м.

С О Ф И Я

2020

Дисертационният труд е написан на 157 стандартни страници и е онагледен с 31 фигури и 41 таблици. Библиографският списък съдържа 264 литературни източници, от които 9 на кирилица и 255 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по Акушерство и гинекология при Медицински факултет на Медицински университет - София на 10.06.2020 г., съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет - София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 23.09.2020 г. в аудиторията на СБАЛАГ "Майчин дом" ЕАД, София, съгласно чл.76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет - София пред научно жури в състав:

Председател: проф. д-р Асен Николов, д.м.- вътрешен член и рецензент
Членове:
1. доц. Румен Димитров, д.м.
2.Чл.- кор. проф. д-р Григор Горчев, д.м.н.
3. проф. д-р Стефан Ковачев, д.м.н
4. проф. д-р Елена Димитракова, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ - София и са на разположение в Катедра по Акушерство и гинекология при Медицински факултет на Медицински университет - София.

* Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Съдържание:

Използвани съкращения…….…….....3

I.Въведение…….……...….4

II. Цели и задачи…….……..…..6

III. Материали и методи…….…..7

IV. Резултати……..……...……....15

V. Обсъждане……..…...43

VI. Общи изводи……...….56

VII. Приноси……..……...….58

VIII. Публикации и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд……..…...59

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

КМП – Костна минерална плътност

ПКМ – Пикова костна маса

IL – Interleukin

GnRH – Гонадотропин освобождаващ хормон

FSH – Фоликулостимулиращ хормон

LH – Лутеинизиращ хормон

АН – Анорексия нервоза

БН – Булимия нервоза

PCOS – Polycystic ovarian syndrome/Синдром на поликистозните яйчници

ПОН – Преждевременна овариална недостатъчност

ХХЯ – хипоталамус – хипофиза - яйчник

BMI – Индекс на телесната маса

FHA – Функционална хипоталамична аменорея

MRKH - Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome

TS – Синдром на Търнар

АМХ – Анти – Мюлеров хормон

ГТ – Генитална туберкулоза

E_2 – Естрадиол

Т – Тестостерон

TSH – Тиреостимулиращ хормон

HOMA индекс – Хомеостазен модел за оценка на инсулиновата резистентност

ПТ – Прогестеронов тест

ЕПТ – Естроген – прогестеронов тест

DXA – Dual X – ray Absorptiometry

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Остеопорозата е социално значимо заболяване, което засяга повече от 40 % от всички жени над 50 години. Клиничната изява на това заболяване е в зряла възраст, но нерядко се залага в детството и юношеството. Към днешна дата остеопорозата се нарежда на второ място след сърдечно – съдовите заболявания, като изпреварва онкологичните.

Патогенезата на остеопорозата е свързана с намалена костна маса и костна крехкост, поради не достигане на оптимална пикова костна маса, повишена костна загуба и неадекватно заместване на изгубената кост дължащо се на ниско костно формиране. Пиковата костна маса се достига главно в пубертетно – юношеския период и е многофакторно обусловено, като основния процент се пада на нормалните хормонални нива и взаимодействията по между им. През пубертета главна роля за костното формиране и минерализация играят половите хормони, като го постигат чрез активиране на различни сигнални пътища, цитокини и директно повлияване на активността на костните клетки. Натрупването на костна маса нараства 5 – кратно през пубертета и е най-изразено между 11 и 14 – годишна възраст при момичетата. Натрупаната костна маса само за 3 – 4 години по време на пубертета е почти равна на костната загуба за период от 30 години след настъпване на менопаузата.

Нормалният менструален цикъл отразява хипоталамо – хипофизарната регулация на яйчниковата дейност и ендометриалните цикли. Липсата на менструация за период по-дълъг от 3 месеца се приема като анормално дори в ранните години след настъпването на menarche. Отлагането на диагностиката и лечението на състояния свързани с нарушения в менструалния цикъл може да доведе до редуциране на костната плътност. Установено е, че при млади жени с менструални нарушения до 20 годишна възраст е по-вероятно да се наблюдава ниска костна плътност в

сравнение с жени, които имат менструални нарушения след тази възраст. Рано настъпилото menarche се свързва с ранно установяване на овулаторни цикли и стабилен хормонален ритъм, докато късното му настъпване може да отнеме 8 до 12 години, докато всички менструални цикли станат овулаторни.

В литературата се срещат редица проучвания свързващи различните хипоменструални нарушения в юношеска възраст с нарушен хормонален баланс и неадекватно достигане на пикова костна маса.

В България задълбочени проучвания по въпроса липсват. Предназначението на този научен труд е дефиниране на състоянията в детско – юношеската гинекология свързани с риск за недостигане на оптимална ПКМ, което би спомогнало за своевременно и акуратно диагностициране, лечение и превенция на остеопорозата в по-късен етап от живота на жената. Откриването на зависимост между различните хипоменструални нарушения и свързаните с тях промени в костния метаболизъм би могло да спомогне за ранна диагноза и адекватна терапия на тези пациенти, за намаляване на инвалидизацията и разходите за лечение в по-късна възраст.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Да се оцени хормоналният статус при различните по етиология хипоменструални нарушения в юношеската възраст и произтичащите от тях промени в костния метаболизъм.

Задачи:

1. Да се сравнят хормоналните констелации на контролната група и пациентките с хипоменструални нарушения.
2. Да се оцени как влияят различните причини довели до менструални нарушения върху хормоналния статус.
3. Да се оцени при кой тип менструални нарушения се наблюдават отклонения в костния метаболизъм.
4. Да се оценят серумните нива на витамин Д в изследваните групи.
5. Да се оценят хормоналните констелации възоснова на пубертетното развитие.
6. Да се направи съпоставка между индекс на телесната маса и промените в хормоналните нива, както и костния метаболизъм.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III.1 КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ, МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

В проучването бяха изследвани 174 пациентки на възраст от 12 до 18 години, като от тях 42 здрави – ‘‘контроли‘‘, 25 пациентки с първична аменорея, 71 пациентки с вторична аменорея и 36 пациентки с опсоменорея.

Родител – настойник е декларирал писмено информирано съгласие за участие в проучването.

Логическа единица

Определени бяха четири основни групи участващи девойки, като се спазиха следните критерии за включване и изключване на единиците в проучването:

Включващи критерии:

Контролна група

1. Момичета във възрастов диапазон от 12 до 18 години
2. Писмено съгласие за участие в изследването
3. Нормален менструален цикъл
4. Трансабдоминална или транвагинална ехография на матка и яйчници без патологични отклонения
5. Референтни серумни нива на LH, FSH, Estradiol, Prolactin и др.

Случаи с първична аменорея

1. Момичета във възрастов диапазон от 15 до 18 години
2. Писмено съгласие за участие в изследването
3. Липса на menarche до 15 годишна възраст и/или развити вторични полови белези до 13 годишна възраст

Случаи с вторична аменорея

1. Момичета във възрастов диапазон от 12 до 18 години
2. Писмено съгласие за участие в изследването
3. Липса на менструация за 3 месеца при нормални менструални цикли до момента или липса на менструация за 6 месеца при поначало нередовни менструални цикли

Случаи с опсоменорея

1. Момичета във възрастов диапазон от 12 до 18 години
2. Писмено съгласие за участие в изследването
3. Критерии за PCOS ASRM/ESHRE 2003

Изключващи критерии :

1. Ендокринна патология с тиреоиден, надбъбречен произход
2. Тежки остри и хронични заболявания
3. Вродени заболявания засягащи опорно – двигателния апарат
4. Първична аменорея поради синдром на Суайър, синдром на Морис, синдром на MRKH
5. Прием на Орални контрацептиви, ГКС
6. Бременност
7. Отказ за участие в проучването

Дизайн и постановка на проучването

С оглед изпълнението на целта и задачите, настоящото изследване беше изградено като проспективно сравнително клинично проучване тип “случай – контрола“ при българската популация на случаи с хипоменструални нарушения и здрави контроли с общ брой 174 участнички. Бяха обособени следните групи :

- Здрави пациентки – контролна група – 42 момичета
- Пациентки с първична аменорея – 25 момичета
- Пациентки с вторична аменорея – 71 момичета
- Пациентки с опсоменорея – 36 момичета

Протокол на изследването

1. Обща част – данни за физическата характеристика на пациентката – име, възраст, ръст, телесна маса, BMI.
2. Клинична част – menarche, особености на менструалния цикъл, придружаващи заболявания, акушеро – гинекологична анамнеза, особености в хранителните навици, спортуване, стрес, промяна в телесното тегло, ултразвуково изследване, остеоденситометрия, кариотипизиране (където е било показано такъв вид изследване).
3. Клиниколабораторна част – серумни нива на LH, FSH, Prolactin, Estradiol, vit. D, Osteicalcin, β – CrossLaps, AMH.

Клинична част – изследвани показатели

Всяко момиче беше изследвано по индивидуална програма, в която за всеки отделен случай бе пресметнато на коя дата кое изследване да бъде проведено.

След подробно снетата фамилна и настояща анамнеза и попълване на фиш (за всеки отделен случай) беше оценена степента на развитие на вторичните полови белези съгласно възприетата в литературата и практиката у нас класификация на Tanner – телархе, пубархе, адренархе. Беше извършена оценка и на наличието или липсата на хирзутизъм, мустаци, под брадата, долна част на корема, стернум, пубис.

Телархе :

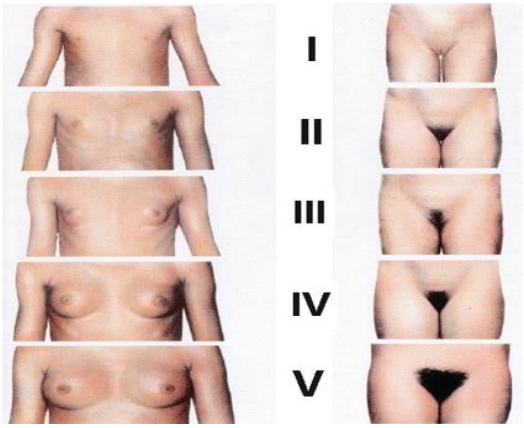
I степен – стадий на "гръдното зърно", когато е повдигната само папилата.

II степен – стадий на "гръдната пъпка", "бутон", повдигане на папилата и гърдата. Ареолата се увеличава и пигментира интензивно.

III степен – стадий на "двете могилки". По – нататъшно увеличаване на гърда и ареола, без да се отделят контурите им.

IV степен – изпъкване на ареолата и папилата, които образуват вторична изпъкналост над нивото на гърдата.

V степен – стадий на зряла гърда. Няма разлики между нивото на ареолата и гърдата. Папилата е издигната. Гърдата е с характерната полусферична форма.



Адренархе :

I степен – без окосмеване.

II степен – единични прави, дълги, пигментирани косми.

III степен – рядко оксмяване.

IV степен – поява на къдравост на космите.

V степен – гъсто оксмяване с къдрави и пигментирани косми.

Пубархе :

I степен – без окосмеване.

II степен – единични прави, дълги, пигментирани косми.

III степен – окосмяването се разширява със засилено пигментирани и къдрави косми.

IV степен – окосмяването е като при зряла жена, но заема по – малко площ.

V степен – окосмяването завършва отгоре с хоризонтална права линия и преминава отчасти по вътрешната повърхност на бедрата.

Първична аменорея – липса на първа менструация до 15 годишна възраст и/или липса на развити вторични полови белези до 13 годишна възраст.

Вторична аменорея – Липса на менструация за 3 месеца при предходен стабилен менструален цикъл и липса на менструация за 6 месеца при предходен нередовен/ нестабилен менструален цикъл.

Опсоменорея – Менструални интервали по-дълги от 35 дни.

Инструментално изследване

Трансабдоминална или трансвагинална ехография на малък таз беше извършена с цел оценка наличие на фоликули, дебелина на маточна лигавица, ПЗР на матка. Иследването се извърши с MEDISON Accuvix V 20.

Остеодензитометрията беше използван софтуер, специализиран за оценка на костна плътност и изчисляване на Z – score (стандартни отклонения от очакваните стойности за индивиди от същия пол, възраст и телесни размери) в детско – юношеска възраст.

Клиниколабораторна част

Серумните нива на LH, FSH, Estradiol, AMH, Prolactine бяха измерени по време на ранната фоликуларна фаза на менструалния цикъл, като при пациентки с менструални нарушения времето на изследване на показателите се съобрази с конкретната патология или след предизвикано маточно кървене посредством прогестини. Пробите бяха взети сутрин между 8:00 и 10:00 часа на гладно след покой половин час преди венепункцията.

Основни клиниколабораторни показатели

Фоликулостимулиращият хормон (FSH), лутеинизиращият хормон (LH) и пролактинът са измервани в серум с високочувствителни

имунорадиометрични методи (ИРМА), използващи две моноклонални антитела, с китове на фирмата „Immunotech, France.

Референтни стойности жени, фоликуларна фаза:

FSH – 1 – 10 IU/L

LH – 2 – 10 IU/L

Prolactin – до 600 mIU/L

Естрадиол (E_2) е определян в серум с радиоимунологичен метод (РИА) с китове от „Immunotech, France.

Референтни стойности жени фоликуларна фаза: 90 – 550 pmol/L

Анти – Мюлеровият хормон (AMH) е определян в серум по метод „ AMH Gen II ELISA" (Beckman Coulter, USA). Анализът е считан за най-чувствителния понастоящем и използва две моноклонални антитела от Diagnostic Systems Laboratories, USA.

Аналитична чувствителност 0.08 ng/ml; прецизност: intra – assay 3.4 – 5.4 %; inter-assay 4 – 5.6 %. **Референтни стойности според метода:** момичета - 1 – 8.9 ng/ml

N – MID Osteocalcin, β – CrossLaps и 25 Hydroxyvitamin D total (25OHD) са измервани чрез електрохемилуминисцентен анализ (ECLIA) на имуноанализатор „Cobas e411", Roche.

Референтни стойности

N – MID Osteocalcin

10 – 13 години 49 – 167 ng/mL

14 – 17 години 14 – 85 ng/mL

>17 години 8 – 32 ng/mL

β – CrossLaps

10 – 13 години 0.519 – 2.415 ng/mL

14 – 17 години 0.242 – 1.291 ng/mL

25OHD

< 10 ng/ml – тежък дефицит

10 – 20 ng/ml – дефицит

20 – 30 ng/ml – недостатъчност

Над 30 ng/ml – нормални серумни нива

Показатели за уточняване и изключване на друга ендокринна патология

Ca – Calcium / Калций общ – спектрофотометрия с хромоген NM – BAPTA (Roche/Hitachi cobas c)

Референтни стойности :

Ca – Calcium / Калций общ

12 – 18 години 2.1 – 2.55 mmol/L

P – Phosphate / общ фосфор – спектрофотометрия с молибдат (Roche/Hitachi cobas c)

12 – 15 години 0.9 – 1.65 mmol/L

15 – 18 години 0.8 – 1.6 mmol/L

III.2 СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25.0. и MedCalc Version 14.8.1. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0.05$.

Бяха приложени следните методи:

1. ***Дескриптивен анализ*** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.

2. ***Графичен анализ –*** за визуализация на получените резултати**.**

3. ***Вариационен анализ*** – изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване.

4. ***Сравняване на относителни дялове*.**

5. ***Екзактен тест на Fisher и*** χ^2 – за проверка на хипотези за връзка между категорийни признаци.

6. ***Непараметричен тест на Колмогоров - Смирнов и Шапиро - Уилк*** – за проверка вида на разпределението.

7. Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA – за проверка на хипотези за влияние на категорийни фактори с повече от две нива.

8. ***Непараметричен тест на Крускал - Уолис*** – за търсене на сигнификантни различия между няколко независими извадки.

9. ***T - тест на Стюдънт*** – параметричен тест за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

10. ***Непараметричен тест на Ман - Уитни*** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

11. ***Корелационен анализ –*** за търсене на линейна зависимост между количествени променливи.

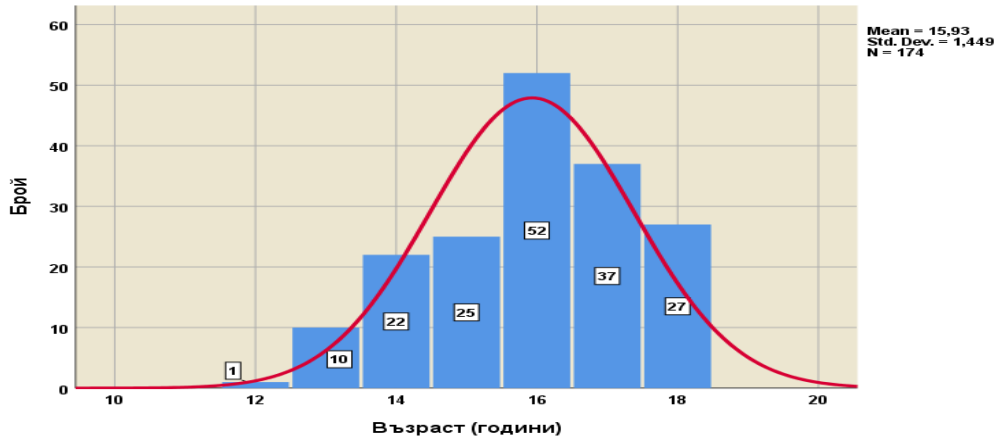
12. ***ROC curve*** – за определяне на прагови стойности при количествени променливи.

13. ***Критерии за валидизация на скрининг тестове*.**

IV. РЕЗУЛТАТИ

IV.1 ВЪЗРАСТОВА ХАРАКТЕРИСТИКА НА КОНТИНГЕНТА

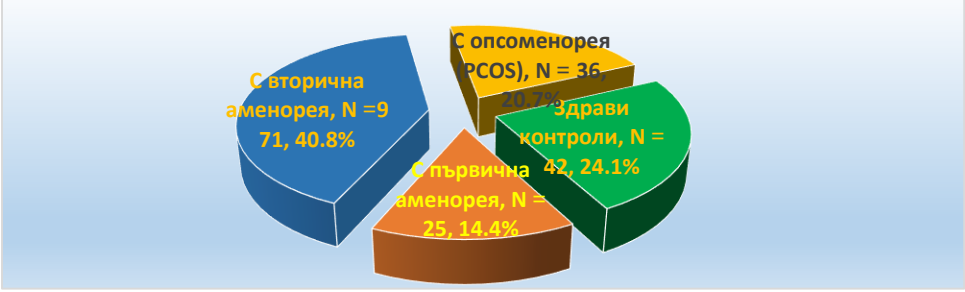
Изследваният клиничен контингент обхваща 174 момичета със средна възраст 15.93 ± 1.45 години в интервала между 12 и 18. Най-много (52) са участничките в проучването на възраст 16 години, следвани от тези на 17 (37), а най-малко (1) на 12 години (**фиг. 1**).



Фигура 1: Честотно разпределение на изследвания контингент по възраст

Участничките в проучването принадлежат към една от следните групи (**фиг. 2**):

- Здрави контроли – 42
- Момичета с първична аменорея – 25
- Момичета с вторична аменорея – 71
- Момичета с опсоменорея (PCOS) – 36



Фигура 2: Честотно разпределение на изследвания контингент по групи на изследване

На **табл. 1** се вижда, че четирите изследвани групи са статистически изравнени по известния замъгляващ фактор възраст, което осигурява коректност на последващите сравнения.

Таблица 1: Сравнителен анализ на четирите изследвани групи по възраст

* - еднаквите букви по вертикалите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Групи	Възраст		
	N	$\overline{X}$	SD
Контролна	42	15.69[a]	1.62
С първична аменорея	25	15.80[a]	0.76
С вторична аменорея	71	16.03[a]	1.54
С опсоменорея (PCOS)	36	16.11[a]	1.43

IV.2 MENARCHE

Средната възраст за menarche на цялата извадка е 12.38 ± 0.52 години в интервала между 11 и 13. От **табл. 2** става ясно, че контролната група има сигнификантно по-ниска средна възраст за menarche (12.19 години) спрямо групите с вторична аменорея и опсоменорея, които не се различават статистически помежду си по този показател.

Таблица 2: Сравнителен анализ на три от изследвани групи по menarche

* - еднаквите букви по вертикалите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Групи	Menarche		
	N	$\overline{X}$	SD
Контролна	42	12.19[a]	0.51
С вторична аменорея	71	12.42[b]	0.50
С опсоменорея (PCOS)	36	12.53[b]	0.51
Цяла извадка	149	12.38	0.52

Рано настъпило menarche се свързва с рано установяване на овулаторни цикли. Когато първата менструация настъпи по-рано от 12 години, 50 % от менструалните цикли са овулаторни през първата година след menarche. При късно настъпило menarche може да отнеме осем до дванайсет години, докато всички менструални цикли станат овулаторни. По-късно настъпила първа менструация и менструални нарушения говорят за нарушена функция на ХХЯ - ос и могат да бъдат важен рисков фактор за недостатъчно и неадекватно натрупване на костна маса.

IV.3 ГРУПИРАНЕ ПО ПРИЧИНИ ВОДЕЩИ ДО АМЕНОРЕЯ

От **табл. 3** става ясно, че:

Таблица 3: Честотно разпределение на причините за аменорея по групи.

* - сумата от процентите надхвърля 100, тъй като някои от момичетата са указали по повече от една причина

Причини	Момичета с първична аменорея		Момичета с вторична аменорея	
	N	%	N	%
Pubertas tarda (късен пубертет)	15	60		
Gonadal dysgenesis (гонадна дисгенезия)	10	40		
Алиментарен дефицит			48	67.6
Екстремни физически натоварвания (спорт)			16	22.5
Стрес			22	31

При момичетата с първична аменорея се установяват две от причините за това състояние - късен пубертет (при 60 % от тях) и гонадна дисгенезия (при 40 %).

При момичетата с вторична аменорея се наблюдават основно три причини - алиментарен дефицит (при 67.6 % от тях), следвани от стрес с 31 % и на последно място - екстремни физически натоварвания (22.5 %).

С уточнена причина за аменорея са общо 96 момичета, от които на възраст до 14 години – 13, а над 14 – 83. Сравнителният анализ на причините по възрастови групи показа, че **(табл. 4):**

Таблица 4: Сравнителен анализ на причините за аменорея по възрастови групи

* - сумата от процентите надхвърля 100, тъй като някои от момичетата са указали по повече от една причина

Група на изследване	**Причини**	**Възрастова група (години)**				**P**
		До 14		Над 14		
		N	%	N	%	
Момичета с първична аменорея	Pubertas tarda (късен пубертет)	0	0	15	18.1	0.208
	Gonadal dysgenesis (гонадна дисгенезия)	0	0	10	12	0.406
Момичета с вторична аменорея	Алиментарен дефицит	6	46.2	42	50.6	0.997
	Екстремни физически натоварвания (спорт)	4	30.8	12	14.5	0.287
	Стрес	6	46.2	16	19.3	0.073

Две от причините водещи до аменорея - късен пубертет и гонадна дисгенезия са изцяло в групата на по-възрастните момичета (над 14 години), поради факта, че по презумпция за първична аменореа може да се говори при липса на първа менструация при навършени 15 години и обикновено първия преглед - консултация се извършва след навършването им.

Останалите три причини се разпределят както следва - с по-висок относителен дял при по-възрастните - алиментарен дефицит, а с по-нисък -

екстремни физически натоварвания (спорт) и стрес, като разликата има гранична сигнификантност (p = 0.073) единствено при стреса.

PCOS се наблюдава единствено в групата с вторична аменорея. Преобладава при по-възрастните - 75 % спрямо по-младите (до 14 години) с 25 %.

В групата на пациентките с вторична аменорея средната продължителност на аменореята преди пациентката да потърси лекарска помощ е 12.63 ± 7.42 месеца в интервала между 3 и 24 месеца.

IV.4 ИНДЕКС НА ТЕЛЕСНАТА МАСА - ИТМ (BMI)

При извършения анализ по отношение на ИТМ при изследваните групи стана ясно, че: (**Таблица 5**)

Таблица 5: Честотно разпределение на участничките в проучването по ИТМ и група на изследване.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (p < 0.05)

ИТМ	**Статис-тика**	**Групи**				**Общо**
		Контроли	Първична аменорея	Вторична аменорея	Опсо-менорея	
Поднормен	N	1	8	21	1	31
	%	2.4[a]	32[b]	29.6[b]	2.8[a]	17.8
Нормален	N	36	15	49	18	118
	%	85.7[a]	60[bc]	69[ac]	50[bc]	67.8
Наднормен	N	4	2	1	14	21
	%	9.5[a]	8[a]	1.4[a]	38.9[b]	12.1
Затлъстяване	N	1	0	0	3	4
	%	2.4[a]	0[a]	0[a]	8.3[a]	2.3
Общо	N	42	25	71	36	174
	%	100	100	100	100	100

Най-малко отклонения спрямо нормалните стойности има при контролите 14.3 %, от които 2.4 % поднормни, 9.5 % - наднормни и в 2.4 % със затлъстяване.

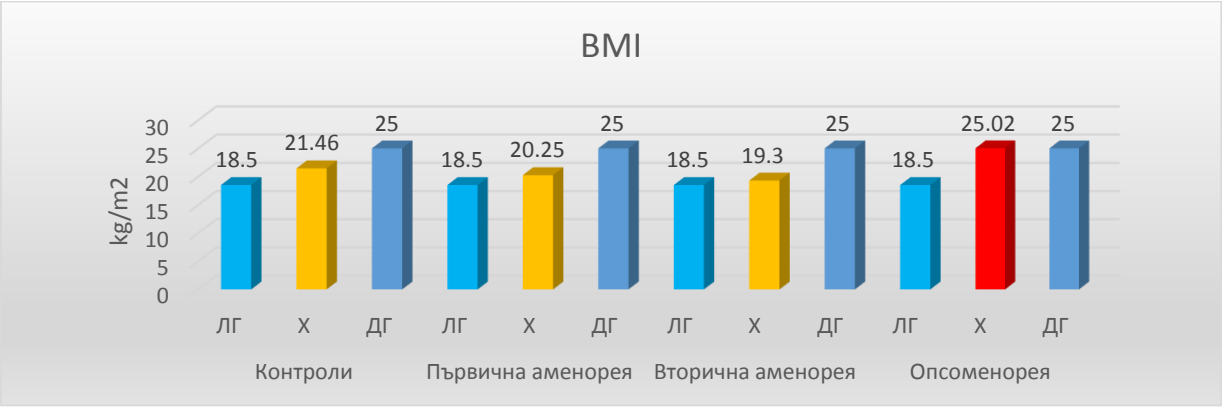
Най-висок процент абнормни стойности има в групата с опсоменорея (50 %) - 2.8 % поднормен и 47.2 % - наднормен (38.9 %) и затлъстяване (8.3 %), като статистически значима разлика се установи по отношение на наднормните стойности на ИТМ спрямо контролите.

В групата с първична аменорея се установи значимо по-висок процент на поднормни тойности (32 %) на ИТМ спрямо контролната група.

При пациентките с вторична аменорея (при 31 % от момичетата) се установи статистически значимо по-висок процент на поднормни стойности на ИТМ в сравнение с контролната група.

Заслужава да се отбележи, че групите с аменорея имат сигнификантно по-висок процент поднормени стойности на ИТМ спрямо контролите и групата с опсоменорея, която пък от своя страна е със статистически достоверно по-висок относителен дял на наднормените стойности спрямо контролната и останалите групи.

При оценка средните стойности на ИТМ прави впечатление, че пациентките с опсоменорея са със статистически значимо по-високи (25.02 kg/m^2) средни стойности в сравнение с контролната и другите две групи, които от своя страна не се различават статистически помежду си (**Фигура 3**).



Фигура 3: Референтни и средни стойности на BMI (ИТМ) по групи на изследване. ЛГ – долна референтна граница, Х - средна стойност, ДГ- горна референтна граница

IV.5 КЛИНИКОЛАБОРАТОРНИ ПАРАМЕТРИ

При всяка от основните изследваните групи беше направена оценка на основните клиниколабораторни показатели – LH, FSH, Estradiol, AMH, Prolactin, Osteocalcin, β – CrossLaps, Ca и P, и наличието на отклонени от приетите референтни стойности за всеки един от показателите **(Таблица 6).**

Таблица 6: Сравнителен анализ на четирите групи на изследване по процент на абнормните стойности

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Показатели	Контроли		Първична аменорея		Вторична аменорея		Опсоменорея		**Общо**	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
LH	4	9.5^{a}	10	40^{bc}	41	57.7^{b}	7	19.4^{ac}	62	35.6
FSH	1	2.4^{a}	10	40^{b}	10	14.1^{a}	5	13.9^{a}	26	14.9
Estradiol	13	31.7^{a}	12	48^{a}	9	12.7^{b}	4	11.1^{b}	38	22
Prolactine	0	0^{a}	0	0^{a}	1	1.4^{a}	3	8.3^{a}	4	2.3
Calcium	1	2.4^{a}	5	20^{bc}	5	7^{ac}	3	8.3^{a}	14	8
BMI	6	14.3^{a}	10	40^{bc}	22	31^{ac}	18	50^{bc}	56	32.2
AMH	11	26.2^{a}	10	40^{ac}	15	21.1^{a}	24	66.7^{bc}	60	34.5
Phosphate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Osteocalcin	0	0^{a}	1	4^{a}	8	11.3^{a}	2	5.6^{a}	11	6.3
β–CrossLaps	12	19.4^{a}	5	20^{a}	23	32.4^{a}	7	28.6^{a}	47	27

По отношение на **LH** най-нисък процент на абнормни стойности имаха здравите контроли (9.5 % от момичетата бяха със стойности под долна референтна граница). Установи се статистически значима разлика между контролната и изследваните групи, както следва: най-висок процент абнормни стойности имаше при пациентките с вторична аменорея (46.5 % - под долна референтна граница и 11.2 % - над горна референтна граница),

следвани от тези с първична аменорея (подгрупата с гонадна дисгенезия, 40 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница) и опсоменорея (19.4 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница).

При **FSH** статистически значима разлика имаше между момичетата с първична аменорея (40 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница) и контролната, както и с останалите две групи, които, от своя страна, не се различаваха статистически значимо помежду си – контролна група (2.4 % - под долна референтна граница), вторична аменорея (14.1 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница) и опсоменорея (13.9 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница).

По отношение на **Estradiol (E_2)** при 31.7 % от момичетата от контролната група се установиха стойности на E_2 над горната граница на нормата, а при момичетата с първична аменорея, при 48 % от тях - долно и под долногранични стойности на E_2. При момичетата е вторична аменорея (14.1 % долно и поддолногранични стойности) и опсоменорея (11.1 % на долна референтна граница) се откри статистически значим по-нисък процент на абнормни стойности в сравнение с контролите.

При оценка абнормните стойности на **Prolactin** не се откри значима разлика между четирите групи, но в две от групите стойностите бяха горногранични – при пациентките с опсоменорея в 8.3 % и при 1.4 % от пациентките с вторична аменорея (стрес индуцирана аменорея).

При **Calcium (Ca)** статистически значимо най - висок процент на абнормни стойности се откри при пациентките с първична аменорея (20 % от пациентките се откриха поднормни стойности), спрямо контролната група. При пациентките с опсоменорея (8.3 % горногранични стойности) и тези вторична аменорея (7 % долногранични стойности) не беше установена

значима разлика в сравнение с контролната група. (2.4 % - стойности над горна референтна граница N = 2).

При оценка на **Phosphorus (P)** не се откриха абнормни стойности в изследваните групи.

По отношение на **AMH** при пациентките с опсоменорея (66.7 % от момичетата бяха със стойности на и над горна референтна граница) се установиха сигнификантно по-висок процент горно и надгорногранични стойности в сравнение с контролната група (26.2 % от момичетата бяха със стойности над горна референтна граница).

Пациентките с първична аменорея (40 % от пациентките бяха със стойности на и под долна референтна граница) бяха със значимо по - висок процент долно и поддолно гранични стойности в сравнение с контролите.

Между пациентките с вторична аменорея и контролната група не се откри значима разлика.

При оценка на **маркера за костно формиране Osteocalcin** не се откриха абнормни стойности в контролната група, докато в останалите групи те бяха както следва: при пациентките с първична аменорея (4 % от бяха със стойности под долна референтна граница), при тези с вторична аменорея (11.3 % бяха със стойности под долна референтна граница) и при момичетата с опсоменорея (5.6 % бяха със стойности под долната референтна граница). Не се установи сигнификантна разлика между изследваните групи и контролите.

При маркера за **костно разграждане - β – CrossLaps** – 32.4 % от пациентките с вторична аменорея бяха със стойности над горната референтна граница, от тези с опсоменорея – 19.4 % също над горната референтна граница, а при здравите момичета от контролната група установихме 10.6 % със стойности над горна граница и 8 % - под долна референтна граница. При момичетата с първична аменорея 20 % бяха със

стойности над горна референтна граница. Не се установи сигнификантна разлика между изследваните групи и контролите.

IV.6 УЛТРАЗВУКОВА ОЦЕНКА

Анализът на случаи с хипоплазия на матката (ПЗД < 2 см) показа, че единствено в групата с първична аменорея съществуват ултразвукови данни за наличие такава, което съответства на хипергонадотропния хипогонадизъм наблюдаван при пациентките с гонадна дисгенезия (подгрупа на първичната аменорея) (**табл. 7**).

Таблица 7: Честотно разпределение на участничките в проучването по процент с хипоплазия на матката (ПЗД < 2 см) и група на изследване.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Хипоплазия на матката	**Статис-тика**	**Групи**				**Общо**
		Контроли	Първична аменорея	Вторична аменорея	Опсо-менорея	
Не	N	42	19	71	36	168
	%	100	76	100	100	96.6
Да	N	0	6	0	0	6
	%	0[a]	24[a]	0[a]	0[a]	3.4
Общо	N	42	25	71	36	174
	%	100	100	100	100	100

Най-висок процент на ехографски оценена липса на фоликули има при пациентките с първична аменорея (при 52 % от момичетата не се визуализират ехографски фоликули) и вторична аменорея (40.8 %), като между тех няма статистически значима разлика. В другите две групи липсват пациентки, при които не се визуализират фоликули (**Таблица 8**).

Таблица 8: Честотно разпределение на участничките в проучването по процент от пациентките, при които не се визуализират ехографски фоликули и група на изследване

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Фоликули	**Статис-тика**	**Групи**				**Общо**
		Контроли	Първична аменорея	Вторична аменорея	Опсо-менорея	
Не се визуализират	N	0	13	29	0	42
	%	0^{a}	52^{b}	40.8^{b}	0^{a}	24.1
Се визуализират	N	42	12	42	36	132
	%	100	48	59.2	100	75.9
Общо	N	42	25	71	36	174
	%	100	100	100	100	100

IV.7 СТАДИИ НА ПЪБЕРТЕТНО РАЗВИТИЕ ПО TANNER

От показаните резултати на **табл. 9** става ясно, че:

Таблица 9: Честотно разпределение на участничките в проучването по пубертетно развитие по Tanner и група на изследване.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Пубертетно развитие по Tanner	Статистика	Групи				Общо
		Контроли	Първична аменорея	Вторична аменорея	Опсоменорея	
0 - II степен	N	0	10	0	0	10
	%	0[a]	40[b]	0[a]	0[a]	5.7
III степен	N	2	9	21	9	41
	%	4.8[a]	36[b]	29.6[b]	25[b]	23.6
III - IV степен	N	13	6	26	11	56
	%	31[a]	24[a]	36.6[a]	30.6[a]	32.2
IV степен	N	27	0	24	16	67
	%	64.3[a]	0[b]	33.8[cd]	44.4[ad]	38.5
Общо	N	42	25	71	36	174
	%	100	100	100	100	100

Четирите изследвани групи се различаваха сигнификантно по три от степените на пубертетно развитие по Tanner. 0 - II степен се наблюдаваше единствено в групата с първична аменорея (40 % - подгрупата с гонадна дисгенезия), като процентът й е значимо по-висок от този на останалите три групи, които не се различаваха статистически помежду си. III степен се срещаше статистически достоверно по-малко при контролите (4.8 %) спрямо останалите три групи – пациентки с първична аменорея (36 % - подгрупа с конституционално обусловен късен пубертет), с вторична аменорея (29.6 %) и тези с опсоменорея (25 %). IV степен е със сигнификантно по-висок процент при контролите (64.3 %) спрямо групите с аменорея, но не и спрямо този на имащите опсоменорея (44.4 %), който от

своя страна е значимо по-висок от този на групата с първична аменорея (0 %), но не и от този на имащите вторична аменорея (33.8 %). Със статистически достоверно най-нисък относителен дял на IV степен спрямо всички останали групи беше групата с първична аменорея.

Оценката на серумните нива на маркерите за костен метаболизъм в зависимост от степента на пубертетно развитие са представени на **табл. 10**, където става ясно, че:

Таблица 10: Сравнителен анализ на изследваните групи по показателите Osteocalcin и β – CrossLaps в изследваните групи според стадия по Tanner.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – на наличие на такава ($p < 0.05$)

Групи	**Показа-тели**	**Tanner stage**											
		0 - II степен			III степен			III – IV степен			IV степен		
		N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD
Здрави контроли	Osteocalcin	0	-	-	2	67.92	21.21	13	41.57[a]	22.67	27	36.19[a]	18.55
	β – CrossLaps	0	-	-	2	1.13	0.15	13	1.10[a]	0.32	27	0.99[a]	0.45
Момичета с първична аменорея	Osteocalcin	10	20.2[a]	9,86	9	46.2[b]	10.73	6	46.01	10.23	0	-	-
	β – CrossLaps	10	1.17[a]	0,66	9	1.27[a]	0.42	6	0.97	0.11	0	-	-
Момичета с вторична аменорея	Osteocalcin	0	-	-	21	28.91[a]	15.03	26	31.43[a]	15.92	24	30.87[a]	21.65
	β – CrossLaps	0	-	-	21	0.94[a]	0.36	26	0.99[a]	0.37	24	0.91[a]	0.32
Момичета с опсоменорея	Osteocalcin	0	-	-	9	26.52[a]	9.03	11	23.59[a]	10.04	16	22.5[a]	8.06
	β – CrossLaps	0	-	-	9	1.04[a]	0.27	11	0.95[a]	0.35	16	0.88[a]	0.24

В групата на здравите контроли статистическа представителност имат момичетата с III-IV и IV степен по Tanner, но сигнификантна разлика между тях по разглежданите показатели (Osteocalcin и β – CrossLaps) не се установява.

При момичетата с първична аменорея статистическа представителност имат момичетата с 0 - II и III степен по Tanner, но

сигнификантна разлика между тях имаше само по показателя Osteocalcin – значимо по-висока средна стойност се установи при имащите III степен, като това е за сметка на подгрупата с конституционално обусловен късен пубертет.

В групата на момичетата с вторична аменорея и опсоменорея статистическа представителност имат момичетата с III, III - IV и IV степен по Tanner, но сигнификантна разлика между тях по разглежданите показатели не се установи.

Корелационният анализ между LH, FSH, Estradiol и степен на пубертетното развитие поTanner е представен на в **таблица 11:**

Таблица 11: Сравнителен анализ на показателите LH, FSH, Estradiol според Tanner stage (цяла извадка).

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – на наличие на такава ($p < 0.05$)

Показа-тели	Tanner stage											
	0 - II степен			III степен			III – IV степен			IV степен		
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD
LH	10	30.23^{a}	10.15	41	4.57^{b}	3.28	56	4.81^{b}	3.01	67	5.8^{b}	4.71
FSH	10	49.57^{a}	20.55	41	6.03^{bd}	2.86	56	5.19^{cd}	2.58	67	6.84^{b}	3.77
Estradiol	10	53.70^{a}	21.59	41	372.61^{b}	168.46	56	317.95^{b}	151.71	66	394.56^{b}	247.75

Установи се, че показателят **LH** има сигнификантно по-висока средна стойност в групата на момичетата с 0 - II степен от подгрупа гонадна дисгенезия (30.23 UI/L) по Tanner спрямо останалите участнички в проучването с по-високи степени, чиито средни стойности не се различаваха статистически.

При **FSH** се установиха статистически достоверно по-висока средна стойност в групата на момичетата с 0 - II степен от подгрупа гонадна дисгенезия (49.57 UI/L) по Tanner спрямо останалите участнички в проучването. Момичетата с III – IV степен (5.19 UI/L), IV степен (6.84 UI/L)

и тази с III степен (6.03 UI/L) на пубертетно развитие бяха със статистически еднакви средни стойности на FSH.

При пациентките с 0 - II степен (подгрупа гонадна дисгенезия) на пубертетно развитие се наблюдаваха и най-ниски стойности на маркера за костно формиране – **Osteocalcin.**

Показателят **Estradiol** имаше сигнификантно по-ниска средна стойност в групата на момичетата с 0 - II степен (53.70 pmol/L) по Tanner спрямо останалите участнички в проучването с по-високи степени, чиито средни стойности не се различават статистически.

От направеният анализ в **таблици 15 и 16** може да се заключи, че при пациентките с пубертетно развитие 0 - II степен по Tanner (пациентките от подгрупа гонадна дизгенезия) се наблюдава хипергонадотропен хипогонадизъм и като резултат - подтиснат костен метаболизъм с ниски серумни нива на маркера за костно формиране - Osteocalcin.

IV.8 СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ В РАЗГЛЕЖДАНИТЕ ГРУПИ ПРИ УЧАСТНИЧКИ ДО И НА 14 ГОДИШНА ВЪЗРАСТ

Идеята за възрастово разделяне на участничките на групи „до и на 14 години“ и „над 14 години“ идва от факта, че при здрави момичета до 14 годишна възраст обичайно се наблюдава усилен костен метаболизъм, след което настъпва фаза на известно стабилизиране или т. нар. плато в стойностите на маркерите за костно формиране и разграждане (Osteocalcin и β – CrossLaps).

Сравнителният анализ на изследваните групи по показателите LH, FSH, Estradiol, Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score (**възраст до 14 години**) показа (**табл. 12**):

Таблица 12: Сравнителен анализ на изследваните групи по показателите LH, FSH, Estradiol, Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score (**възраст до 14 години)**.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – на наличие на такава ($p < 0.05$)

Показатели	Здрави контроли			Момичета с вторична аменорея			Момичета с опсоменорея		
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD
LH	11	3.64^{a}	1.77	13	5.04^{ac}	4.06	9	7.17^{bc}	1.45
FSH	11	3.64^{a}	1.36	13	8.73^{b}	6.95	9	5.77^{b}	1.62
Estradiol	11	414.73^{a}	142.85	13	375.08^{b}	293.76	9	330.33^{c}	100.47
Osteocalcin	11	62.97^{a}	17.63	13	48.72^{ac}	28.19	9	30.98^{bc}	10.92
β – CrossLaps	11	1.18^{a}	0.17	13	0.95^{a}	0.41	9	1.07^{a}	0.21
Z – score	8	0.3^{a}	0.85	9	-0.47^{a}	0.9	6	0.55	0.73

При **LH** сигнификантно по-висока средна стойност се установява в групата с опсоменорея (7.17 UI/L) спрямо контролите (3.64 UI/L), но не и спрямо имащите вторична аменорея (5.04 UI/L), чиято средна не се различава статистически от тези на останалите представителни групи.

Стойностите на **FSH** са статистически достоверно по-високи при патологичните групи в сравнение с контролната (3.24 UI/L), като помежду им не се установява статистически значима разлика.

Стойностите на **Estradiol** са значимо по-ниски в двете патологични групи в сравнение с контролната група.

При **Osteocalcin** се установяват сигнификантно по-ниски средни стойности в групите на момичетата с опсоменорея (30.98 ng/mL) и имащите вторична аменорея (48.72 ng/mL) спрямо тази на контролите (62.97 ng/mL).

При **β – CrossLaps**, както и в оценката на **Z – score** не се открива сигнификантна разлика между контролната и другите две групи.

От направения анализ може да се заключи, че във възрастовата група „до и на 14 години“ при пациентките от двете патологични групи се наблюдават значимо по-ниски серумни нива на Estradiol и маркера за костно формиране Osteocalcin, което показва подтисната остеобластна активност при тези пациентки.

IV.9 СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ В РАЗГЛЕЖДАНИТЕ ГРУПИ ПРИ УЧАСТНИЧКИ НАД 14 ГОДИШНА ВЪЗРАСТ

Анализът на показателите LH, FSH, Estradiol, Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score при момичетата **над 14 години** показа (**табл. 13**):

Таблица 13: Сравнителен анализ на изследваните групи по показателите LH, FSH, Estradiol, Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score (**възраст над 14 години**).

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – на наличие на такава ($p < 0.05$)

Показатели	Здрави контроли			Момичета с първична аменорея			Момичета с вторична аменорея			Момичета с опсоменорея		
	N	$\overline{X}$	**SD**	**N**	$\overline{X}$	**SD**	**N**	$\overline{X}$	**SD**	**N**	$\overline{X}$	**SD**
LH	31	5.37^{a}	1.64	25	14.42^{ad}	14.61	58	3.33^{b}	4.37	27	9.55^{cd}	2.77
FSH	31	5.79^{a}	1.77	25	22.24^{a}	26.06	58	6.23^{a}	3.06	27	7.02^{a}	2.54
Estradiol	30	455.37^{a}	227.6	25	252.64^{b}	230.39	58	299.91^{bc}	178.83	27	365.81^{ac}	173.6
Osteocalcin	31	30.99^{ad}	14.27	25	35.76^{a}	16.27	58	26.41^{cd}	10.99	27	21.46^{b}	6.69
B-CrossLaps	31	0.98^{ac}	0.45	25	1.16^{a}	0.48	58	0.95^{bc}	0.34	27	0.9^{bc}	0.29
Z – score	12	0.63^{a}	0.68	15	-0.85^{b}	1.24	21	-0.42^{bc}	1.3	12	0.3^{ac}	1.1

При **FSH** не се наблюдаваха статистически достоверна разлика при изследваните групи.

При **LH** сигнификантно по-висока средна стойност се установи в групата на момичетата с първична аменорея (14.42 UI/L) и тези с

опсоменорея (9.55 UI/L) спрямо контролите (5.37 UI/L). В групата на имащите вторична аменорея (3.33 UI/L) средната стойност на LH беше статистически значимо по-ниска в сравнение с контролната група. Сигнификантно най-висока средна стойност се наблюдаваше при пациентките с гонадна дисгенедзия, който са подгрупа на момичетата с първична аменорея.

И в трите групи аменорея се откриха статистически значимо по – ниски стойности на **Estradiol** (първична аменорея – 252.64 pmol/L, вторична аменорея – 299.91 pmol/L и опсоменореята – 365.81 pmol/L) в сравнение с контролите (455.37 pmol/L).

При **Z – score** средните стойности на двете групи с аменорея – първична (- 0.85) и вторична аменорея (- 0.42) бяха значимо по-ниски от контролите (0.63). Момичетата с опсоменорея (0.30) не се различаваха сигнификантно от контролната група.

При **Osteocalcin** сигнификантно по-висока средна стойност се установи в групата на имащите първична аменорея (35.76 ng/ml), което е резултат на високите му стойности при пациентките с късен пубертет (46.13 ng/ml), докато в другата подгрупа на първична аменорея – пациентките с гонадна дисгенезия (20.2 ng/ml) стойностите на този показател бяха значимо по-ниски спрямо контролите (30.99 ng/ml). В групата на пациентките с опсоменорея (21.46 ng/ml) и на тези с вторична аменорея (26.41 ng/ml) също се наблюдаваха статистически значимо по-ниски стойности в сравнение с контролите.

При **β – CrossLaps** сигнификантно разлика между контролната група (0.98 ng/ml) и останалите групи не се откри. По-висока средна стойност се установи в групата на имащите първична аменорея (1.16 ng/ml) спрямо тази на момичетата с вторична аменорея (0.95 ng/ml) и опсоменорея – 0.91 ng/ml (чиито средни не се различават статистически).

От направения анализ прави впечатление, че във възрастта след 14 години при патологичните групи имаше значимо по-ниски серумни нива на **Estradiol, Osteocalcin** (с изключение на пациентките с късен пубертет) и Z – score в сравнение с контролната група, което показва подтиснат костен метаболизъм и риск от непълноценно натрупване на костна маса и не достигане на ПКМ.

IV.10 ВЪТРЕГРУПОВО СРАВНЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Такова сравнение се направи с цел, да бъде оценено влиянието на различните причини водещи до проява на аменорея върху хормоналния статус и костния метаболизъм.

При извършения сравнителен анализ между контролната група и всяка една формирана подгрупа стана ясно, че:

Момичетата с диагноза „**Pubertas tarda**“ се различават сигнификантно с по-ниски нива на гонадотропните хормони (LH – p = 0.009 и FSH – p = 0.042) и Z - score - p = 0.006) спрямо здравите контроли, което е резултат от по-късния растежен скок, който се наблюдава при пациентки с това състояние (**Таблица 14**).

Таблица 14: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с **Pubertas tarda** по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	**Контроли**			**Pubertas tarda**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	15	46.13	10.16	0.069
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	15	1.15	0.36	0.224
Z-score	20	0.5	0.75	12	-0.48	1.1	0.006
LH	42	4.92	1.83	15	3.87	1.34	0.009
FSH	42	5.23	1.91	15	4.03	1.94	0.042
Estradiol	41	444.46	207.31	15	385.27	208.75	0.349
AMH	42	5.68	3.25	15	4.7	1.70	0.457

Момичетата с диагноза „**Gonadal dysgenesis**“ са със статистически значимо по-ниски серумни нива на гонадотропните хормони (LH – $p < 0.001$ и FSH – $p < 0.001$), серумните нива на Estradiol ($p < 0.001$) и AMH ($p < 0.001$), както и в нивата на Osteocalcin ($p = 0.002$) спрямо контролната група. Тази група се разграничава от другите с превалиране на патологични стойности на Z - score ≤ - 2 SD и може да се направи извод, че при тези пациентки има категорични доказателства за нарушеване в натрупването на костна маса като последица от хипогонадотропния хипогонадизъм характерен за това състояние.

Ниските серумни нива на маркера за костно формиране (**Osteocalcin**) сочат подтисната остеобластна активност и дисбаланс в костното ремоделиране (**Таблица 15**).

Таблица 15: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с **Gonadal dysgenesis** по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	**Контроли**			**Gonadal dysgenesis**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	10	20.2	9.86	0.002
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	10	1.17	0.66	0.88
Z-score	20	0.5	0.75	3	-2.33	0.21	-
LH	42	4.92	1.83	10	30.23	10.15	<0.001
FSH	42	5.23	1.91	10	49.57	20.55	<0.001
Estradiol	41	444.46	207.31	10	53.7	21.59	<0.001
AMH	42	5.68	3.25	10	0.3	0.34	<0.001

Таблица 16: Сравнителен анализ на показателите LH, FSH и Estradiol по фоликули при момичетата с първична аменорея

Показатели	Фоликули						P
	Не се визуализират ехографски			Налични			
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
LH	13	24.05	14.67	12	3.98	1.37	<0.001
FSH	13	39.55	26.07	12	3.49	1.52	<0.001
Estradiol	13	198.08	280.64	12	311.75	150.21	0.019

Момичетата с първична аменорея (подгрупа – гонадна дисгенезия N = 10 и при част от момичетата с късен пубертет N = 3), при които фоликулите не се визуализират ехографски са със значимо по-високи средни стойности на LH и FSH (24.05 и 39.55 UI/L) и статистически достоверно по-ниска средна аритметична на Estradiol (198.08 pmol/L).

На табл. 17 се вижда, че:

Таблица 17: Сравнителен анализ на показателите LH, FSH и Estradiol взависимост от пубертетното развитие по Tanner при момичетата с първична аменорея.

* - еднаквите букви по хоризонталите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0.05$)

Показатели	Пубертетно развитие по Tanner								
	0 - I степен			II - III степен			III - IV степен		
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD
LH	10	30.23^{a}	10.15	9	3.22^{b}	1	6	4.85	1.23
FSH	10	49.57^{a}	20.55	9	4.26^{b}	2.17	6	3.68	1.67
Estradiol	10	53.7^{a}	21.59	9	399.22^{b}	264.81	6	364.33	94.56

Момичетата с първична аменорея и 0 - I степен степен на пубертетно развитие по Tanner (подгрупа гонадна дисгенезия) са със значимо по-високи средни стойности на LH и FSH (30.23 UI/L и 49.57 UI/L) спрямо имащите II - III степен (3.22 UI/L и 4.26 UI/L) и III - IV степен (4.85 UI/L 3.68 UI/L) на

момичетата с късен пубертет, и статистически достоверно по-ниска средна аритметична стойност на Estradiol (53.7 pmol/L в сравнвние с 399.22 pmol/L и 364.33 pmol/L).

В групата на пациентки с вторична аменорея вследствие на **алиментарен дефицит** се открива статистически значимо по-ниски серумни нивата на гонадотропните хормони (LH – p = 0.008 и FSH – < 0.001), Estradiol (p = 0.026), както и в нивата на Osteocalcin (p = 0.035) и Z - score (p = 0.002) в сравнение с контролната група. Тези резултати показват подтиснат костен метаболизъм и в частност костно формиране (**Таблица 18**).

Таблица 18: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с **Алиментарен дефицит** по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	**Контроли**			**Алиментарен дефицит**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	34	31.23	20.08	0.035
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	34	0.95	0.43	0.16
Z –score	20	0.5	0.75	17	-0.64	1.28	0.002
LH	42	4.92	1.83	34	4.68	5.65	0.008
FSH	42	5.23	1.91	34	7.58	2.87	<0.001
Estradiol	41	444.46	207.31	34	364.68	246.68	0.026
AMH	42	5.68	3.25	34	5.74	3.73	0.95

При пациентките с вторична аменорея вследствие **екстремно физическо натоварване/спорт** се откри статистически значимо по-ниски серумни нива на LH – p = 0.041, Estradiol – p = 0.003 и AMH – p = 0.026 в сравнение с контролната група. В тази група пациентки са включени момичета, които не се занимават професионално със спорт. Трябва да се отбележи също, че при тях стойностите на ИТМ/BMI са в референтни граници, което може да се тълкува с липса на хранителни разстройства и

елиминиране на адювантния им ефект върху костния метаболизъм (**Таблица 19**).

Таблица 19: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с **Екстремни физически натоварвания (спорт)** по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	**Контроли**			**Екстремни физически натоварвания (спорт)**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	11	40.9	16.88	0.411
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	11	0.94	0.3	0.546
Z-score	20	0.5	0.75	2	0.1	0.71	-
LH	42	4.92	1.83	11	3.74	1.36	0.041
FSH	42	5.23	1.91	11	6.45	2.37	0.08
Estradiol	41	444.46	207.31	11	323.91	70.9	0.003
AMH	42	5.68	3.25	11	3.85	1.14	0.026

При пациентките с вторична аменорея вследствие „**стрес**“ се откри стистически значимо по-ниски серумни нива на LH – $p < 0.001$ и Estradiol – $p = 0.001$ в сравнение с контролната група (**Таблица 20**).

Таблица 20: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с причина **стрес** по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	**Контроли**			**Стрес**			**P**
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	11	28.59	16.15	0.1
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	11	0.9	0.35	0.263
Z-score	20	0.5	0.75	6	0.1	1.07	-
LH	42	4.92	1.83	11	1.65	1.9	<0.001
FSH	42	5.23	1.91	11	7.16	8.01	0.645
Estradiol	41	444.46	207.31	11	213.45	132.81	0.001
AMH	42	5.68	3.25	11	6.49	3.18	0.392

Проведеният корелационен анализ между показателите Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score с продължителността на аменореята в групата на момичетата с вторична аменорея показа наличие на слаба, обротнопропорционална корелация единствено между Osteocalcin и продължителността на аменореята, т.е колкото по-дълъг е периодът на аменорея, толкова повече се задълбочава супресията върху остеобластите и се нарушава ритъма на костния метаболизъм. (табл. 21). Средната продължителност на аменорея при тези пациентки беше изчислена – 12.63 ± 7.42 месеца (интервал между 3 и 24 месеца преди да потърсят лекарска помощ).

Таблица 21: Корелационни коефициенти между показателите Osteocalcin, β – CrossLaps и Z – score с продължителността на аменореята (група вторична аменорея) * - $p < 0.05$

Показатели	**Продължителност на аменореята**
Osteocalcin	-0.241*
β – CrossLaps	-0.023
Z – score	-0.172

В групата с **опсоменорея/PCOS** имаше статистически значима по-високи серумни нива на гонадотропните хормони (LH – $p < 0.001$ и FSH – $p = 0.017$), AMH ($p < 0.001$), спрямо контролите, докато нивата на Estradiol ($p = 0.043$) и Osteocalcin ($p < 0.001$) бяха статистически значимо по-ниски при тези пациентки в сравнение с контролната група (**Таблица 22**).

Таблица 22: Сравнителен анализ на контролите и пациентите с PCOS по показателите Osteocalcin, β – CrossLaps, Z - score, LH, FSH, Estradiol и AMH

Показатели	Контроли			PCOS			P
	N	$\overline{X}$	SD	N	$\overline{X}$	SD	
Osteocalcin	42	39.36	20.68	36	23.84	8.83	<0.001
β – CrossLaps	42	1.03	0.4	36	0.94	0.28	0.44
Z-score	20	0.5	0.75	18	0.38	0.97	0.965
LH	42	4.92	1.83	36	8.96	2.7	<0.001
FSH	42	5.23	1.91	36	6.71	2.39	0.017
Estradiol	41	444.46	207.31	36	356.94	157.91	0.043
AMH	42	5.68	3.25	36	10.11	2.67	<0.001

Трябва да се отбележи, че при всички изследвани групи нивата на **Osteocalcin** бяха по-ниски в сравнение с контролната група, дори и при пациентките с вторична аменорея с водеща причина стрес и екстремно физическо натоварване/спорт.

IV.11 ДИАГНОСТИЧНА НАДЕЖДНОСТ НА AMH

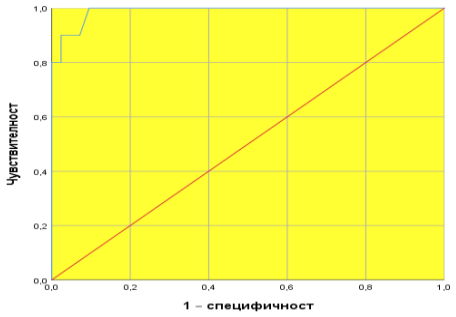
Прагови стойности на AMH и стойности на критериите за валидизация при отграничаването на контролната група от шестте подгрупи.

За да се определят праговите стойности на AMH бе приложен ROC curve анализ.

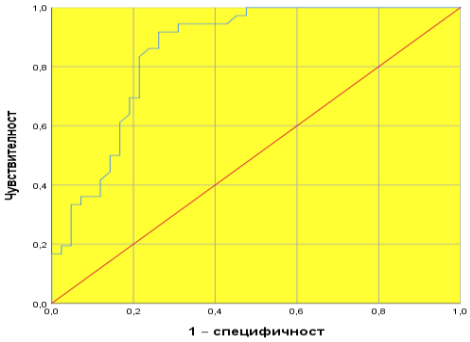
Получените резултати (**фиг. 4 и 5**) показват, че статистически значими прагови стойности могат да бъдат установени за две от причините: Gonadal dysgenesis и PCOS.

При избора на прагова величина критериите за оптимизация бяха висока чувствителност и прецизност. Според получените стойности на критериите за валидизация (**табл. 23**):

Показателят **AMH** е най-добър за отграничаване на имащите **Gonadal dysgenesis** от здравите индивиди **(чувствителност 100 %, прецизност 92 %).**



Фигура 4: ROC крива на AMH за определяне праговата му стойност при отграничаването на имащите Gonadal dysgenesis от контролите (площ под кривата 0.989, $p < 0.001$)



Фигура 5: ROC крива на AMH за определяне праговата му стойност при отграничаването на имащите PCOS от контролите (площ под кривата 0.854, $p < 0.001$)

Причина	Прагова величина	Чувстви-телност	Специ-фичност	Положителна предиктивна стойност	Отрицателна предиктивна стойност	% верни отговори
Gonadal dysgenesis	≤ 1.32	100	90	71	100	92
PCOS	≥ 5.95	94	69	72	94	81

Таблица 23: Прагови величини на AMH за ограничаване на контролите от имащите Gonadal dysgenesis и PCOS, и стойности на критериите за валидизация на скрининг тестове

От извършения анализ става ясно, че **AMH** може да бъде използван като сурогатен маркер при поставяне на диагноза при две от състоянията свързани с хипоменструални нарушения - Gonadal dysgenesis и PCOS. Прави впечатление високата чувствителност (100 %) и специфичност (90 %) на маркера по отношение на диагностициране на гонадна дисгенезия при прагова величина (cut - off) ≤ 1.32 ng/ml, което означава, че при стойности под тези вероятността да има такова заболяване е висока (площ под кривата 0.989, $p < 0.001$).

При пациентките с PCOS се откри чувствителност – 94 % и специфичност – 69 %, при прагова величина (cut - off) ≥ 5.95 ng/ml (площ под кривата 0.854, $p < 0.001$), което показва реалната възможност AMH да бъде използван като сурогатен маркер в диагностичния процес.

IV.12 ОЦЕНКА СЕРУМНИТЕ НИВА НА ВИТАМИН D В ИЗСЛЕДВАНИТЕ ГРУПИ

Проведеният сравнителен анализ на процента на недостатъчност на Vit. D (стойности на вит. D под 30 ng/ml) в различните групи и общо в изследваната популация показа че (**табл. 24**):

Таблица 24: Сравнителен анализ на процента на недостатъчност на Vit. D в различните групи и общо в изследваната извадка.

* - еднаквите букви по вертикалите указват на липса на сигнификантна разлика, а различните – на наличие на такава ($p < 0.05$)

Група	Пациенти с недостатъчност на витамин D		
	N	%	Sp
Здрави контроли	25	59.5[ac]	7.6
Момичета с първична аменорея	17	68[ac]	9.3
Момичета с вторична аменорея	49	69[a]	5.5
Момичета с опсоменорея (PCOS)	16	44.4[bc]	8.3
Цяла извадка	107	61.5	3.7

Най-висок относителен дял на момичета с недостатъчност на Vit. D има в групата на пациентките с вторична аменорея (69 %) в сравнение със здравите контроли (59.5 %) и момичетата с първична аменорея (68 %), като между тях статистическа разлика няма. С най-малък процент на дефицит са момичетата с опсоменорея (44.4 %), както спрямо контролите, така и в сравнение с останалите групи.

За цялата извадка относителният дял на имащите недостатъчност на Vit. D е 61.5 %.

Най-нисък процент на дефицит на витамин D (стойности под 20 ng/ml) има в контролната група (5.5 %), следван от пациентките с първична аменорея (6.9 %), вторична аменорея (7.2 %) и опсоменорея (5.8 %). Няма статистически значима разлика между контролната и останалите гупи.

IV.13 КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Проведеният корелационен анализ между показателите **LH, FSH, Estradiol и Osteocalcin** и **β – CrossLaps и Z – score** показа, че (**табл. 25**):

- ✓ **LH** корелира обратнопропорционално и умерено с Z – score
- ✓ **FSH** корелира обратнопропорционално и слабо с Osteocalcin и β – CrossLaps
- ✓ **Estradiol** корелира правопропорционално и слабо с Osteocalcin

Таблица 25: Коефициенти на корелация между LH, FSH, Estradiol и Osteocalcin и β – CrossLaps и Z – score (цяла извадка)* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

Показатели	Osteocalcin	β – CrossLaps	Z – score
LH	-0.088	-0.122	-0.3*
FSH	-0.212**	-0.181*	-0.211
Estradiol	0.179*	-0.044	0.114

V. ОБСЪЖДАНЕ

V.1 Хормонални констелации при основните групи хипоменструални нарушения

От включените в проучването групи пациентки с хипоменструални нарушения се разграничиха следните групи и подгрупи:

V.1.1 Група на момичета с първична аменорея, т.е. липса на поява на първа менструация до 15 годишна възраст. Те от своя страна бяха разделени на такива с гонадна дисгенезия и момичета с конституционално обусловен късен пубертет.

При пациентките с **гонадна дисгенезия** се получи типична картина на хипергонадотропен хипогонадизъм с повишени над горна граница серумни нива на LH (30.23 ± 10.15 UI/L) и FSH (49.57 ± 20.55 UI/L), съизмерими с нива в менопауза. Серумните нива на Estradiol бяха долно и под долногранични - 50.7 ± 21.59 pmol/L, както и нивата на AMH (0.3 ± 0.34 ng/ml). Carpini и Visser съобщават за резултати съизмерими с получените от нас, откриват силна обратнопропорционална връзка между LH, FSH и AMH, каквато връзка намерихме и ние. Не намират сигнификантна връзка между серумните нива на Estradiol и AMH, докато от изследвания от нас контингент се откри сигнификантно по-ниски стойности в групата с гонадна дисгенезия (53.7 ± 21.52 pmol/L – $p < 0.001$). Hagen et al. съобщават, че ниски серумни нива на AMH под 8 pmol/L (1.12 ng/ml) са високо специфиен и чувствителен маркер за яйчникова недостатъчност при пациентки със синдром на Turner и може да бъде използван като сурогатен маркер за овариална недостатъчност в детско - юношеската възраст.

При другата подгрупа на участничките с първична аменорея - **късен пубертет**, въпреки че откриваме статистически значимо по-ниски стойности на гонадотропните хормони в сравнение с контролната група (LH – $p = 0.009$

FSH - p = 0.042), то хормоналната характеристика е на еугонадотропен еугонадизъм с нормални стойности на двата хормона отговарящи на тези срещани в началото на пубертения период. При сравнение нивата на AMH на пациентките в тази подгрупа (4.7 ± 1.7 ng/ml) не се установи статистически значима разлика в сравнение с контролната група (p = 0.457). Winter et al. съобщават в своето проучване, обхващашо 14 момичета на средна възраст 14.05 ± 0.35 години, нормални стойности на LH и FSH, както и нива на Estradiol ≥ 15 pg/mL, което отговаря на 55.06 pmol/L, каквито стойности са описани и в други обзорни статии. Dwyer et al. намират ниски нива на гонадотропните и половите хормони при иначе здрави индивиди с конституционално обусловен късен пубертет.

V.1.2 Група с вторична аменорея – Функционална хипоталамична аменорея, която се дължи на **алиментарен дефицит** (хранителни разстройства), **прекомерно физическо натоварване или стрес**. В групата на вторична аменорея дължаща се на **алиментарен дефицит** в 51.06 % (при 24 пациентки) се установиха поднормни нива на LH – под 2 UI/L, при **стрес индуцираната** аменорея – 81.82 % и най – малък процент при пациентките с **прекомерни физически натоварвания** – 8.33 %, но при всички подгрупи беше установена статистически значима разлика спрямо контролите.

По отношение на FSH не бяха открити поднормни стойности – под 1 UI/L.

В редица статии се докладват ниски серумни нива на гонадотропните хормони и Estradiol, и нормални на AMH. Naessén намира по-ниски нива на гонадотропни хормони и Estradiol в изследваната от него група пациентки с хранителни разстройства в сравнение с контролната група, каквито резултати сме получили и ние в нашето проучване. Berga et al. съобщават, че за пациентки със стрес индуцирана аменорея е характерен хипогонадотропен хипогонадизъм. Тази група пациентки и при нас е с най-

ниски серумни нива на гонадотропни хормони със средни стойности – LH 1.65 ± 1.9 UI/L, FSH – 7.16 ± 8.01 UI/L и Estradiol 213.45 ± 132.81 pmol/L.

Нивата на AMH (6.49 ± 3.18 ng/ml) не се различават статистически от тези при здравите контроли. **The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine** съобщават, че при функционална хипоталамична аменорея се наблюдават нормални или ниски серумни нива на FSH и Estradiol, поради обичайно съществуващата флуктуация на изследваните хормони. Два колектива – Gordon et al. и отделно от тях Klein and Poth посочват в предложените от тях алгоритми за диагностициране на аменорея в юношеска възраст, че при функционална хипоталамична аменорея могат да се наблюдават нормални или ниски нива на гонадотропните хормони и Estradiol и трябва да бъдат оценени спрямо контекста на водещата до аменорея причина.

V.1.3 Пациентки с опсоменорея – При тези пациентки се наблюдава нормогонадотропен нормогонадизъм, но въпреки това имат нарушения в менструалния цикъл, характеризиращи се с удължени интерменструални интервали. Диагнозата PCOS е поставена посредством спазване изискванията на ESHRE/ASRM – пациентките да отговарят на поне два от трите критерия от Ротердам.

Средните стойности на гонадотропните хормони при тези пациентки са по-високи в сравнение с контролната група, но са в нормални референтни граници (LH – 8.96 ± 2.7 UI/L и FSH – 6.71 ± 2.39 UI/L).

Наблюдават се нормални, но статистически значими по-ниски нива на Estradiol – 356.94 ± 157.91 pmol/L ($p = 0.043$) и статистически значимо най-високи стойности на AMH – 10.11 ± 2.67 ng/mL ($p < 0.001$). От направения анализ на съотношението между LH и FSH, прави впечатление, че това съотношение е по – високо от единица единствено в тази група пациентки LH/FSH – 1.39 ± 0.32. Frank и Bednarska съобщават в своите проучвания, че пациентките с PCOS се характеризират с повишени серумни нива на

андрогени, LH и AMH, но нормални или ниски серумни нива на FSH. Съществуват и съобщения, че серумните нива на LH могат да бъдат нормални в до 40 % от случаите.

V.2 Диагностична стойност на AMH

Високата надеждност на AMH като сурогатен маркер допълващ критериите от Ротердам в диагностичния процес на пациентки с PCOS е доказана в множество проучвания. Висока специфичност и чувствителност (98 % и 93 %) докладват Saikumar et al. в своето проучване при прагова стойност (cut - off) на AMH 3.34 ng/ml. Woo et al. съобщават за чувствителност (75.9 %) и специфичност (86.8 %) при по-висока прагова стойност на AMH 7.82 ng/ml, а Lin et al. за 92 % - специфичност и 67 % - чувствителност при прагова стойност 7.3 ng/ml. Dewailly et al. докладват по-висока специфичност и чувствителност (92 % и 97 %) при прагова стойност 4.9 ng/ml. Homburg et al. съобщават висока специфичност (98.2 %), но по ниска чувствителност (60 %) на AMH при прагова стойност 6.7 ng/ml.

В направеното от нас проучване открихме висока чувствителност – 94 % и специфичност 69 % при прагова стойност на AMH от 5.95 ng/ml, както положителна предиктивна стойност от 72 % и отрицателна предиктивна стойност – 94 %. Тези разлики в праговата стойност са може би резултат от използването на различни китове за AMH. Cengiz et al. правят заключение, че когато се използва AMH сомостоятелно, а не в съвкупност с критериите на Ротердам, той не е надежден показател за поставяне или отхвърляне на диагноза PCOS.

Hagen et al. првят заключение, че AMH е надежден маркер за оценка на овариалната функция при здрави момичета и такива с гонадна дисгенезия. Те отчитат чувствителност на AMH – 96 % и специфичност – 86 %, позитивна предиктивна стойност – 96 % при прагова стойност на

хормона от 1.12 ng/ml. Visser and Lunding съобщават за обещаващи резултати по отношение на AMH, а именно за ниски до неоткриваеми стойности при повечето пациентки с липсващо развитие на спонтанен пубертет и нормални стойности при повечето момичета със спонтанно настъпил пубертет. Lunding посочва чувствителност 95 % при прагова стойност на хормона под 3 ng/ml, но открива AMH при 30 % от пациентките с гонадна дисгенезия и без признаци на спонтанен пубертет. В своето проучване посочва, че при серумни нива на AMH < 0.56 ng/ml на момичета в предпубертета не се наблюдава спонтанно отключване на пубертет.

В нашето проучване ние открихме чрез ROC анализ висока чувствителност (100 %) и специфичност (90 %), положителна предиктивна стойност – 71 % и отрицателна предиктивна стойност – 100 % при прагова стойност на хормона 1.32 ng/ml, което би спомогнало не само за допълване на диагностичния процес, но и разграничаване на тези пациенти (гонадна дисгенезия), както от пациентите с конституционално обусловен късен пубертет, така и от здравите момичета.

V.3 Костно здраве

V.3.1 Пациентките с първична аменорея – При пациентките с гонадна дисгенезия ние открихме стистически значимо по-ниски серумни нива на маркера за костно формиране Osteocalcin ($p = 0.002$) и по-високи серумни нива на β – CrossLaps, но без наличие на сигнификантна разлика ($p = 0.88$) в сравнение с контролната група, което показва потиснат костен метаболизъм. При тази група пациентки с хипергонадотропен хипогонадизъм имаше значимо най-ниски стойности на Estradiol и категорични параклинични данни за хипоестрогенизъм. При тях направеното остеодензитометрично изследване показва патологични стойности – Z – score – 2.33 ± 0.2. Поради малкия брой направени

остеодензитометрични изследвания, не може да се направи категоричен анализ по повод диагностичната стойност на този вид инструментално изследване в тази подгрупа.

В редица проучвания, правени сред пациентки с TS в пубертетно – юношеска възраст, се съобщава за повишени маркери за костна резорбция и нормални или понижени за костно формиране, което показва нарушен баланс в костното ремоделиране. Lisa et al. описват намалена костна плътност при 25 % от пациентките с TS, ниски нива на Osteocalcin, които показват потисната остеобластна активност. Breuil съобщава в своето проучване за повишаване на костната маса и нормализиране на маркерите за костен метаболизъм при пациентки с гонадна дисгенезия след приложение на терапия с естрогени, което предполага, че естрогенният дефицит е водещ фактор за загуба на костна плътност при тези пациентки. Подобни резултати са публикувани и в редица други статии.

В направеното от нас проучване тази група пациентки са с най-ниски средни серумни нива на Estradiol и патологични показатели – маркери за костен метаболизъм и остеодензитометрия.

Проучванията по отношение на маркерите за костен метаболизъм при пациентки с конституционално обусловен късен пубертет са малко на брой. В по-голяма част от тези проучвания обхващат мъжкия пол, поради по-голямата честота на засягането му.

Пубертетният период се свързва с ускорен костен метаболизъм. При проучвания правени сред пациенти с конституционално обусловен късен пубертет се съобщава, че костната плътност нараства паралелно със стадиите на пубертетно развитие и най-значимо натрупване се наблюдава между III и IV стадий, като не се открива значима разлика при съпоставянета им със здрави контроли. Не са открити и сигнификантни разлики в серумните нива на маркерите за костен метаболизъм между тези две групи. Съобщава се също и за липса на повишен риск от остеопорозни фрактури

при тези пациенти в сравнение със здрави контроли. Нашите данни показват повишен костен метаболизъм в тази подгрупа, като средните серумни нива на Osteocalcin са 46.13 ± 10.16 ng/mL, които нива са по-високи в сравнение с тези при контролната група 39.36 ± 20.68 ng/mL, но без значима разлика между тях (p = 0.069). Такива са и резултатите по отношение на β – CrossLaps – 1.15 ± 0.36 ng/mL при пациентките с късен пубертет и 1.03 ± 0.4 ng/mL в контролната група (p = 0.224). Тези разлики може би са резултат от факта, че при тази група пациентки превалират такива с пубертетно развитие III стадий по Tanner, а IV стадий е със сигнификантно по-висок процент при контролите. Именно във II - III стадий стойностите на маркерите за костен метаболизъм са най-високи и постепенно спадат в края на пубертета IV – V стадий.

V.3.2 Пациентки с вторична аменорея – Функционална хипоталамична аменорея (FHA). **В подгрупата свързана с хранителни разстройства** – водеща причина **алиментарен дефицит**, ние открихме значимо по-ниски средни стойности на Osteocalcin (p = 0.035) и по-ниски, но без наличие на сигнификантна разлика стойности на β – CrossLaps (p = 0.160), което е признак на подтисната остеобластна активност. В тази подгрупа се отчетоха и значимо по-ниски стойности на Z – score – 0.64 ± 1.28 всравнение със здравите контроли Z – score 0.5 ± 0.75 ($p < 0.001$) .

При пациенти в пубертетно – юношеска възраст страдащи от **анорексия нервоза** се съобшава за нарушен костен метаболизъм с ниски серумни нива на маркери за костно формиране и разграждане, както и ниска костна минерална плътност, като в 50 % от случаите се установява Z – score < - 1. При тези пациентки се наблюдава значително намаляване на темпа на костно натрупване всравнение със здрави контролни групи. Тези данни контрастират със състоянието на повишен костен метаболизъм при здрави момичета в пубертетно – юношеска възраст. При подрастващи с АН, който не са лекувани, намаляването на костната плътност прогресира, докато при

момичета с АН, при които има покачване на телесното тегло и нормализиране на менструалните цикли се наблюдава и повишение на стойностите на маркерите за костен метаболизъм и Z – score.

При пациентките подложени на **екстремни физически натоварвания/спорт**, включени в нашето проучване не се откри статистически значима разлика между маркерите за костен метаболизъм и остеодензитометричното изследване на костна плътност в сравнение с контролната група.

В литературата се съобщава за ниски серумни нива на двата вида костни маркери (за костно формиране и костна резорбция) при пациенти занимаващи се активно със спорт или подложени на екстремно физическо натоварване и аменорея в сравнение с еуменорични спортисти и здрави контроли. Трябва да се вземе в предвид обаче, че повечето проучвания в световната литература описват състоянието на костния метаболизъм и костната плътност при пациентки занимаващи се активно и професионално със спорт, докато изследваната от нас група с водеща причина за аменорея – екстремно физическо натоварване/спорт не са професионални спортистки. При тях липсват анамнестични данни за алиментарен дефицит и средната стойност на BMI е 19.8 kg/m2, като само в 18.18 % BMI е с поднормни стойности.

Warren et al. подчертават важността на телесното тегло като определящ фактор за костната плътност, както и композицията на тялото и хранителните навици в патогенезата на костната загуба при атлетите.

Въпреки по-ниските нива на Estradiol (по-ниски, но все пак в границите на нормата), преобладаващия нормален ИТМ и стимулиращия ефект на физическите натоварвания при тази група нямаме отрицателен ефект върху костната плътност.

В други проучвания се съобщава съществуване на известен протективен ефект на физическите упражнения върху костите при момичета с аменорея, посредством остеогенния ефект на механичното натоварване.

В третата подгрупа на пациентките с FHA – **стрес индуцирана аменорея** и двата изследвани от нас маркера за костен метаболизъм бяха по-ниски в сравнение с контролната група, но статистически значима разлика не се откри. Съществуват данни, че хипоестрогенемията играе ключова роля в костната загуба при пациентки с FHA в това число и при стрес – индуцирана аменорея.

В направеното от нас проучване при пациентки с вторична аменорея и в частност тези с FHA ние открихме наличие на обратнопропорционална връзка между продължителността на аменорея и серумните нива на Osteocalcin, за каквато връзка докладват и Audi et al.

V.3.3 В групата пациентки с PCOS отчетохме статистически значимо по-ниски стойности на Osteocalcin ($p < 0.001$), но без сигнификантна разлика в серумните нива на β – CrossLaps и Z – score в сравнение със здравата контролна група. В тази група се отчете и най-висок процент на наднормни стойности на BMI – 38.9 % и със затлъстяване – 8.3 %.

Katulski et al. намират сигнификантно по-ниска КМП (1.057 ± 0.1260 g/cm^2, vs. 1.210 ± 0.1805 g/cm^2, $p < 0.0002$) и стойности на Z - score при пациентки с нормален BMI в сравнение със здрави контроли (-0.85 ± 1.15 vs. -0.13 ± 0.83), но в групата на наднормени/обезни пациентки с PCOS не намират сигнификантна разлика в изследваните показатели в сравнение с контролите.

В своето Lingaiahet al. съобщават за статистически значимо по-ниски нива на Osteocalcin при тези пациентки, но не откриват сигнификантна разлика между нивата на β – CrossLaps и витамин Д между тях и контролите.

В друго свое проучване докладват за подтиснат костен метаболизъм и ниски нива на двата вида серумни маркери.

V.4 BMI и връзката му с основните изследвани показатели

При млади момичета с ниско тегло, аменорея, ановулация, неадекватна лутеинова фаза на менструалнип цикъл се наблюдава намалена КМП. Съществува хипотеза за критично ниво на мастната тъкан, която е необходима за настъпване на menarche и регулиране на менструалните цикли, както следва – 17 % за menarche и 22 % за рагулярни менструални цикли. Според тази хипотеза ексцесивно натоварване или малнутриция може да доведат до редуциране на мастната тъкан под критичния минимум и да дадат като резултат първична или вторична аменорея.

Пвишаването на BMI се свързва с повишение на КМП. Ravn et al. сравняват жени с обезитас с еднакви по възраст жени с нормално тегло и стигат до заключение, че при първата група има значително по-нисък риск от развитие на остеопороза. От друга страна обезитетът може да доведе до костна загуба, чрез стимулиране образуването и отделянето на проинфламаторни цитокини – IL - 6 и tumour necrosis factor - α, които стимулират остеокластната активност.

При направените от нас анализ става ясно, че най-висок процент на наднормни стойности на BMI има в групата с опсоменорея – 47.2 %, а останалите две групи се наблюдават главно поднормни стойности на BMI, както следва – при пациентките с първична аменорея 32 % и вторична аменорея – 31 % от всички. Сигнификантно по-високи стойности на Z – score се установиха в групата на пациентките с опсоменорея и при контролната група (които не се различават статистически помежду си) спрямо другите две групи с хипоменструални нарушения, където се

отчетоха и по-висок процент поднормни стойности на BMI. Направения корелационен анализ показа, че BMI корелира правопропорционално и умерено по сила единствено със Z – score в изследваните от нас групи.

V.5 Vitamin D и Ca – P обмяна

В проведено в България проучване обхващащо 2032 лица става ясно, че средното популационно ниво на vitamin D (25(OH)D) е 38.75 nmol/l. Не са открити статистически значими разлики в серумните нива на 25(OH)D в зависимост от възрастта, но женският пол е с по-ниски средни стойности в сравнение с мъжкия. Честотата на дефицит на vitamin D е 21.3 %, а на недостатъчност – 54.5 %.

В световен мащаб дефицитът и недостатъчността на vitamin D е широко застъпен – от 53.4 % в Южна Америка до 81.8 % в Средния Изток. В Южна Европа дефицитът на vitamin D е по-висок отколкото в Северна Европа. Gordon et al. докладват висока честота на недостатъчност на vitamin D сред деца и юноши в Америка, като не намират връзка с пол, етническа принадлежност или годишен сезон. Absoud et al. съобщават за подобни резултати във Великобритания.

В проведеното от нас проучване върху цялата изследвана популация се установи недостатъчност на vitamin D (серумни стойности на vitamin D по-ниски от 30 ng/ml) в 61.5 % от момичетата, като най-висок процент имаха пациентките с вторична аменорея (69 %), следвани от тези с първична аменорея (68,0 %), контролната група – 59.5 % и най-нисък процент беше открит при пациентките с опсоменорея – 44.4 %. Статистически значима разлика не беше установена между изследваните групи и здравите контроли по отношение на недостатъчност на vitamin D.

Най-нисък процент на дефицит на vitamin D (стойности на vitamin D под 20 ng/ml) имаше в контролната група (5.5 %), следван от пациентките с

първична аменорея (6.9 %), вторична аменорея (7.2 %) и опсоменорея (5.8 %). Не се откри статистически значима разлика между изследваните групи.

Нашите резултати потвърждават наличието и тежестта на наблюдаваният не само в България дефицит и недостатъчност на vitamin D, но и световен мащаб. Липсата обаче на статистически значима разлика в изследваните от нас групи по отношение на нивата на vitamin D, ни дава възможност да оценим в частност влиянието на хормоналните промени при различните хипоменструални нарушения върху костния метаболизъм.

Статистически значима разлика в серумните нива на **Ca** и **P** в изследваните от нас групи не се откри.

V.6 Стадии на пубертетно развитие и костен метаболизъм

Маркерите за костен метаболизъм (маркери за костно формиране и костна резорбция) са най-високи при раждането и остават такива през детството, отразявайки най-бързия костен растеж и интензивно извършващите се процеси на моделиране и ремоделиране на костта. Следва постепенно спадане нивата на маркерите и едва по време на пубертетния растежен скок (12 – 15 годишна възраст) настъпва нов подем, като пикът при момичета е между 10 и 13 годишна възраст.

Във възрастовата група до 15 години, ние установихме статистически значимо по-високи нива на маркерите за костно формиране и Estradiol при коктролната група в сравнение с групите на пациентките с вторична и опсоменорея ($p < 0.05$).

Във възрастовата група след 15 години статистически значимо най-високи стойности на двата маркера се откриха в групата с първична аменорея, което може да се обясни с факта, че в нея са включени пациентки с конституционално обусловен късен пубертет с превалиране на III степен

пубертетно развитие по Tanner, а както вече беше описано във II – III степен стойностите на маркерите за костен метаболизъм са най-високи и постепенно спадат в края на пубертета IV – V степен. При другите две групи нямаше статистически значима разлика помежду им по отношение на маркерите за костен метаболизъм, но стойностите им бяха сигнификантно по-ниски от тези на контролната група ($p < 0.05$). 0 - II степен на пубертетно развитие имаха само пациентките с гонадна дисгенезия, при които данните сочеха за подтиснат костен метаболизъм несъответстващ на пубертетното развитие. При здрави момичета с 0 - II степен на пубертетно развитие обичайно се наблюдава усилен костен метаболизъм с високи стойности на маткерите за костно формиране и резорбция. Момичета с III степен на пубертетно развитие имаше във всички изследвани групи, като сигнификантно най-високи стойности на маркерите за костен метаболизъм имаше в контролната група. III – IV степен най-високи стойности на Osteocalcin имаха пациентките с първична аменорея и в частност тези с късен пубертет, следвани от здравите контроли.

При другите две групи се отчетоха отново по-ниски стойности на двата маркера в сравнение с контролната група. При момичетата с IV^{та} степен на пубертетно развитие отново маркерите за костно формиране бяха най-високи в контролната група, следвани от пациентките с вторична аменорея и опсоменорея, но значима разлика не се установи.

VI. ОБЩИ ИЗВОДИ

1. При пациентките с гонадна дисгенезия и хормонална характеристика на хипергонадотропен хипогонадизъм съществува риск от непълноценно натрупване на костна маса.

2. При пациентките с конституционално обусловен късен пубертет и хормоналната характеристика на еугонадотропен еугонадизъм костната плътност нараства паралелно със стадиите на пубертетното развитие.

3. Риск от недостигане на оптимална ПКМ съществува при пациентките с аменорея вследствие на алиментарен дефицит с хормонална характеристика на хипогонадотропен хипогонадизъм.

4. При пациентките с аменорея свързана с екстремно физическо натоварване/спорт и при тези със стрес - индуцирана аменорея не бяха установени нарушения в костния метаболизъм.

5. При пациентки с функционална хипоталамична аменорея могат да се наблюдават нормални или ниски нива на гонадотропните хормони и Estradiol, и трябва да бъдат оценявани спрямо контекста на водещата до аменорея причина.

6. При пациентките с опсоменорея/PCOS, въпреки хормонална характеристика на еугонадотропен еугонадизъм, беше установен риск от недостигане на оп тимална ПКМ.

7. При пациентките с хипоменструални нарушения с под - и наднормено телесно тегло бяха установиха значимо по-ниски серумни нива на Estradiol и Osteocalcin спрямо контролната група с нормален ИТМ, което ги поставя в риск от недостатъчно натрупване на костна маса.

8. АМН може да бъде използван като сурогатен маркер в диагностичния процес не само при пациентки с PCOS, но и при пациентки с гонадна дисгенезия, където маркерът показва висока специфичност – 90 % и чувствителност – 100 %.

9. Установеният висок процент на витамин D недостатъчност, показва съществуването на този проблем и при деца и подрастващи, където пероралния прием на витамин D е уместно да се въведе като профилактика.

VII. ПРИНОСИ

1. За пръв път в България е проведено проспективно проучване от подобен тип обхващащо 174 момичета на възраст от 12 до 18 години - 132 с различни по етиология хипоменструални нарушения и 42 здрави контроли.

2. За пръв път в България е направен подробен сравнителен анализ на причинно - следствената връзка между хормоналните нарушения наблюдавани при пациентки в пубертетно - юношеска възраст с различни по етиология хипоменструални нарушения и установените изменения в костния метаболизъм.

3. Установена е обратнопропорционална връзка между продължителността на аменореята и серумните нива на Osteocalcin при пациентки с вторична аменорея.

4. Направена е оценка на възможността АМН да бъде използван като сурогатен маркер в диагностияния процес на пациентки с гонадна дисгенезия и PCOS.

5. Нашите изследвания по отношение на пациентките с хипергонадотропен хипогонадизъм, потвърждават резултатите на чужди автори, относно сигнификантно по-ниската костна минерална плътност и серумните нива на Osteocalcin в сравнение със здравите контроли.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации

1. Христова Д., Сираков М. Хипоменструални нарушения и влиянието им за достигане на оптимална пикова костна маса в пубертетно - юношеска възраст. Акушерство и гинекология. 2017; 3: 21 - 24.
2. Христова Д., Сираков М. Пикова костна маса и хормонален статус при девойки в пубертетно - юношеския период с нарушен менструален цикъл. Акушерство и гинекология. 2018 (suppl. 1; vol. 57): 63 - 68.
3. Христова Д., Сираков М. Анти - Мюлеров хормон при диагностика на някои менструални нарушения в детско - юношеската възраст. Акушерство и гинекология. 2018; 6: 12 - 14.
4. Hristova D., Sirakov M. HORMONAL STATUS AND BONE HEALTH IN BULGARIAN ADOLESCENTS WITH SECONDARY AMENORRHOEA. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences – под печат

Участия в конгреси

XX Национална гинекологична конференция, Боровец, 16 - 18 Март, 2017 г. Пикова костна маса и хормонален статус при девойки в пубертетно-юношеския период с нормален и нарушен менструален цикъл.

XXI Национална гинекологична конференция. Боровец, 22 - 25 Март, 2018 г. Първична аменорея – алгоритъм за поведение.

Участия в научни проекти, свързани с дисертационния труд

Договор № 70/2015г., проект с вх.№ 167/13.01.2015г. на тема: „Пикова костна маса и хормонален статус при девойки в пубертетно – юношески период с нормален и нарушен менструален цикъл“ от конкурс „ГРАНТ“ на МУ – София за финансиране на изследователски проекти.